

**Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia**

**EFEITO GASTROPROTETOR DO SILDENAFIL (VIAGRA®) NA LESÃO
GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁLCOOL EM RATOS:
PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO, DO GMP_c E DOS CANAIS DE POTÁSSIO
SENSÍVEIS AO ATP**

Jand-Venes Rolim Medeiros

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza

FORTALEZA – CEARÁ

2006

Jand-Venes Rolim Medeiros

**AVALIAÇÃO DO EFEITO GASTROPROTETOR DO SILDENAFIL (VIAGRA®) NA
LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁLCOOL EM RATOS:
PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO, DO GMP_c E DOS CANAIS DE POTÁSSIO
SENSÍVEIS AO ATP**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador:
Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza

FORTALEZA – CEARÁ

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

M_{439e} Medeiros, Jand-Venes Rolim
Efeito gastroprotetor do sildenafil (viagra®) na lesão gástrica induzida por álcool em ratos : papel do óxido nítrico, do cGMP e dos canais de potássio sensíveis ao ATP / Jand-Venes Rolim Medeiros. – Fortaleza, 2006
121f. : il.
Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza-Ce, 2006
1. Úlcera gástrica. 2. Sildenafil. 3. óxido nítrico. 5. Glutathione. I. Souza, Marcellus Henrique Loiola de (orient.);II. Título

CDD 616.334

Jand-Venes Rolim Medeiros

**AVALIAÇÃO DO EFEITO GASTROPROTETOR DO SILDENAFIL (VIAGRA®) NA
LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁLCOOL EM RATOS:
PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO, DO GMP_c E DOS CANAIS DE POTÁSSIO
SENSÍVEIS AO ATP**

Dissertação submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
(Orientador)**

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos

Prof. Dra. Stella Regina Zamuner

**Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
(LAFICA)**

**Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará (UFC)**

**Nenhum trabalho pode ser concluído na solidão.
Dedico este trabalho a todos os meus familiares,
especialmente à minha esposa Waneska, minha
irmã Regianne e a meus pais que me apoiaram em
todos os momentos e fases, inicialmente quando
aprendia.**

Se eu lhe digo: “Faça assim!”, e você me pergunta “por quê?”, e lhe respondo: “porque é assim que se faz”, eu não estou lhe ensinando nada, mas sim impondo-lhe minha autoridade. Não uso minha inteligência para convencê-lo de que é bom e certo fazer assim, mas me sirvo de minha memória para lembrar-me de que, quando agi diferentemente de como estou lhe dizendo, percebi ter cometido um erro.

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo à **Deus**, que sempre esteve presente na minha vida, dando-me forças para superar as dificuldades, os espinhos e as pedras que se interpôs em meu caminho.

Acredito que um trabalho se torna grandioso em função do empenho, participação e compromisso de uma equipe multidisciplinar. Este estudo só se tornou possível pela colaboração de algumas pessoas e órgãos a quem gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador Prof. Dr. **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza**, pela sua incansável e criteriosa orientação, por sua dedicação, paciência, apoio, disponibilidade, profissionalismo, ensinamentos e incentivos à minha formação científica que foram essenciais à elaboração deste trabalho, minha eterna gratidão;

Ao Prof. Dr. **Ronaldo Albuquerque Ribeiro**, exemplo de competência e seriedade, pela acolhida em seu laboratório e por suas valiosas sugestões durante o desenvolvimento desse trabalho;

A Prof. Dra. **Gerly Anne de Castro Brito**, pela colaboração na realização das leituras histológicas

A todos os professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, especialmente ao Prof. Dr. **Armênio Aguiar Santos** e a Prof. Dr. **Nylane** pela recepção em seus laboratórios, ensinamentos e colaboração;

As bolsistas de iniciação científica **Samara, Joyce e Gemima**, pela grande ajuda na realização desse trabalho, meu sincero agradecimento;

A todos os integrantes do LAFICA: **Antoniella, Renata, Hellíada, Mariana, Rosymeire (Rosinha), Ana Caroline, Lorena, André Luiz, Esther, Romualdo, Pedro, Marco Botelho, Maurício, Raul, Lívia, Nilfácio, Raphael Capaz e todos os outros** pela colaboração nas atividades laboratoriais, mas também pela amizade e inúmeros momentos compartilhados;

A **Maria Silvandira França Pinheiro** (Vandinha), pela amizade, disposição, simplicidade e dedicação ao LAFICA;

A todos os meus amigos biólogos da **turma 99.2** do curso de Ciências Biológicas, pela amizade, disposição, estímulo, aconselhamentos e momentos divertidos;

A **meus pais**, que me deram a vida e ensinaram a vive-la com dignidade; que se doaram por inteiro e, muitas vezes, renunciaram a seus sonhos para que pudessem realizar os meus.

As minhas irmãs, **Diana Lêda e Regianne**, que sempre estiveram presente na minha vida;

A minha esposa **Waneska**, minha companheira e amiga de todas as horas, pelo amor, paciência e por estar sempre presente em cada passo da minha vida pessoal e acadêmica nos últimos anos.

Á CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento do meu projeto de mestrado.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AINEs** – Antiinflamatórios não esteroideais
- AMPc** – Monofosfato cíclico de adenosina
- GMPc** – Monofosfato cíclico de guanosina
- cNOS** – NO sintase constitutiva
- COX** – Ciclooxygenase
- COX1** – Ciclooxygenase do tipo 1
- COX2** – Ciclooxygenase do tipo 2
- EDRF** – Fator de crescimento derivado do endotélio
- EGF** – Fator de crescimento epidérmico
- eNOS** – NO sintase endotelial
- K_{ATP}** – Canais de potássio sensíveis ao ATP
- KDa** – Kilo dáltons
- Kg** – Kilograma
- FAD** – Flavina adenina dinucleotídeo
- FDA** – Food and Drug Administration
- FMN** – Flavina mononucleotídeo
- GABA_A** – Ácido γ -aminobutírico
- GC** – Guanilato ciclase
- GMP** – Guanosina monofosfato
- GPX** – Glutathione peroxidase
- GSH** – Glutathione
- GTP** – Guanosina trifosfato

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-4 – Interleucina 4

IL-13 – Interleucina 13

IL-10 – Interleucina 10

iNOS – NO sintase induzível

L-arg – L-arginina

L-NAME - N^G-nitro-L-arginina-metilester

L-NMMA - N^G-monometil-L-arginina

LPS – Lipopolissacarídeo bacteriano

mL – mililitro

MLCK – Quinases de miosina de cadeia leve

MLCP – Fosfatases de miosina de cadeia leve

mg – Miligrama

mm – milímetro

NANC – Não-adrenérgicos não-colinérgicos

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

NMDA - N-metil-D-aspartato

nNOS – NO sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS – enzima NO sintase

ODQ – Droga inibidora seletiva da enzima guanilato ciclase

OMS – Organização Mundial de Saúde

PDEs – Fosfodiesterases

PDE5 – Fosfodiesterase do tipo 5

PDE6 – Fosfodiesterase do tipo 6

PKA – Proteína quinase A

PKC – Proteína quinase C

PKGs - Proteínas quinases cGMP-dependentes

pGC – Guanilato ciclase particular

PGs - Prostaglandinas

PGE₁ – Prostaglandina E1

PGE₂ – Prostaglandina E2

RNOS - Espécies reativas do nitrogênio

ROS – Espécies reativas do oxigênio

rpm – Rotações por minuto

sGC – Guanilato ciclase solúvel

SH-NP - Grupos sulfidrílicos não-protéicos

SNC – Sistema nervoso central

TGI – Trato gastrointestinal

TGF- α – Fator de crescimento tumoral

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

VIP – Polipeptídeo intestinal vasoativo

5-HT₃ - Serotonina-3

RESUMO.

INTRODUÇÃO: Recentemente nós demonstramos que o sildenafil tem efeito protetor contra a lesão gástrica induzida por AINEs em ratos, através de uma diminuição na aderência de leucócitos e aumento do fluxo sanguíneo gástrico (Santos CL et al, BJP, 2005). O etanol induz lesão hemorrágica gástrica em ratos através de um aumento na produção de radicais livres e diminuição da concentração de glutathiona na mucosa. **OBJETIVOS:** O objetivo deste trabalho foi investigar se o sildenafil possui efeito protetor contra a lesão induzida por álcool, e avaliar o papel da via NO/GMPc/K_{ATP} no efeito gastroprotetor do sildenafil. **MÉTODOS:** O sildenafil (0.1, 0.3, 1, ou 3 mg/Kg, v.o) foi administrado 30 min antes do etanol 100% (4 ml/Kg, v.o). Depois de 1 h, os ratos foram sacrificados e os estômagos abertos para determinação da área da lesão usando planimetria computadorizada. Além disso, fragmentos de tecidos foram removidos para análise microscópica e dosagem de glutathiona e hemoglobina (teste colorimétrico - Bioclin). Os outros grupos foram tratados com L-NAME (1 ou 3 mg/kg, i.p), L-NAME (3 mg/kg, i.p) + L- Arg (200mg/kg, ip), ODQ (10 mg/Kg, v.o), glibenclamida (0.1, 0.3, 1 ou 3 mg/Kg, v.o), glibenclamida (1 mg/Kg) + diazóxido (3mg/Kg, i.p) ou salina. Após 30 min os ratos receberam sildenafil (1mg/kg) e depois de mais 30 min etanol 100% (4ml/kg, v.o), com o sacrifício ocorrendo 1 h depois. **RESULTADOS:** O etanol 100% causou lesão gástrica ($158.9 \pm 9.3 \text{ mm}^2$), hemorragia na mucosa ($3787.0 \pm 512.9 \text{ } \mu\text{g}/100\text{mg}$) e redução da concentração de glutathiona ($78.7 \pm 9.5 \text{ } \mu\text{g}/\text{g}$). O Sildenafil protegeu, de forma dose-dependente, a mucosa gástrica do efeito do álcool, com o efeito máximo na dose de 1 mg/Kg ($44.5 \pm 7.7 \text{ mm}^2$). O sildenafil também reverteu a diminuição da glutathiona ($143.6 \pm 15.7 \text{ } \mu\text{g}/\text{g}$) induzida por etanol. O L-NAME sozinho ($151.1 \pm 20.9 \text{ mm}^2$), o ODQ ($137.9 \pm 41.6 \text{ mm}^2$) e a glibenclamida sozinha ($137.1 \pm 16,7 \text{ mm}^2$) reverteram a proteção do sildenafil. Mas, nos animais tratados com L-NAME + L-arginina ($30.9 \pm 10.5 \text{ mm}^2$) ou glibenclamida + diazóxido ($60.3 \pm 2.0 \text{ mm}^2$) não houve mudanças no efeito do sildenafil. **CONCLUSÕES:** O sildenafil protege a mucosa gástrica contra a lesão induzida por álcool, através da ativação da via NO/GMPc/K_{ATP} e por um aumento dos níveis de GSH no estômago.

ABSTRACT.

INTRODUCTION: Recently, we demonstrated that sildenafil has protective effects against NSAID- induced gastric damage in rats, by a decrease in leukocytes adherence and increase in gastric blood flow (Santos CL et al, BJP, 2005). Ethanol induced gastric hemorrhagic damage in rats, by an increase in free radical production and decrease in mucosal glutathione concentration. **AIMS:** Aim of was work is to investigate if sildenafil has a protective effect against ethanol- induced gastric damage and the role of the way NO/cGMP/K_{ATP} in this event. **METHODS:** Sildenafil (0.1, 0.3, 1, or 3 mg/Kg, *p.o*) was administrated 30 min before ethanol 100% (4 ml/Kg, *p.o*). After 1 hour, rats were sacrificed and the stomachs opened along the greater curvature and the mucosal lesion area was measured by computer planimetry program. Furthermore, pieces of gastric mucosal were removed for microscopic analysis and glutathione measure, and hemoglobin concentrations (colorimetric test Bioclin). Other groups had been dealt with L-NAME (1 or 3 mg/kg, *i.p*), L-NAME (3 mg/kg, *i.p*) + L- Arg (200mg/kg, *i.p*), ODQ (10 mg/Kg, *p.o*), glibenclamide (0.1, 0.3, 1 ou 3 mg/Kg, *p.o*), glibenclamide (1 mg/Kg) + diazóxide (3mg/Kg, *i.p*) ou saline. After 30 min the rats had received sildenafil (1mg/kg), and after more 30 min ethanol 100% (4ml/kg, *p.o*), with the sacrifice occurring 1 h later. **RESULTS:** Absolute ethanol induced gastric damage ($158.9 \pm 9.3 \text{ mm}^2$), and gastric mucosal hemorrhage ($3787.0 \pm 512.9 \mu\text{g}/100\text{mg}$) and reduced gastric glutathione concentration ($78.7 \pm 9.5 \mu\text{g}/\text{g}$). Sildenafil protected, in a dose dependent manner, the ethanol- induced gastric damage , with the maximum effect in the dose of 1 mg/Kg ($44.5 \pm 7.7 \text{ mm}^2$). Sildenafil also reversed the decreased in gastric glutathione ($143.6 \pm 15.7 \mu\text{g}/\text{g}$) induced by ethanol. Alone L-NAME ($151.1 \pm 20.9 \text{ mm}^2$), ODQ ($137.9 \pm 41.6 \text{ mm}^2$) and glibenclamide alone ($137.1 \pm 16,7 \text{ mm}^2$) reverted the protection of the sildenafil. But, in the animals trated with L-NAME + L-arginine ($30.9 \pm 10.5 \text{ mm}^2$), or glibenclamide + diazóxido ($60.3 \pm 2.0 \text{ mm}^2$) did not have changes in the effect of the sildenafil. **CONCLUSION:** Sildenafil had a gastric protective effect against ethanol- induced gastric damage through the activation of the NO/cGMP/K_{ATP} pathway, at least in part through a increase in stomach GSH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema representativo dos efeitos do consumo agudo e crônico de etanol no estômago.	7
Figura 2.	Esquema ilustrativo dos mecanismos moleculares propostos pelo qual o etanol provoca inflamação e lesão na mucosa gástrica.	8
Figura 3.	Oxidação da L-arginina para L-citrulina pela ação das enzimas óxido nítrico sintases.	12
Figura 4.	Estrutura química do GMPc e do sildenafil, um inibidor específico da fosfodiesterase 5.	18
Figura 5.	Esquema fisiopatológico atual da úlcera péptica.	21
Figura 6.	Esquema representativo das etapas na síntese de glutatona.	21
Figura 7.	Papel metabólico e funções celulares dos canais de K_{ATP} .	23
Figura 8.	Esquema representando a divisão em quadrantes do estômago lesado para a retirada das amostras.	33
Figura 9.	Efeito macroscópico e microscópico do tratamento do sildenafil na lesão gástrica induzida por álcool em ratos.	41
Figura 10.	Efeito do tratamento do sildenafil na lesão gástrica induzida por álcool em ratos.	42

Figura 11.	Avaliação microscópica do efeito protetor do sildenafil na lesão gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.	44
Figura 12.	Determinação dos níveis de glutathione presentes na mucosa de ratos tratados com álcool e/ou sildenafil.	45
Figura 13.	Determinação dos níveis de hemoglobina presentes na mucosa de ratos tratados com álcool e/ou sildenafil.	46
Figura 14.	Efeito macroscópico e microscópico do tratamento com L-NAME e/ou L-arginina na lesão gástrica induzida por álcool em ratos.	49
Figura 15.	Efeito do tratamento com L-NAME na proteção do sildenafil à lesão gástrica induzida por álcool em ratos.	50
Figura 16.	Avaliação microscópica do efeito do L-NAME na proteção do sildenafil à lesão gástrica induzida por álcool em ratos.	52
Figura 17.	Determinação dos níveis de glutathione presentes na mucosa de ratos tratados com L-NAME e/ou L-ARG.	53
Figura 18.	Determinação dos níveis de hemoglobina presentes na mucosa de ratos tratados com L-NAME.	54
Figura 19.	Efeito macroscópico e microscópico do tratamento com ODQ na lesão gástrica induzida por álcool em ratos.	57
Figura 20.	Efeito do tratamento com ODQ na proteção do sildenafil à lesão gástrica induzida por álcool em ratos.	58

Figura 21.	Avaliação microscópica do efeito do ODQ na proteção do sildenafil à lesão gástrica induzida por álcool em ratos.	60
Figura 22.	Determinação dos níveis de glutathione presentes na mucosa de ratos tratados com ODQ.	61
Figura 23.	Determinação dos níveis de hemoglobina presentes na mucosa de ratos tratados com ODQ.	62
Figura 24.	Efeito macroscópico e microscópico do tratamento com glibenclamida e/ou diazóxido na lesão gástrica induzida por álcool em ratos.	66
Figura 25.	Efeito do tratamento com glibenclamida e diazóxido na proteção do sildenafil contra a lesão gástrica induzida por etanol absoluto.	67
Figura 26.	Avaliação microscópica do efeito da glibenclamida sozinha ou com diazóxido na proteção do sildenafil à lesão gástrica induzida por álcool em ratos.	69
Figura 27.	Determinação dos níveis de glutathione presentes na mucosa de ratos tratados com glibenclamida e/ou diazóxido.	70
Figura 28.	Determinação dos níveis de hemoglobina presentes na mucosa de ratos tratados com glibenclamida e/ou diazóxido.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Avaliação microscópica total: edema, hemorragia, perda de células epiteliais e infiltração de células inflamatórias em estômagos de ratos tratados com etanol absoluto ou com etanol absoluto + sildenafil (1mg/Kg).	43
Tabela 2.	Avaliação microscópica total: edema, hemorragia, perda de células epiteliais e infiltração de células inflamatórias em estômagos de ratos tratados com etanol absoluto, com etanol absoluto + sildenafil ou pré-tratados com L-NAME e/ou L-Arg.	51
Tabela 3.	Avaliação microscópica total: edema, hemorragia, perda de células epiteliais e infiltração de células inflamatórias em estômagos de ratos tratados com ODQ.	59
Tabela 4.	Avaliação microscópica total: edema, hemorragia, perda de células epiteliais e infiltração de células inflamatórias em estômagos de ratos tratados com glibenclamida ou glibenclamida + diazóxido.	68

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMO	vi
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Álcool e a Lesão Gástrica.....	4
1.2. Óxido nítrico e a Proteção Gástrica	10
1.3. Sildenafil (Viagra®), GMPc e a Proteção Gástrica	15
1.4. Mecanismos de Proteção Gástrica e Glutathiona (GSH)	20
1.5. Canais de Potássio Sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e a Proteção Gástrica	22
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Animais	28
3.2. Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais.....	28
3.3. Drogas Utilizadas	29
3.4. Corantes	30

3.5. Soluções	30
3.6. Efeito Protetor do Sildenafil na Lesão Gástrica Induzida por Álcool em Ratos: Curva Dose-Resposta	32
3.7. Papel do Óxido Nítrico (NO) no Efeito Protetor do Sildenafil na Lesão Gástrica Induzida por Álcool em Ratos	33
3.8. Papel do cGMP no Efeito Protetor do Sildenafil na Lesão Gástrica Induzida por Álcool em Ratos	34
3.9. Papel dos Canais de K ATP-Dependentes no Efeito Protetor do Silde- nafil na Lesão Gástrica Induzida por Álcool em Ratos	35
3.10. Determinação dos Níveis de Glutathione (Grupos Sulfidrílicos Não- Protéicos) na Mucosa Gástrica de Ratos.....	35
3.11. Avaliação Histopatológica da Mucosa Gástrica de Ratos	36
3.12. Determinação da Concentração de Hemoglobina (Hb) na Mucosa Gástrica de Ratos.....	37
3.13. Análise Estatística	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Efeito Protetor do Sildenafil na Lesão Gástrica Induzida por Álcool em Ratos: Curva Dose-Resposta	39
4.1.1. Avaliação Histopatológica da Mucosa Gástrica de Ratos Tratados com Sildenafil e/ou Álcool	39
4.1.2. Determinação dos Níveis de Glutathione na Mucosa Gástrica de Rat- os Tratados com Sildenafil e/ou Álcool	40

4.1.3. Determinação dos Níveis de Hemoglobina (Hb) na Mucosa Gástrica de Ratos Tratados com Sildenafil e/ou Álcool	40
4.2. Papel do Óxido Nítrico (NO) no Efeito Protetor do Sildenafil na Lesão Gástrica Induzida por Álcool em Ratos	47
4.2.1. Avaliação Histopatológica da Mucosa Gástrica de Ratos Tratados com L-NAME e/ou L-Arginina	47
4.2.2. Determinação dos Níveis de Glutathione na Mucosa Gástrica de Ratos Tratados com L-NAME e/ou L-Arginina	48
4.2.3. Determinação dos Níveis de Hemoglobina (Hb) na Mucosa Gástrica de Ratos Tratados com L-NAME e/ou L-Arginina	48
4.3. Papel do cGMP no Efeito Protetor do Sildenafil na Lesão Gástrica Induzida por Álcool em Ratos	55
4.3.1. Avaliação Histopatológica da Mucosa Gástrica de Ratos Tratados com ODQ Associado ao Sildenafil	55
4.3.2. Determinação dos Níveis de Glutathione na Mucosa Gástrica de Ratos Tratados com ODQ e Sildenafil	56
4.3.3. Determinação dos Níveis de Hemoglobina (Hb) na Mucosa Gástrica de Ratos Tratados com ODQ e Sildenafil	56
4.4. Papel dos Canais de K ATP-Dependentes no Efeito Protetor do Sildenafil na Lesão Gástrica Induzida por Álcool em Ratos.....	63
4.4.1. Avaliação Histopatológica da Mucosa Gástrica de Ratos Tratados com Glibenclamida e/ou Diazóxido	63
4.4.2. Determinação dos Níveis de Glutathione na Mucosa Gástrica de Ratos Tratados com Glibenclamida e/ou Diazóxido	64

4.4.3. Determinação dos Níveis de Hemoglobina (Hb) na Mucosa Gástrica de Ratos Tratados com Glibenclamida e/ou Diazóxido	64
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

I. INTRODUÇÃO

1.0. INTRODUÇÃO:

As doenças do trato gastrointestinal, relacionadas ao consumo excessivo de álcool, possuem um importante papel na gastroenterologia clínica. Entretanto, os mecanismos e a patofisiologia dos efeitos do etanol nos órgãos do trato digestivo não são completamente conhecidos. Modelos de animais representam uma ferramenta importante para se investigar as doenças relacionadas ao álcool porque dão aos pesquisadores a oportunidade de usar métodos que não podem ser usados em seres humanos, tais como a tecnologia nocaute (SIEGMUND et al., 2002). Assim, a lesão gástrica induzida por álcool é frequentemente usada como modelo experimental para selecionar compostos com atividade gastroprotetora.

Pacientes que fazem consumo abusivo de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) ou álcool possuem uma maior predisposição de vir a ter gastrite hemorrágica aguda. Além da terapia endoscópica e cirúrgica, o foco da farmacoterapia atual tem sido o realce de mecanismos de defesa da mucosa para acelerar a cicatrização e cura da doença (CHAMBERLAIN, 1993). Devido a um crescente aumento no consumo de álcool em todas as classes sociais, temos que reconhecer que há uma necessidade enorme de pesquisas que visem à compreensão das doenças ligadas ao uso exagerado de etanol para tentar desenvolver estratégias efetivas para prevenir e tratar os diferentes tipos de doenças do trato gastrointestinal provocadas pelo álcool.

Adicionalmente, um considerável número de perguntas, no campo da pesquisa do álcool, permanecem abertas, entre elas as mais importantes são aquelas sobre a patofisiologia dos danos induzidos pelo etanol na célula, sobre a ação dos constituintes não-alcoólicos de bebidas alcoólicas no trato gastrointestinal ou sobre as grandes diferenças inter-individuais na suscetibilidade às doenças relacionadas ao álcool (SIEGMUND et al., 2002).

É também conhecido que os processos de modulação neuronal, tais como a liberação de mediadores vasoativos, são cruciais para a resistência da mucosa gástrica a agentes agressivos (YONEI et al., 1990). Vários achados têm sugerido que há interações entre mediadores vasodilatadores derivados do endotélio podendo regular a microcirculação e a integridade da mucosa (WHITTLE et al., 1990). As células endoteliais também liberam óxido

nítrico (NO) que medeia o relaxamento vascular induzido por estimulação vagal, causando, em baixas concentrações, proteção contra a injúria celular no endotélio (PALMER et al., 1992).

No trato gastrointestinal o óxido nítrico (NO) é um importante mediador na defesa da mucosa gástrica, embora em algumas circunstâncias promova lesões na mucosa (REFFELMANN & KLONER, 2003). Segundo McNAUGHTON et al., (1989), o NO reduz significativamente a lesão gástrica causada por etanol. O NO é sintetizado a partir de um aminoácido, a L-arginina, pela ação de uma enzima conhecida como NO sintase (NOS). Até o momento, três tipos de NOS foram identificadas: duas isoformas constitutivas, sendo uma endotelial (NOS endotelial, eNOS) e uma neuronal (NOS neuronal, nNOS), que estão envolvidas na liberação de NO em condições normais, e uma NOS induzível que não é expressa constitutivamente, sendo liberada em grandes quantidades nas reações inflamatórias (MONCADA et al., 1991; DING et al., 1988; STUEHR & GRIFFITH, 1992).

O NO é responsável pela modulação de alguns componentes gerais de defesa da mucosa como o fluxo sanguíneo gástrico e secreção de muco (WALLACE & MILLER, 2000). Entretanto, foi demonstrado que o NO produzido pela ação da iNOS está envolvido na lesão gástrica induzida por indometacina (SOUZA et al., 2004) e outras desordens inflamatórias intestinais (WHITTLE et al., 1995). Assim, o desenvolvimento de drogas que aumentam a atividade da cNOS ou a liberação de NO por esta enzima pode ter um importante papel antiinflamatório e de defesa da mucosa contra injúrias diversas.

O sildenafil é um potente inibidor da fosfodiesterase específica para o GMPc (PDE5) capaz de inibir a degradação do GMPc, potencializando, assim, o efeito do óxido nítrico. Essa atividade do sildenafil faz dele uma droga relaxante do músculo liso. A aplicação inicial e mais difundida do sildenafil está relacionada ao aparelho reprodutor na correção da disfunção erétil (CHUANG et al., 1998). Diversos autores vêm trabalhando com outras possíveis utilidades do sildenafil na terapêutica de doenças, como na hipertensão pulmonar (SASTRY et al, 2004), fissura anal (TORRABADELLA et al., 2004), cólon irritável (FRITZ et al., 2003), entre outros.

Mais recentemente, foi demonstrado que o sildenafil protege a mucosa gástrica contra a lesão induzida por indometacina. Esse efeito é mediado por aumento da atividade do sistema L-Arginina/ NO/ GMPc. O acréscimo na disponibilidade de GMPc é responsável ainda por outros efeitos do sildenafil, como a inibição da ativação e adesão de neutrófilos e o aumento do fluxo sanguíneo gástrico. Outro achado importante consiste no fato do sildenafil proteger contra a lesão gástrica induzida por indometacina sem, no entanto, interferir na sua ação antiinflamatória sistêmica. Esses resultados nos levam a acreditar que o sildenafil seja capaz de modular outros processos fisiológicos ou patológicos mediados por óxido nítrico (SANTOS et al, 2004). No presente estudo, pretendemos estudar as hipóteses de que o sildenafil pode aumentar a defesa da mucosa gástrica contra os danos causados pelo álcool, pois as ações bioquímicas e farmacológicas desse fármaco ainda são pouco conhecidas.

1.1. ÁLCOOL E A LESÃO GÁSTRICA

Pacientes com doenças relacionadas ao álcool possui um importante papel na medicina clínica, onde aproximadamente 29% dos homens e 9% das mulheres são hospitalizados devido a doenças relacionadas ao álcool, afetando os órgãos internos (GERKE et al, 1997). Segundo pesquisas da Organização Mundial de Saúde (OMS), o álcool é o quinto fator de risco mais importante, contribuindo para o desenvolvimento de muitas doenças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002), como está evidenciado por diversos autores, mostrando que o consumo excessivo de álcool aumenta a mortalidade por doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão (ROSENKRANZ, 2003; PREEDY & RICHARDSON, 1994; KAPLAN, 1995).

O álcool é a causa mais comum de ulceração gástrica em homens. É conhecido como uma substância necrosante que causa injúria na mucosa gástrica, e a ingestão excessiva de etanol pode resultar em gastrite, caracterizada por edema na mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (GUSLANDI, 1987). O etanol absoluto rapidamente promove a formação de bolhas enantemáticas na mucosa gástrica, sendo devido a uma reação inflamatória aguda que provoca como característica comum, um aumento na permeabilidade vascular (SZABO et al., 1985). Essa substância é conhecida como

uma toxina entérica, afetando a estrutura e função de vários elementos do trato gastrointestinal além de causar efeitos no sistema nervoso central.

O etanol promove rapidamente a formação de úlceras no estômago, que é devido essencialmente a uma reação inflamatória (SZABO, 1985). Contudo o consumo crônico de etanol parece não estar relacionado ao desenvolvimento de câncer gástrico em humanos (SIEGMUND et al, 2002). No esôfago, o consumo de álcool está relacionado à gênese de diversas doenças no homem como disfunções motoras, refluxo gastro-esofágico e câncer de esôfago (SIEGMUND et al, 2002). No intestino o efeito do álcool sobre a musculatura e a absorção de nutrientes contribui para a diarreia que é frequentemente observada em alcoólicos. Esses efeitos no intestino são, provavelmente, devidos a uma estase microvascular, aumento do fluido transcapilar, perda de proteínas, edema epitelial e ruptura das junções intra-epiteliais (BECK et al, 1986), além de haver estresse oxidativo induzido por leucócitos, e influências negativas na retomada de nutrientes, água e eletrólitos, contribuindo para uma má nutrição que é frequentemente observada no alcoolismo crônico (DINDA et al, 1996; BODE, 1980). Também foi relatado que a maioria dos pacientes com pancreatite crônica apresenta um histórico de consumo excessivo de álcool. Embora os mecanismos patofisiológicos desse último efeito permaneçam desconhecidos, foi verificado que o álcool promove uma grande redução do fluxo sanguíneo pancreático (PITCHUMONI, 2001). O etanol também afeta seriamente o sistema nervoso central (SNC), envolvendo diversos tipos celulares e sistemas de sinalização (CHARNESS et al., 1989). Muitos receptores parecem estar envolvidos nos efeitos agudos do álcool no SNC, entre eles os receptores do ácido γ -aminobutírico do tipo A (GABA_A), da serotonina-3 (5-HT₃) e do *N*-metil-D-aspartato (NMDA). Adicionalmente, muitos efeitos diretos e indiretos do etanol no SNC podem também ser mediados por moléculas sinalizadoras como as proteínas quinases (PKA e PKC) e fosfatases (MORROW et al., 2004).

No estômago o álcool interfere na secreção de ácido gástrico, um efeito possivelmente mediado pela histamina e gastrina. A barreira da mucosa é a principal proteção da mucosa gástrica contra o ácido gástrico e o etanol em altas concentrações aumenta a permeabilidade epitelial como consequência de mudanças no potencial celular, causando re-difusão de íons H⁺ (DAVENPORT, 1967; DAVENPORT, 1969). Nesse órgão também causa depleção dos grupos sulfidrilas, que são necessários para estabilização das membranas celulares, bem como

na eliminação de radicais livres. Ainda no estômago, o etanol influencia a atividade da musculatura e reduz o fluxo sanguíneo, provocando estase gástrica, congestão capilar e aumento da permeabilidade vascular, aumentando os riscos de hemorragias e ulcerações, associados às injúrias macroscópicas e histológicas na mucosa (BODE & BODE, 2001; MACMATH, 1990; SANTOS & RAO, 2001). A congestão capilar é quase sempre acompanhada de estase circulatória que não está associada somente com a constrição de vênulas na submucosa, mas também com a dilatação de arteríolas na submucosa (BOU-ABBOUD et al, 1988; OATES & HAKKINEN, 1988).

Como conseqüência dos danos aos microvasos, o álcool promove a liberação de mediadores inflamatórios e vasoconstrição de artérias na submucosa, podendo resultar em isquemia, além de promover também, a liberação de endotelina e degranulação de mastócitos. Eventualmente, esses eventos podem levar a formação de mais necrose na mucosa. Alguns produtos do metabolismo do ácido araquidônico têm sido implicados na patogênese da injúria gástrica causada por etanol (PESKAR et al, 1986; SAMONINA et al., 2004). Patofisiologicamente, as lesões na mucosa provocadas pelo álcool podem ser mediadas ou moduladas, diretamente ou indiretamente, por várias moléculas celulares, tais como as ciclooxigenases (COX), lipoxigenases, diversas citocinas, citocromo P450 2E1, tromboxanos e radicais livres derivados do oxigênio (TARNAWSKI et al, 1988; ROBERT et al, 1979). Foi verificado que o álcool causa uma aderência, dose-dependente, de neutrófilos com conseqüente dano celular no epitélio gástrico. Contudo, em concentrações extremamente altas, o etanol provoca lesões na mucosa gástrica independente de neutrófilos. Este último efeito deve-se a lesões nos microvasos e diminuição do fluxo sanguíneo gástrico (KVIETYS et al, 1990; SZABO et al, 1985).

O etanol também causa depleção de muco, possivelmente por mobilizar os mucopolissacarídeos da mucosa para o lúmen, reduzindo a capacidade secretória de muco do estômago, contribuindo assim, para a formação de úlceras (CHO et al., 1983.; ISHIHARA et al., 1988). A liberação de muco em resposta a aplicação de agentes irritantes possui um papel importante no reparo do epitélio e no processo de restituição. Alguns autores demonstraram que o óxido nítrico e as prostaglandinas são capazes de aumentar a secreção de muco no estômago (ROWN et al., 1992).

Com base nos conhecimentos produzidos, SIEGMUND et al (2002) propôs um esquema para representar os efeitos agudos e crônicos do etanol na mucosa gástrica (figura 1).

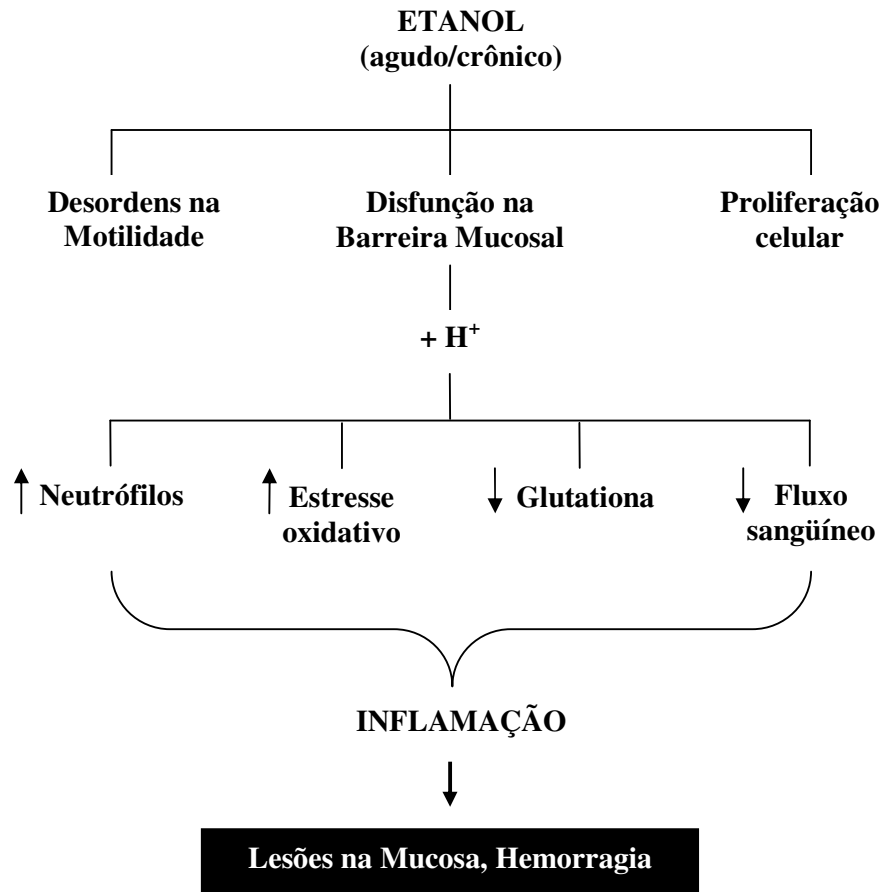


Figura 1: Esquema representativo dos efeitos do consumo agudo e crônico de etanol no estômago (SIEGMUND et al., 2002).

O etanol também atua como um agente pró-inflamatório, ativando diversos fatores de transcrição e causando indução do mRNA da COX-2 e indução da iNOS (figura 2). A COX é uma enzima chave na biosíntese das prostaglandinas. A isoforma constitutiva da COX (COX-1) é responsável pela manutenção da proteção gastrointestinal, enquanto a isoforma induzível (COX-2) é considerada um mediador dos processos inflamatórios. A COX-2 produz diversas

prostaglandinas derivadas do ácido araquidônico, possuindo um papel crucial na mediação de diversas respostas patofisiológicas (LEE et al, 2005). Segundo LEE et al (2005) o etanol promove a ativação dos dois maiores fatores de transcrição das células eucarióticas, ou seja, do AP-1 e NF- κ B, que induzem a formação de COX-2. Além disso, o álcool causa fosforilação da MAPK p38, que está relacionada a mudanças na transcrição de genes relacionados à inflamação (figura 2). Outros investigadores demonstraram que ERK 1/2, Egr-1, COX-2 e caspase-3 estão envolvidas nas lesões gástricas provocadas pelo álcool. Similarmente, o ERK 1/2 e Egr-1 contribuem para aumentar a produção de TNF- α depois do consumo crônico de etanol (WU & CEDERBAUM, 2003; KISHORE et al, 2002; SIMONYI et al, 2002; NANJI et al, 2003). Ao contrário do que se imaginava, a 16,16 – dimetilprostaglandina E₂ (PGE₂) não protege a superfície das células mucosas da injúria provocada por etanol, mas previne das lesões necróticas. Estudos histológicos mostraram que a PGE₂ possui efeitos citoprotetores contra o etanol, especialmente nas células parietais. (LACY & ITO, 1982; SCHMIDT & MILLER, 1988; GUTH et al., 1984).

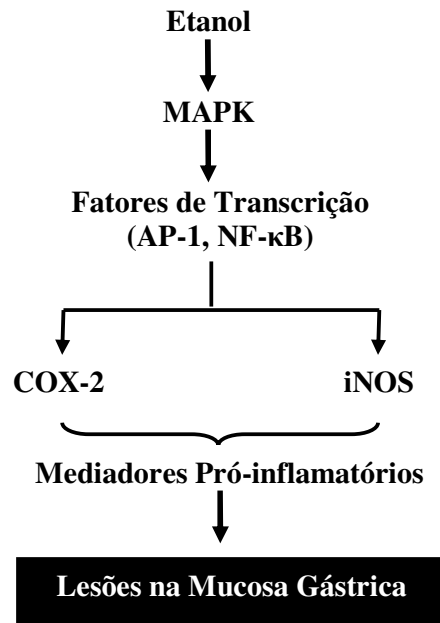


Figura 2: Esquema ilustrativo dos mecanismos moleculares propostos pelo qual o etanol provoca inflamação e lesão na mucosa gástrica (LEE et al., 2005).

O consumo crônico *ad libitum* de etanol apresenta uma significativa hipertrofia da mucosa gástrica. Esta hipertrofia pode ser devido a uma super-expressão de fatores de crescimento epidérmico (EGF) e fatores de crescimento tumoral (TGF- α), como reação a presença de radicais livres do oxigênio e peroxidação de lipídios (TARNAWSKI et al, 1992). Entretanto, a hipertrofia epitelial gástrica observada em ratos parece ser irrelevante para as condições humanas, uma vez que o consumo crônico de álcool em humanos não está relacionado ao aumento do risco de câncer gástrico (SIEGMUND et al, 2002).

A biodisponibilidade do álcool consumido oralmente é incompleta, uma vez que os níveis de álcool no sangue são menores. Esse primeiro passo do metabolismo do álcool possui grande importância prática, visto que, os fatores que impedem esse metabolismo no estômago aumentam a concentração de etanol na circulação sistêmica. Um grande número de estudos tem evidenciado que a mucosa gástrica contribui substancialmente para esse primeiro passo do metabolismo do álcool (CABALLERIA et al., 1987; CABALLERIA et al., 1989; LIM et al., 1993). Uma fração significativa do etanol ingerido é metabolizado na mucosa gástrica, que contém uma álcool-dehidrogenase (ADH, EC 1.1.1.1). Em mamíferos, a álcool-dehidrogenase compreende uma grande família de enzimas divididas em seis classes de acordo com a estrutura e função. As enzimas de classe IV são extra-hepáticas, sendo encontradas principalmente na mucosa gástrica, sendo responsáveis pela metabolização do etanol no estômago (ESTONIUS et al., 1996). Portanto, a fração de álcool ingerido que chega ao fígado é maior quando administrada intravenosamente do que por via oral (BATTISTON et al, 1996).

Foi demonstrado que o álcool em baixas doses (20%) provoca citoproteção adaptativa, com participação dos componentes do sistema nervoso autônomo, reduzindo o dano macroscópico provocado por doses mais altas de etanol no estômago, mas não havendo melhora microscópica (KO & CHO, 1998).

1.2. ÓXIDO NÍTRICO E A PROTEÇÃO GÁSTRICA

Recentemente a descoberta do radical monóxido gasoso de nitrogênio, o óxido nítrico (NO), tem chamado a atenção pela sua participação na sinalização de inúmeros processos fisiológicos e patológicos. O NO é um gás de radical livre e não carregado, participando em inúmeros processos fisiológicos como relaxamento do músculo liso e vasodilatação, neurotransmissão, agregação plaquetária, regulação dos mecanismos pró e anti-apoptóticos, controle da pressão arterial, fluxo sanguíneo regional (RADOMSKI & MONCADA, 1993; KIM et al., 2001), inibição de outros neurotransmissores NANC (BOECKXSTAENS & PELCKMANSI, 1997), mecanismos de defesa do hospedeiro, regulação da expressão de alguns genes e função mitocondrial (LAMAS et al., 1998). Além disso, a produção excessiva ou ação inadequada de NO pode estar envolvida na patologia de várias doenças como disfunção erétil, estenose pilórica hipertrófica, hipercolesterolemia e diabetes mellitus (RANG et al., 2003), além de ter participação em diversas doenças inflamatórias como artrite, miocardite, colites, nefrites e outras condições patológicas como o câncer e doenças neurodegenerativas.

A descoberta do NO como um agente de sinalização celular foi um dos mais importantes acontecimentos na fisiologia humana dos anos 80-90. Os primeiros estudos das ações biológicas do óxido nítrico começaram com as observações de que o NO, gerado de uma solução de nitrito acidificada, ativava preparações solúveis da guanilato ciclase (ARNOLD et al., 1977). Foi sugerido também que os efeitos de vários agentes contendo nitrogênio, tais como a nitroglicerina, substância bastante usada no século 19 no tratamento da angina de peito, eram devidos ao NO (MURAD et al., 1978). Logo depois disso, foi mostrado que o NO provocava relaxamento e que este efeito estava associado com a ativação da guanilato ciclase (GRUETTER et al., 1979). O NO foi descoberto, definitivamente, na vasculatura, quando foi constatado que o relaxamento vascular induzido por acetilcolina era devido a um fator, mais tarde conhecido como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Alguns anos mais tarde, em 1987, foi demonstrado que esse fator de relaxamento derivado do endotélio era um gás, o óxido nítrico. Palmer e colaboradores sugeriram que o EDRF e o óxido nítrico eram equivalentes na atividade biológica, estabilidade química e suscetibilidade a inibidores e potencializadores

como a hemoglobina e a superóxido dismutase, respectivamente (PALMER et al., 1987). Nesse mesmo ano, foi demonstrado que as células endoteliais produzem NO a partir da L-arginina (KUO & SCHROEDER, 1995).

O NO endógeno é sintetizado a partir de um átomo de nitrogênio terminal da L-arginina pela ação da enzima NO sintase (NOS, EC 1.1413.399) (Figura 3). O NO, com um elétron desemparelhado é, por definição, um radical livre sendo por isso uma molécula altamente reativa (MARLETTA, 1993; BUTTLER et al., 1995). Assim, o NO pode ser um agente oxidante ou redutor dependendo do meio em que ele está e é rapidamente destruído pelo oxigênio, sendo que sua oxidação produz nitrito e nitrato (KIECHLE & MALINSKI, 1993). Há anos se conhece que essa molécula forma várias espécies reativas do nitrogênio (RNOS) na presença de oxigênio que pode ser deletério para os sistemas biológicos. Os intermediários da reação NO/O_2 podem oxidar substratos importantes podendo levar a alterações nas macromoléculas como as enzimas e o DNA (WINK et al., 1995). Além dessas espécies reativas formadas pela auto-oxidação, o NO reage com radicais reativos derivados do oxigênio, o superóxido (HUIE & PALMAJA, 1993), formando um potente agente oxidante, o peroxinitrito, que pode modificar quimicamente muitas moléculas biológicas importantes (BECKMAN et al., 1993). Ao contrário dos efeitos deletérios formados pelo NO/O_2 ou NO/O_2^- , o NO também possui propriedades antioxidantes. Kanner e colaboradores mostraram que o NO previne a destruição das hemoproteínas pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KANNER et al., 1991). Diversos estudos também sugerem que o NO, em baixas concentrações, pode atuar como um antioxidante nas reações de peroxidação de lipídios podendo ter um papel protetor em doenças como a aterosclerose (HOGG et al., 1993). Além disso, o NO em baixos níveis (< 3 mg/Kg) pode proteger as células contra os efeitos deletérios do peróxido e dos radicais ROS (WINK et al., 1995).

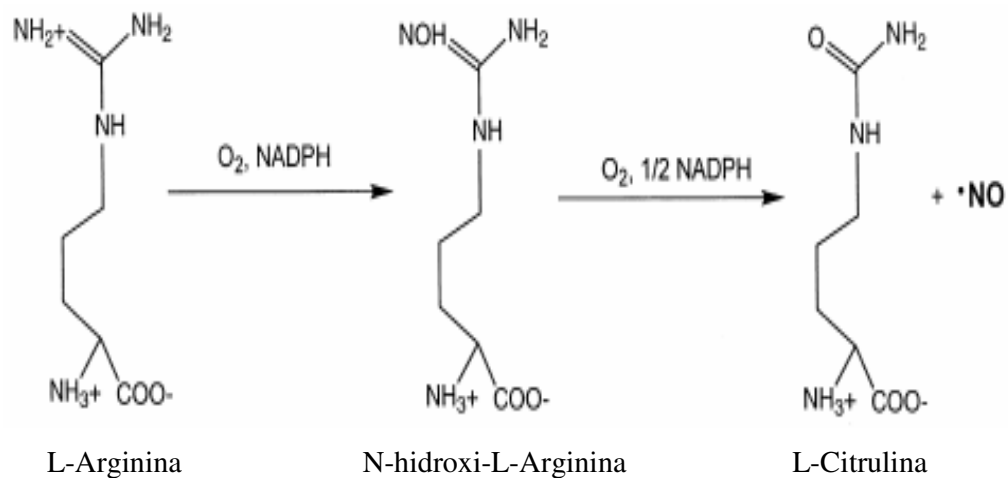


Figura 3: Oxidação da L-arginina para L-citrulina pela ação das enzimas oxido nítrico sintases (EISERICH et al., 1998).

Nas células do endotélio vascular, na presença do oxigênio molecular, as enzimas NOS catalisam a oxidação de cinco elétrons da L-arginina (L-ARG) produzindo o radical livre gasoso, NO, e L-citrulina (MARLETTA, 1993; BUTTLER et al., 1995; KUO & SCHROEDER, 1995). A combinação dos mecanismos e técnicas de biologia molecular revelou que a forma ativa da NOS é um dímero contendo flavina (FAD, FMN), heme, NADPH e tetrahydrobiopterina como grupos prostéticos (MARLETTA, 1993). O NO tem alta afinidade com o grupo heme encontrado em proteínas intracelulares como, por exemplo, a óxido nítrico sintase, a ciclooxigenase e a guanilato ciclase. Também é capaz de se ligar a grupos-SH, formando tior (nitosotior) (PALMER et al., 1988; DAVIES et al., 1995). Estudos recentes suportam a hipótese que as NOS convertem L-ARG em NO através de fases consecutivas (KERWIN & HELLER, 1994; OLKEN & MARLETTA, 1993).

Atualmente, existem três isoformas conhecidas das enzimas NO sintases (NOS): uma forma induzível (iNOS ou NOS-II) e duas formas constitutivamente expressas, sendo denominadas de NOS endotelial (eNOS ou NOS-III) e NOS neuronal (nNOS ou NOS I) (MONCADA et al., 1991; PFEILSCHIFTER et al., 2001). A expressão da iNOS nas células de mamíferos é governada, predominantemente, pelo fator de transcrição NF-κB que regula a expressão de muitos mediadores inflamatórios (JANSSEN-HEININGER et al., 2000). Essa

expressão é o resultado de uma resposta inflamatória localizada ou difusa resultante de uma infecção ou dano tecidual. A iNOS produz uma quantidade de NO aproximadamente 10.000 vezes maior do que as isoformas constitutivas e sua regulação independe do cálcio intracelular. Ela pode ser expressa por vários tipos celulares incluindo macrófagos e células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos, como microrganismos invasores (MONCADA et al., 1991; RANG et al., 2003). A iNOS é induzida principalmente por estímulos pró-inflamatórios, incluindo o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β e interferon- γ atuando principalmente nos processos de eliminação de patógenos, contribuindo para a resposta imune contra a invasão de microrganismos e células tumorais. Porém, a produção em excesso de NO está associado com várias doenças, como o choque séptico, inflamação crônica e aguda, doenças auto-imunes e aterosclerose. A indução da iNOS pode ser suprimida pela interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13) e por glicocorticóides, que inibem a indução, mas não a atividade das enzimas já induzidas (DAVIES et al., 1995; FORSTERMANN et al., 1994; RANG et al., 2003). O NO derivado da iNOS parece contribuir para a patofisiologia das doenças inflamatórias de modo geral (EISERICH et al., 1998; PFEILSCHIFTER et al., 2001). Assim, onde a resposta inflamatória é parte de uma resposta adaptativa (infecção ou sepse), a expressão de iNOS é benéfica; quando a expressão da iNOS é parte da inflamação anormal (não adaptativa), a expressão de iNOS pode ser nociva (doença auto-imune) (DAVIES et al., 1995).

Sobre condições fisiológicas as células produzem apenas pequenas quantidades de NO, e essa produção depende das enzimas constitutivas (eNOS e nNOS), indicando que o NO atua diretamente no controle de diversas respostas celulares. A isoforma III ou óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é uma proteína de 153 kDa associada a frações sub-celulares possuindo sua atividade basal inibida por inibidores da NO sintase, como o N^G-nitro-L-arginina-metilester (L-NAME) e N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA). É encontrada, além do endotélio, nos miócitos cardíacos, nas células mesangiais renais, nos osteoclastos e osteoblastos e nas plaquetas (RANG et al., 2003; FLEMING & BUSSE, 1999). A eNOS produz NO em resposta a mobilização do cálcio para manutenção da homeostase vascular normal, incluindo regulação da pressão sanguínea e prevenção da adesão e ativação de plaquetas e leucócitos. A isoforma I ou óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) está presente principalmente em neurônios, mas também pode ser expressa no rim, no músculo esquelético,

no órgão sexual masculino, no pâncreas e epitélio do pulmão, estômago e útero. O óxido nítrico produzido pela ação da nNOS possui função de neurotransmissão, mas também pode ser utilizado para regulação do tônus muscular do trato gastrintestinal e músculo esquelético. A atividade de todas as isoformas constitutivas depende do cálcio intracelular, sendo controlada pela cálcio-calmodulina intracelular (EISERICH et al., 1998; FORSTERMANN et al., 1994).

O NO possui importantes funções no sistema nervoso central (SNC) incluindo a modificação na percepção de dor, mediação em longo prazo da memória, controle do fluxo sanguíneo cerebral e neurodegeneração, além de atuar como um neurotransmissor no relaxamento do músculo liso (LIPTON et al., 1993; BLACK et al., 1994; SANTILLA N et al., 1999). Entretanto, ao contrário dos neurotransmissores clássicos, o NO não é armazenado, não atua em receptores extracelulares e não é somente liberado dos terminais nervosos, mas também dos axônios, o que sugere uma liberação não vesicular (LAMAS et al., 1998).

No estômago o NO possui um importante papel na prevenção e reparo de injúrias no trato gastrintestinal (TGI), participando no controle da produção de muco e secreção de bicarbonato no TGI, na regulação do fluxo sanguíneo capilar da parede gastrintestinal, além de atuar como agente citoprotetor, antiinflamatório e como complemento aos efeitos protetores das prostaglandinas no estômago (MUSCARA & WALLACE, 1999; WALLACE & GRANJIER, 1996). MASUDA e colaboradores também verificaram que o NO reduz efetivamente a injúria na mucosa gástrica provocada por agentes químicos, como o etanol, além de facilitar a cicatrização do tecido lesado (MASUDA et al, 1995). WALLACE também propôs que o NO seria um importante mediador na defesa da mucosa gástrica, mas paradoxalmente, em várias situações, poderia contribuir para a lesão da mucosa. A presença de NO em baixas concentrações está associada aos efeitos benéficos no TGI, enquanto o NO em altas concentrações pode induzir a formação de radicais derivados do nitrogênio, que são tóxicos para várias linhagens celulares (WALLACE & MILLER et al., 2000).

1.3. SILDENAFIL (VIAGRA[®]), cGMP E A PROTEÇÃO GÁSTRICA

Em condições fisiológicas normais, o óxido nítrico liberado pelos nervos não-adrenérgicos e não-colinérgicos (NANC) ou o NO liberado do endotélio se liga a um componente heme da guanilato ciclase solúvel, ativando-a. Essa enzima induz a síntese de um mensageiro intracelular, a guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) (MORELAND et al., 1999).

O GMPc foi descoberto na urina, não muito tempo após a descoberta do AMPc (ASHMAN et al., 1963). Depois, foi verificado que ele estava presente em todas as células de mamíferos (HARDMAN & SUTHERLAND, 1969) e hoje sabe-se que ele é sintetizado por uma família de enzimas conhecidas como guanilato ciclases, sendo um segundo mensageiro que regula muitos eventos de sinalização celular (KRUMENACKER et al., 2004).

A sinalização via GMPc possui três mecanismos efetores principais nas células eucarióticas, que são os canais iônicos, as fosfodiesterases (PDEs) e as proteínas quinases (LUCAS et al., 2000). A ligação do GMPc a proteínas quinases GMPc-dependentes (PKGs) ou a canais de íons GMPc-dependentes resultam em redução do cálcio intracelular, devido ao sequestro do Ca^{2+} e ativação de fosfatases de miosina de cadeia leve, causando diminuição da contratilidade da musculatura lisa, com conseqüente relaxamento (LEE et al., 1997; CHUANG et al., 1998). Assim, agentes vasoativos, incluindo o NO, o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), a prostaglandina E1 (PGE_1), inibidores de fosfodiesterases e antagonistas dos receptores α -adrenérgicos iniciam ou provocam relaxamento do músculo liso (CHUANG et al., 1998; PROST, 1996). Cada um destes agentes afetam a contratilidade do músculo liso via um mecanismo distinto e específico que, recentemente, parece ser devido a mudanças no cálcio intracelular e a modulação de quinases de miosina de cadeia leve (MLCKs) e fosfatases de miosina de cadeia leve (MLCPs). Estas enzimas rapidamente alteram o estado de fosforilação da miosina, resultando em contração ou relaxamento do músculo liso (CHUANG et al., 1998; REMBOLD, 1991; STIEF et al., 1997).

As concentrações intracelulares de GMPc são reguladas pela ação da guanilato ciclase e as fosfodiesterases específicas para o GMPc. A guanilato ciclase solúvel, quando

ativada por NO, catalisa a formação do GMPc a partir do GTP, enquanto as fosfodiesterases cGMP-específicas catalisam a hidrólise do GMPc a GMP (BEAVO, 1995; POLSON & STRADA, 1996; PYNE et al., 1996). Existem 2 classes de enzimas guanilato ciclases (GCs), ambas capazes de formar GMPc a partir do GTP intracelular: a primeira é chamada de guanilato ciclase particular (pGC) que são moléculas receptoras ligadas particularmente a membrana, possuindo um domínio de ligação do ligante extracelular, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático; a segunda forma da GC é chamada de guanilato ciclase solúvel (sGC) expressa praticamente em todos os tipos celulares, sendo uma enzimas citosólica contendo um grupo heme que medeia sua ativação pelo óxido nítrico. A produção de GMPc pela sGC é o mecanismo pelo qual o NO produz muitos dos seus efeitos fisiológicos como molécula sinalizadora (KRUMENACKER et al., 2004; LUCAS et al., 2000; BEHRENDTS et al., 2000). Essa última enzima consiste em duas subunidades (α e β) com diferentes variantes. Cada subunidade possui três domínios comuns, que são responsáveis pela sua estrutura e função: o primeiro é o domínio N-terminal heme-ligante, o segundo é o domínio de dimerização e o terceiro é o domínio catalítico C-terminal. O domínio catalítico é a região mais conservada entre os três domínios, e é responsável pela conversão do GTP em GMPc (KOESLING, 1999).

As fosfodiesterases catalisam a hidrólise do AMPc e GMPc, que são responsáveis por ativação da via de sinalização que leva ao relaxamento do músculo liso. Até o momento, 11 isoenzimas de fosfodiesterases foram identificadas e caracterizadas, todas relacionadas estruturalmente e funcionalmente e cada uma possuindo especificidades diferentes para o AMPc ou GMPc. Destas isoenzimas, as fosfodiesterases dos tipos 5, 6 e 9 são específicas para o GMPc (BEAVO, 1995; FISCHER et al., 1998; POLSON & STRADA, 1996; SONDERLING et al., 1998; KUTHE et al., 2000 e 2001; FAWCETT et al., 2000).

A fosfodiesterase do tipo 6 é expressa somente na retina (BEAVO, 1995). A fosfodiesterase do tipo 9 foi recentemente clonada e é expressa em grandes quantidades no rim e baço, mas pode ser encontrada no fígado, pulmão, intestino delgado e cérebro (FISCHER et al., 1998; SONDERLING et al., 1998). A análise cinética das fosfodiesterases revelaram que elas requerem uma alta concentração de substrato para sua atividade, sugerindo que essas isoenzimas podem não regular fisiologicamente os níveis de GMPc intracelular quando presente em baixas concentrações (FRANCIS et al., 1980; MORELAND et al., 1998).

Contudo, a PDE do tipo 5 (PDE5) hidrolisa o GMPc a baixas concentrações de substratos e representa a principal atividade hidrolítica do GMPc nos corpos cavernosos de humanos (MORELAND et al., 1998). Então, o fato de diferentes tecidos expressarem isoenzimas específicas de PDE, a regulação da terminação de sinais é dependente do tipo de tecido, resposta celular e metabolismo do nucleotídeo cíclico (BEAVO, 1995; PYNE et al., 1996; POLSON & STRADA, 1996).

A PDE5 foi primeiro identificada como a principal proteína de ligação ao GMPc no pulmão de bovinos (FRANCIS et al., 1980) e depois foi caracterizada como um ligante de GMPc. A PDE pulmonar bovina do tipo 5 é expressa como um mRNA de 6-9 Kb, composta de 875 aminoácidos e forma um homodímero com subunidades de 99,5 KDa (McALLISTER-LUCAS, 1993). A PDE5 foi recentemente clonada e é expressa numa grande variedade de tecidos. A PDE5 humana possui 95% de semelhança com a PDE5 bovina, sendo composta de 875 aminoácidos e com uma massa molecular de 100 KDa (STACEY et al., 1998).

A PDE5 contém 2 átomos de zinco por monômero que se liga com alta afinidade e são necessários para a sua atividade catalítica (FRANCIS et al., 1994). Cada subunidade contém um sítio alostérico para ligação do GMPc e a ocupação destes sítios é necessária para a fosforilação da PDE5 (TURKO et al., 1998).

Foi identificada a expressão da PDE5 na traquéia, no músculo liso pulmonar e vascular (BEAVO, 1995), bem como nas plaquetas (BALLARD et al., 1998). Contudo, a distribuição da PDE5 não está bem caracterizada, mas tem sido relatada sua ocorrência nos corpos cavernosos, na bexiga, no útero, na próstata, no cólon, no pâncreas, no estômago (STACEY et al., 1998), no pulmão (SANCHEZ et al., 1998) e nas células de Purkinje durante o desenvolvimento neuronal (KOTERA, 1997).

A inibição da atividade da PDE5 aumenta os níveis intracelulares de GMPc em resposta ao estímulo que ativa a via NO-GMPc, provocando relaxamento do músculo liso (ROBERT et al., 1999). Assim, administração aguda ou crônica de inibidores da PDE5 tais como o sildenafil (viagra®), o tadalafil (cialis®) e o vardenafil (levitra®), podem melhorar a função vascular e endotelial por aumentar os níveis de GMPc endotelial gerados pela ativação endotelial de NO que modula o tônus vascular e facilita a vasodilatação durante o estresse

(HALCOX et al., 2002; MONTORSI et al., 2006). Portanto, a inibição da PDE5 é um alvo potencial para a farmacoterapia de inúmeras condições patológicas.

O sildenafil (1-[4-ethoxy-3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1-H-pyrazolo [3,4-d]pyrimidin-5-yl) phenyl sulfonyl]-4-methylpiperazine) é um inibidor seletivo e reversível da PDE5, tendo sido aprovado como um agente oral no tratamento da disfunção erétil em homens (figura 3) (GOLDSTEIN et al., 1998; BALLARD et al., 1998; BURNETT, 1997). Ele exibe alta afinidade pela PDE5 e PDE6 com uma constante de inibição (K_i) de ~3-5 e 33 nM, respectivamente. Isso sugere que o sildenafil aumenta a atividade do NO, mediando o relaxamento (BALLARD et al., 1998). A inibição da PDE5 pelo sildenafil correlaciona-se com o aumento na concentração intracelular de GMPc e diminuição da fosforilação da miosina de cadeia leve, causando amplificação da via de sinalização endógena do NO-cGMP (CHUANG et al., 1998).

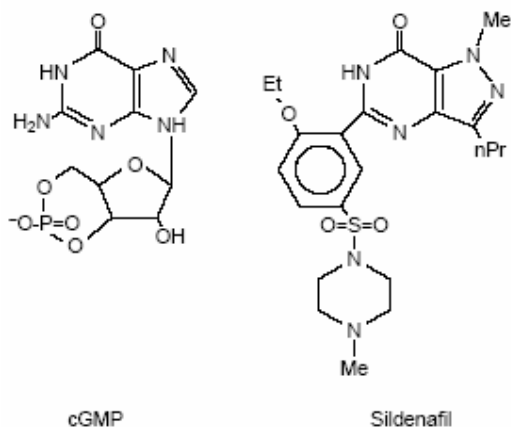


Figura 4: Estrutura química do GMPc e do sildenafil, um inibidor específico da fosfodiesterase 5.

Depois da administração oral de sildenafil, ele é rapidamente absorvido e a sua concentração plasmática máxima é atingida dentro de 60-120 minutos (BOOLELL, 1996), com uma biodisponibilidade de 40%, onde, aproximadamente, 96% do sildenafil e seus

metabólitos se ligam, reversivelmente, as proteínas plasmáticas. Essa ligação reversível do sildenafil determina uma atividade livre para dentro do músculo liso e inibição da enzima alvo. O sildenafil é metabolizado no fígado por enzimas do citocromo P450 (CYP 3A4, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6), sendo convertido a metabólitos ativos. Sua meia-vida é em torno de 4 horas (BOOLELL, 1996; COOPER et al., 1997; WARRINGTON et al., 2000).

O impacto do citrato do sildenafil na prática médica e na sociedade tem sido grande, devido a o grande número de prescrições. Essa droga foi aprovada em março de 1998 pelo US Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da disfunção erétil, atingindo a marca de 10 milhões de prescrições em mais de 5 milhões de homens (BOYCE & UMLAND, 2001).

Recentes estudo mostraram que há uma significativa expressão do mRNA da PDE5 em vários tecidos, tais como o pulmão, pâncreas, cólon, estômago, rim, bexiga e próstata (STACEY et al., 1998), indicando que o sildenafil pode ter ação em diversos órgãos. O sildenafil é uma droga usada no tratamento da impotência. No trato gastrintestinal, foi verificado que o sildenafil modifica a mobilidade gastrintestinal em humanos (BORTOLOTTI et al., 2001) e animais (ROSALMEIDA et al., 2003). Também foi relatado que o sildenafil, atuando via NO, protege a mucosa gástrica contra a indometacina, um AINE que provoca gastropatia e ulcerações no estômago. Esse efeito gastroprotetor do sildenafil pode ser devido, em parte, a uma redução da adesão de leucócitos nas vênulas mesentéricas pós-capilares e manutenção do fluxo sanguíneo gástrico (SANTOS et al., 2005). Outros autores também mostraram que as drogas que aumentam a liberação de NO-constitutivo protegem a mucosa gástrica contra os AINEs, além de aumentar a cicatrização da úlcera induzida por esses fármacos (CALATAYUD et al., 1999; ELLIOTT et al., 1995).

Foi relatado que o uso do sildenafil está associado a alguns efeitos adversos como dor de cabeça, rubor, dispepsia, rinite, congestão nasal, diarreia e distúrbios visuais (GOLDSTEIN et al., 1998; MORALES et al., 1998). Contudo o tratamento com sildenafil ainda não foi examinado em pacientes com úlcera péptica ou consumo abusivo de álcool. O distúrbio visual em pacientes que fazem uso do sildenafil deve-se a inibição da PDE6 na retina, isso porque aumentos na concentração de GMPc está associado com apoptose na retina (FOX et al., 1997).

O sildenafil possui interações farmacodinâmicas e farmacocinéticas importantes. As interações farmacodinâmicas são possíveis entre o sildenafil e agentes que alteram a vasoconstrição ou a vasodilatação. As interações farmacocinéticas são principalmente relacionadas aos efeitos sobre o sistema CYP3A4, que também metabolizam o sildenafil. Algumas drogas como os antagonistas dos canais de cálcio interagem com o sildenafil por ambos os mecanismos (BOYCE & UMLAND, 2001). Com exceção dos nitratos, na qual o uso de sildenafil pode aumentar o risco de infarto do miocárdio, não há contra-indicações para o uso do sildenafil junto com outros medicamentos cardiovasculares (PADMA-NATHAN et al., 2002).

1.4. MECANISMOS DE PROTEÇÃO GÁSTRICA E GLUTATIONA (GSH)

Em condições fisiológicas, existe no estômago um balanço entre os fatores agressores (HCl, pepsina, bile e enzimas pancreáticas) e os mecanismos gastroprotetores (muco-bicarbonato, prostaglandinas e glutatona). Esses mecanismos podem ser classificados, pelo local de ação, em mecanismos de proteção pré-epitelial, epitelial ou subepitelial. A proteção pré-epitelial é realizada pela barreira muco-bicarbonato, que cria um gradiente de pH necessário para manter neutra a superfície das células epiteliais contra a acidez gástrica. A proteção epitelial é dada pelos surfactantes (fosfolípidios anfóteros) que aumentam a hidrofobicidade das membranas biológicas, tornando-as resistentes aos agentes hidrofílicos agressores, tais como a aspirina. Juntamente com os surfactantes, os compostos sulfidrílicos não-protéicos (NH-SH, glutatona) constituem fatores importantes da proteção epitelial contra radicais livres. A proteção subepitelial é dada pelo fluxo sanguíneo que suplementa nutrientes e oxigênio, além de remover íons hidrogênio e outros agentes nocivos. Recentemente, evidências experimentais têm enfatizado o papel do fluxo sanguíneo e, em particular a microcirculação na patogênese de injúrias na mucosa gástrica. Atribui-se o controle do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica às prostaglandinas (ALPHIN et al., 1977; FORSELL, 1988).

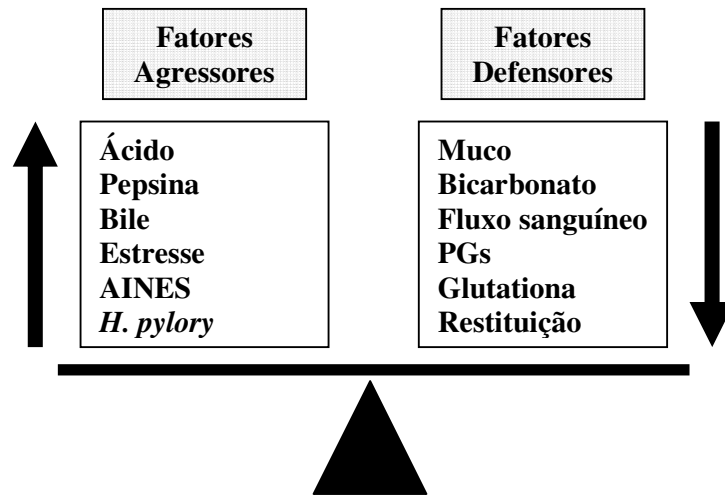


Figura 5: Esquema fisiopatológico atual da úlcera péptica

A glutathione (GSH) é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína, existente em praticamente todas as células de mamíferos (figura 6). Ele exibe um grande número de funções essenciais para a célula, incluindo transporte de aminoácidos, catálise enzimática e proteção contra os efeitos deletérios de radicais livres endógenos e metabólitos tóxicos (MEISTER, 1991; ROSS, 1988). A atividade antioxidante do GSH é mediada por dois mecanismos: primeiro, o GSH pode diretamente remover radicais livres; segundo, o GSH pode funcionar como um substrato para a glutathione peroxidase (GPX), eliminando peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos no citosol e mitocôndrias (REED & FARISS, 1984).

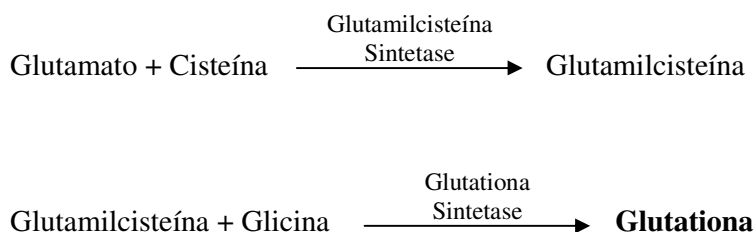


Figura 6: Esquema representativo das etapas na síntese de glutathione (SMITH et al., 1996).

Na década de 80, um grande número de pesquisadores relatou sobre a importância do GSH na defesa da mucosa gástrica. Esta tese foi inicialmente baseada na observação de que, tanto no homem como em animais, o GSH está presente em altas concentrações no estômago quando comparado com outros órgãos, sugerindo seu papel protetor como um composto antioxidante endógeno (BOYD et al., 1981; MILLER et al., 1985; MUZUI & DOTEUCHI, 1986; SZABO et al., 1981). Ao mesmo tempo, algumas substâncias conhecidas por causar injúria na mucosa gástrica foram associadas com uma diminuição dos níveis de GSH, enquanto os agentes conhecidos por causar proteção na mucosa gástrica, como as prostaglandinas, aumentam a concentração de GSH (MILLER et al., 1985; MUZUI & DOTEUCHI, 1986; SZABO et al., 1981).

1.5. CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP (K_{ATP}) E A PROTEÇÃO GÁSTRICA

O canal de K_{ATP} é um complexo hetero-octamérico composto de duas subunidades que formam um poro: a subunidade Kir6.x (Kir6.1 ou Kir6.2) e subunidade SUR. Esta última subunidade está associada a uma proteína reguladora pertencente a receptores das sulfoniluréias, que é frequentemente usado para o tratamento do diabetes mellitus do tipo 2 (AGUILAR-BRYAN & BRYAN, 1999; SEINO et al., 2000). Estes receptores são definidos tendo por base a sua sensibilidade para o ATP intracelular que inibe a sua atividade. Os receptores Kir6.1 e Kir6.2 possuem dois domínios transmembrana, que são essenciais para o fechamento e abertura do canal (INAGAKI et al., 1995). Há duas isoformas de receptores das sulfoniluréias, SUR1 e SUR2, que são derivados de dois diferentes genes. A SUR1 foi primeiro clonada das células β -pancreáticas (AGUILAR-BRYAN et al., 1995). Os receptores das sulfoniluréias possuem três domínios transmembrana conhecidos como TMD0, TMD1 e TMD2, cada um contendo 5, 6 e 7 domínios de membrana, respectivamente. Os receptores das sulfoniluréias ainda possuem dois nucleotídeos (NBF-1 e NBF-2) ligados no lado citoplasmático (CONTI et al., 2001). A proteína SUR1 apresenta alta capacidade e afinidade de ligação à sulfoniluréia glibenclamida, enquanto a SUR2 possui uma afinidade baixa por esse composto (AGUILAR-BRYAN et al., 1995). A SUR1 é expressa em altos níveis no

pâncreas e em baixas concentrações no cérebro, enquanto a SUR2 é expressa em altos níveis no coração e músculo esquelético (INAGAKI et al., 1996).

Os canais de K_{ATP} participam da atividade elétrica em muitos tecidos por regular o fluxo de potássio na membrana celular. Esses canais podem ser ativados por alguns fatores como a voltagem, a entrada e a liberação de cálcio intracelular, as proteínas G e ATP. Na maioria das células excitáveis os canais de K_{ATP} estão fechados em condições fisiológicas e abertos quando a razão $[ATP]/[ADP]$ está diminuída (figura 7). A dissociação do ATP causa a sua oclusão e conseqüente hiperpolarização da membrana (SOBEY, 2001). A razão $[ATP]/[ADP]$ é diminuída quando o nucleotídeo NBF-1 se liga ao ATP e o NBF-2 liga-se ao MgADP. Neste estado de conformação, a interação de SUR1 com Kir6.2 reduz a afinidade da Kir6.2 ao ATP, abrindo os canais de potássio. Em contraste, quando a razão $[ATP]/[ADP]$ está aumentada, a diminuição do MgADP induz a sua dissociação do NBF-2, resultando em liberação e ligação do ATP à NBF-1 e, conseqüentemente, fechamento dos canais (BIENENGRAEBER et al., 2000).

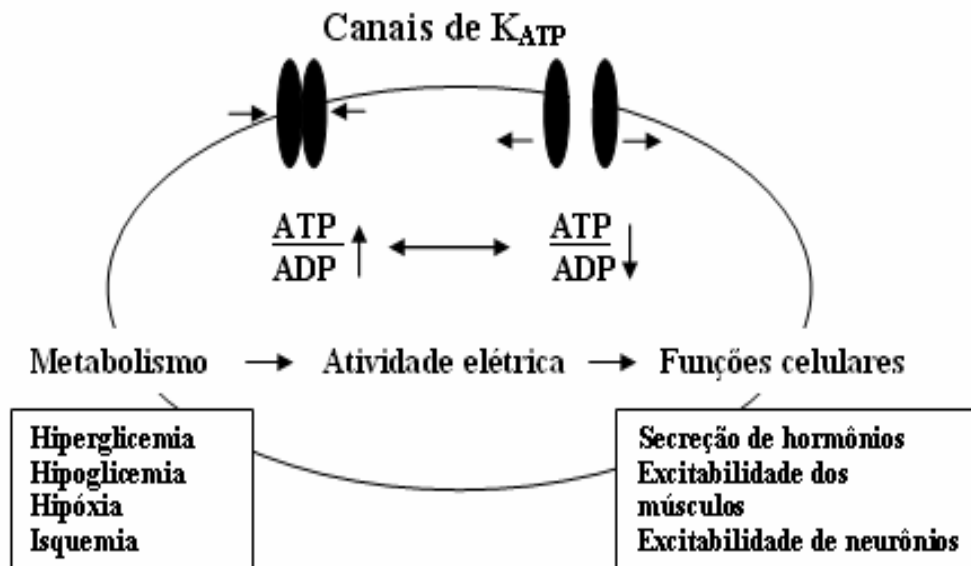


Figura 7: Papel metabólico e funções celulares dos canais de K_{ATP} . Os canais de K_{ATP} possuem um importante papel na resposta celular de vários tecidos sob estresse metabólico, incluindo hiperglicemia, hipoglicemia, hipóxia e isquemia (Adaptado de SEINO & MIKI, 2003).

Os canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) pertencem a uma grande família de proteínas de membrana. Foi descoberto inicialmente no coração (NOMA, 1983) e encontrado mais tarde em outros tecidos como o pâncreas (ASHCROFT et al., 1984), o músculo esquelético (SPRUCE et al., 1985), o músculo liso (STANDEN et al., 1989), o rim (HUNTER & GIEBISCH, 1988) e o cérebro (ASHFORD et al., 1988). Os K_{ATP} são inibidos pelo ATP intracelular e ativados pelo MgADP, um composto que interage com as NBFs da subunidade SUR, ativando-a (GLIBLLE et al., 1997; NOMA, 1983). Apresentam um importante papel em vários processos fisiológicos como à liberação de neurotransmissores (LISS et al., 1999), a excitabilidade celular, a secreção de hormônios, a citoproteção na isquemia cardíaca e cerebral, a reatividade vascular, o tônus do músculo liso (DAUT et al., 1994), o controle da secreção de insulina e glucagon (ASHCROFT et al., 1984) (figura 7). Também estão envolvidos nas respostas celulares a vários tecidos, alterando o estado metabólico, como hiperglicemia, hipoglicemia, isquemia e hipóxia (YOKOSHIKI et al., 1988; SEINO & MIKI, 2003) (figura 7).

O papel fisiológico dos canais de K_{ATP} tem sido melhor caracterizado nas células β -pancreática. Nestas células, o aumento na concentração de ATP e do metabolismo da glicose fecha os canais de K_{ATP} (COOK et al., 1988). No coração os canais de K_{ATP} estão envolvidos no aumento do efluxo de K^+ e encurtamento do potencial de ação, podendo causar distúrbios eletrofisiológicos e induzir arritmias (GASSER & VAUGHAN-JONES, 1990; WILDE & JANSE, 1994). No sistema vascular, os canais de K_{ATP} estão implicados no relaxamento do músculo liso vascular, possuindo um papel importante no controle da pressão sanguínea (NELSON & QUAYLE, 1995). Essa vasodilatação pode ser bloqueada pela glibenclamida, uma sulfoniluréia que inibe e fecha os canais K_{ATP} (BEECH et al., 1993). No cérebro os canais de K_{ATP} são detectados em muitos tipos celulares, incluindo neurônios do hipocampo, células gliais, neurônios hipotalâmicos e substância negra (LISS et al., 1999; FUJIMURA et al., 1997). A abertura desses canais no cérebro sob estresse metabólico possui ação protetora contra a lesão neuronal e neurodegeneração (BLONDEAU et al., 2000).

Tem sido postulado que os canais de K_{ATP} estão envolvidos em uma variedade de funções fisiopatológicas do estômago tais como: regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido gástrico e contratilidade do estômago (TOROUDI et al., 1999). Entretanto, os efeitos

diretos sobre os canais de potássio sensíveis ao ATP na modulação dos eventos gastroprotetores não foram ainda completamente investigados.

Alguns compostos como o diazóxido, o cromokalim, o pinacidil e o nicorandil são drogas que ativam e abrem os canais de potássio em diversos tecidos, causando hiperpolarização da membrana plasmática e redução da atividade elétrica (ASHCROFT & GRIBLLE. 2000; JAHANGIR et al., 2001). Tem sido mostrado que diferentes subunidades conferem variações na sensibilidade a essas drogas. Por exemplo, os receptores Kir6.2/SUR1 são ativados fortemente pelo diazóxido, mas não pelo pinacidil. Contudo, os receptores Kir6.2 e SUR2 são ativados pelo pinacidil e cromokalim, mas não pelo diazóxido (INAGAKI et al., 1995; GLIBLLE et al., 1998). Trabalhos recentes estudando os efeitos do diazóxido no estômago demonstraram que ele inibiu as lesões na mucosa gástrica induzidas por etanol, enquanto a glibenclamida (bloqueia o canal de K_{ATP}) aumentou as lesões gástricas induzidas por etanol (TOROUDI et al., 1999). Também foi mostrado que o efeito lesivo direto da indometacina na mucosa gástrica de rato pode ser agravado pelo uso da glibenclamida. Entretanto esse efeito pode ser inibido com o uso de cromokalim e diazóxido (AKAR et al., 1999; GOMES et al., 2006). Peskar e colaboradores demonstraram que a gastroproteção por vários agentes é inibido não somente pela indometacina, mas também pela glibenclamida. Estes dados sugerem que o mecanismo de ação das prostaglandinas endógenas e exógenas envolve a ativação dos canais de K_{ATP} (PESKAR et al., 2002). Assim, todos esses trabalhos sugerem que a regulação da abertura e fechamento dos canais de K_{ATP} no estômago pode ser um mecanismo de defesa da mucosa gástrica a agressões externas.

Portanto, o conhecimento da fisiopatologia dos mecanismos envolvidos na lesão da mucosa gástrica como a expressão aumentada de NO sintase induzida (TAKEUCHI et al., 1999), de fatores de transcrição (AP-1 e NF- κ B) (LEE et al., 2005), de COX-2 (SOUZA et al., 2003), diminuição de glutathiona (SANTOS & RAO, 2001; OLIVEIRA et al., 2004) e abertura dos canais de K_{ATP} (PESKAR et al., 2002), podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento e profilaxia da lesão gastrintestinal provocada pelo etanol.

2. OBJETIVOS:

2.1. Gerais:

- ✓ Avaliar a participação da via NO/GMPc/K_{ATP} na proteção do sildenafil sobre a lesão gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.

2.2. Específicos:

- ✓ Testar a ação do sildenafil na lesão gástrica, hemorragia e consumo de glutathione, induzido por etanol absoluto.
- ✓ Estudar a participação do NO neste evento, através do tratamento com L-NAME (inibidor da NOS não-seletivo), isoladamente ou associado com L-Arginina (substrato da NOS).
- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com ODQ (um inibidor da guanilato ciclase) na lesão gástrica, hemorragia e consumo de glutathione, induzido por etanol absoluto.
- ✓ Estudar o papel dos canais de K dependentes do ATP na lesão gástrica, hemorragia e consumo de glutathione, induzido por etanol absoluto, através do tratamento com glibenclamida (um bloqueador dos canais de potássio ATP-dependentes), isoladamente ou associado ao diazóxido (ativador dos canais de potássio ATP-dependentes).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

No presente trabalho, foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 220 e 280 gramas. Os animais foram colocados em caixas, num ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ num ciclo de 12h luz/12h escuro. Os animais foram privados de alimento por 18-24h antes dos experimentos, mas tiveram acesso livre a água. Os grupos experimentais consistiram de 5-7 animais por grupo. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – UFC e pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC. Os protocolos experimentais estão de acordo com os padrões de uso de animais experimentais e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa animal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS:

- ✓ Alicates para deslocamento cervical
- ✓ Balança Analítica Ohaus AS2600
- ✓ Balança Analítica Marte AI200
- ✓ Béquers
- ✓ Centrífuga Eppendorf 5804R
- ✓ Centrífuga de eppendorf Revan, ciclo I
- ✓ Cânula para gavagem
- ✓ ELISA ELX 800 - Biotek
- ✓ Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys

- ✓ Homogeneizador de tecidos Ultra-turraz T8 e Dispergierstation T8.10 da Ika Labortechnik
- ✓ Máquina fotográfica digital (Sony Cybershoot, 7.2 mpx)
- ✓ Material cirúrgico
- ✓ Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N
- ✓ Membrana de 0,22 μm (Tipo GS, Millipore)
- ✓ Micropipetas Gilson de 10, 20, 100, 200 e 1000 μL
- ✓ Microscópio Óptico binocular Nikon Alphaphot 2 VS2
- ✓ Microscópio Leica acoplado a computador
- ✓ Micrótomo Olympus
- ✓ Ponteiras para pipetas automáticas Sigma
- ✓ Seringas (B-D Plastipak)
- ✓ Sonicador
- ✓ Tubos de ensaio

3.3. DROGAS UTILIZADAS:

- ✓ Citrato de Sildenafil (Pfizer), diluído em solução salina
- ✓ Diazóxido (Sigma- Aldrich), diluído em solução de NaOH 0,05 N
- ✓ Etanol Absoluto (VETEC)
- ✓ Glibenclamida (Sigma- Aldrich), diluída em solução de NaOH 0,01 N com 4% de glicose
- ✓ L-Arginina (Sigma- Aldrich), diluída em solução salina
- ✓ NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma- Aldrich), diluído em solução salina
- ✓ ODQ (1*H*- 1,2,4 oxadiazolo [4,3-*a*]quinoxaline-1-one) (Sigma- Aldrich), diluído em solução salina mais DMSO 100%.

3.4. CORANTES:

- ✓ Eosina (Merck)
- ✓ Hematoxilina (Reagen)
- ✓ Reagente de cor para hemoglobina (reagente de DrabKin`s)

3.5. SOLUÇÕES:

- ✓ Solução Salina
Cloreto de Sódio a 0,9% estéril

- ✓ Formol 10 %
Formol Absoluto ----- 10 ml
Água destilada ----- 90 ml

- ✓ Ácido tricloroacético (TCA) 100%

- ✓ Dimetil sulfóxido (DMSO) 100%

- ✓ Glicose 4%
Glicose ----- 4 g
Salina 0,9% ----- 100 ml

- ✓ Solução de NaOH
0,01N
NaOH ----- 4g
Água destilada ----- 1 L

✓ Solução de NaOH
0,05N
NaOH ----- 20 g
Água destilada ----- 1 L

✓ Solução de
Drabkin's
Tampão fosfato ----- 200 mmol/L
Ferricianeto de potássio ----- 120 mmol/L
Cianeto de potássio ----- 150 mmol/L
Surfactante

✓ Tampão Tris
Hidroximetil aminometano (Tris) ----- 6,1 g
Água destilada ----- 500 ml
O pH do tampão foi acertado para 8,0

✓ EDTA 0,2 M
EDTA ----- 1,737 g
H₂O destilada ----- 23,3 ml

✓ EDTA 0,02 M
Solução de EDTA 0,2 M ----- 10,0 ml
H₂O ----- 90,0 ml

✓ Tris 0,4 M pH 8,9
Tris ----- 4,84 g
EDTA 0,2 M ----- 10,0 ml
H₂O destilada ----- 90,0 ml

✓ DTNB 0,01 M

DTNB -----	13,2 mg
Metanol -----	3,33 mL

3.6. EFEITO PROTETOR DO SILDENAFIL NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁLCOOL EM RATOS: CURVA DOSE-RESPOSTA

Os animais foram pré-tratados, por gavagem, com 0,5 ml de salina ou sildenafil (0,1, 0,3, 1, ou 3 mg/Kg). Após 30 min, a lesão gástrica foi induzida pela administração de etanol absoluto (4 mL/Kg), também por gavagem. O grupo controle recebeu apenas solução salina. Os ratos foram sacrificados 1 hora após a aplicação do etanol por deslocamento cervical e os estômagos foram rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura para o estudo dos efeitos das drogas (Ko JK-S & Cho CH, 1998). Os estômagos foram então estirados e fotografados com câmera digital para posterior análise e medições das alterações macroscópicas com uso de um programa de planimetria computadorizada (*ImageJ*). A seguir, o corpo gástrico do animal foi dividido em 4 quadrantes imaginários, sendo retirado um fragmento de cada quadrante (figura 1). Em todas as análises, um fragmento do quadrante 1 foi usado para determinação dos níveis de glutathione, um fragmento do quadrante 2 usado para quantificar a hemorragia através da determinação de hemoglobina, e um fragmento do quadrante 4 usado para avaliação microscópica. Essas amostras foram, então, pesadas e congeladas a -80°C para posterior dosagem de glutathione e ensaio de hemoglobina. Outra amostra de tecido foi retirada e colocada em formol a 10% e após 24 horas em álcool 70% para análises microscópicas.

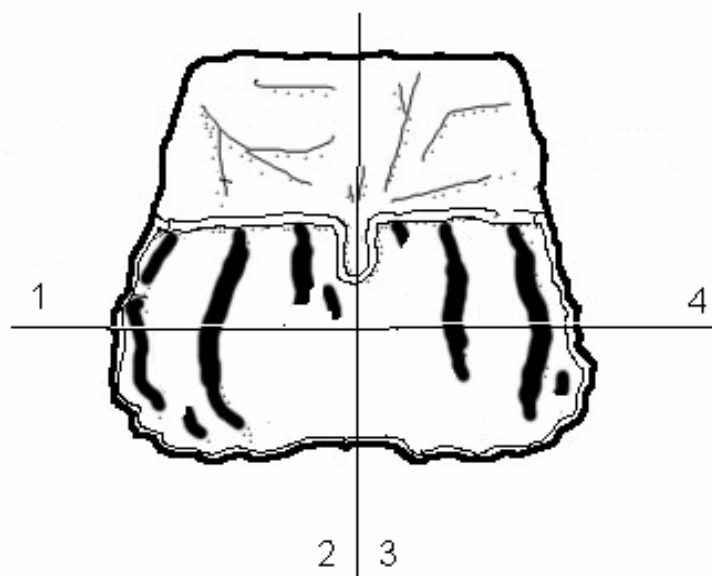


Figura 8. Esquema representado a divisão em quadrantes do estômago lesado para a retirada das amostras.

3.7. PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NO EFEITO PROTETOR DO SILDENAFIL NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁLCOOL EM RATOS

Para o estudo do papel do óxido nítrico no efeito gastroprotetor do sildenafil, os animais foram, inicialmente, pré-tratados com L-NAME (inibidor não específico das enzimas NOS) nas doses de 1 ou 3 mg/Kg, por via intra-peritoneal e/ou com L-Arginina (substrato para formação de NO) na dose de 200 mg/Kg (dose única), também por via intra-peritoneal. Após 30 min foi administrado o sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem). Decorridos 1 h após a aplicação do L-NAME e/ou da L-Arginina, foi administrado etanol absoluto (4 mL/Kg, por gavagem) para induzir a lesão gástrica. Os grupos controles receberam apenas solução salina ou etanol absoluto ou sildenafil + etanol. Uma hora após a adição de etanol, a lesão gástrica foi determinada de acordo com o método descrito na seção anterior, onde os estômagos foram fotografados com câmera digital para posterior análise das alterações macroscópicas com uso

de um programa de planimetria computadorizada (*ImageJ*). A seguir, as amostras do estômago foram retiradas, pesadas e congeladas a -80°C para dosagem de glutatona e ensaio de hemoglobina. Outra amostra de tecido foi retirada e colocada em formol a 10% e após 24 horas em álcool 70% para análise microscópica.

3.8. PAPEL DO GMPc NO EFEITO PROTETOR DO SILDENAFIL NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁLCOOL EM RATOS

Para o estudo do papel do GMPc (guanosina 3',5'- monofosfato cíclico) intracelular no efeito gastroprotetor do sildenafil, os animais foram tratados com ODQ (inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel) na dose de 10 mg/Kg, por gavagem. Após 30 minutos, foi administrado o sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem). Depois de 1 hora de aplicação do ODQ, foi administrado etanol absoluto (4 mL/Kg, por gavagem) para induzir a lesão gástrica. Os grupos controles receberam apenas solução salina ou etanol absoluto ou sildenafil + etanol. Uma hora após a adição de etanol, a lesão gástrica foi determinada de acordo com o método descrito anteriormente, e os animais sacrificados 1 hora depois por deslocamento cervical, onde os estômagos foram fotografados com câmera digital para posterior análise das alterações macroscópicas com uso de um programa de planimetria computadorizada (*ImageJ*). A seguir, as amostras do estômago foram retiradas, pesadas e congeladas a -80°C para dosagem de glutatona e ensaio de hemoglobina. Outra amostra de tecido foi retirada e colocada em formol a 10% e após 24 horas em álcool 70% para análise microscópica.

3.9. PAPEL DOS CANAIS DE POTÁSSIO ATP-DEPENDENTES NO EFEITO PROTETOR DO SILDENAFIL NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁLCOOL EM RATOS:

Para identificar a participação dos canais de K⁺ ATP-dependentes no efeito gastroprotetor do sildenafil, os animais foram pré-tratados, intragastricamente, com glibenclamida (droga bloqueadora seletiva dos canais de potássio sensíveis ao ATP) nas doses de 0,1, 0,3, 1 ou 3 mg/Kg, ou diazóxido (ativador dos canais de potássio sensíveis ao ATP) na dose de 3 mg/Kg, por via intra-peritoneal, ou diazóxido 3 mg/Kg + glibenclamida 1 mg/Kg. O sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem) foi administrado 1 h após a aplicação da glibenclamida ou diazóxido. A lesão gástrica foi induzida por etanol absoluto 30 minutos depois da administração do sildenafil e os animais sacrificados uma depois por deslocamento cervical. Os grupos controles receberam apenas solução salina ou etanol absoluto ou sildenafil + etanol. A intensidade gastroprotetora foi aferida como descrito anteriormente, onde uma amostra do corpo gástrico de cada animal foi retirada, pesada e congelada a -80°C até a determinação dos níveis de glutathione, seguindo a técnica citada anteriormente e descrita por Sedlak & Lindsay (SEDLAK, J. & LINDSAY, R.H., 1968). Outro fragmento do estômago foi retirado, pesado e congelado a -80°C para a determinação da intensidade de hemorragia através da determinação do nível gástrico de hemoglobina. Outra amostra de tecido foi retirada e colocada em formol a 10% e, após 24 horas, em álcool a 70% para análises microscópicas.

3.10. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA (GRUPOS SULFIDRÍLICOS NÃO-PROTÉICOS) NA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS:

Uma amostra de tecido do estômago foi utilizada para determinar a concentração de grupos sulfidrílicos não-protéicos (SH-NP) de acordo com o método de Sedlak & Lindsay (SEDLAK, J. & LINDSAY, R.H., 1968). A determinação dos grupos SH-NP neste método baseia-se na reação do reagente de Ellman, o DTNB, com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido, o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A lesão gástrica foi induzida pela administração por via oral de etanol absoluto (4 ml/Kg). Transcorrido 1 hora após a aplicação do etanol, os animais foram sacrificados e as amostras retiradas. Um segmento de tecido da mucosa gástrica pesando entre 50-100mg foi homogeneizado em EDTA 0.02 M (1 mL/100g de tecido) gelado. À uma alíquota de 400 µL de tecido homogeneizado foi adicionado 320 µL de água destilada e 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50%. Em seguida o material foi

centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, seguido de agitação e filtração. Depois de centrifugado, 400 µL do sobrenadante foram misturados a 800 µL de tampão Tris 0.4 M (pH 8.9). Por fim, foi adicionado 20 µL de DTNB (5,5'-dithio-bis (2- nitrobenzoico ácido) 0,01M). O material foi então agitado durante 3 minutos e a absorbância foi mensurada a 412 nm em espectrofotômetro. A concentração de glutatona/g de tecido foi determinada a partir de uma curva padrão de glutatona reduzida, processada de maneira semelhante. Os resultados foram expressos em µg de SH-NP/g de tecido.

3.11. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS

Para o estudo histopatológico, uma amostra do estômago foi fixada numa solução de formol 10%, onde permaneceu por 24 horas. Em seguida as amostras foram transferidas para uma solução de álcool 70%, onde permaneceram até a realização dos procedimentos histológicos. Logo após, o material biológico foi seccionado e embebido em parafina. Foram feitos cortes de cinco micrometros, colocados numa lâmina e corados com hematoxilina-eosina para o estudo no microscópio óptico. As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios de Laine & Weinstein (1988), sendo avaliado a perda de células epiteliais (escores de 0-3), edema na superfície da mucosa (escores de 0-4), hemorragia (escores de 0-4) e infiltração de células inflamatórias (escores de 0-3), sendo 14 o escore máximo. Toda a avaliação histopatológica foi realizada através de um estudo cego.

3.12. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA (Hb) NA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS:

A fim de quantificar a hemorragia na mucosa, foi usado um teste colorimétrico para cianometahemoglobina para determinação da concentração de hemoglobina na mucosa gástrica. O método baseia-se na oxidação de ferro (ferro II) da molécula de hemoglobina pelo

ferricianeto de potássio em pH fracamente alcalino, formando a metahemoglobina que é convertida em cianometahemoglobina após a reação com o cianeto de potássio, proporcionando uma coloração avermelhada, que é proporcional à concentração de hemoglobina presente na amostra.

No trabalho foi utilizado um kit padrão para hemoglobina (Bioclin), contendo o reagente de cor para hemoglobina (reagente de Drabkin's). Uma amostra de tecido do estômago, preparada de acordo com o item 3.6, foi homogeneizada em solução de Drabkin's (100 mg de tecido/1 mL de solução), sendo preparada de acordo com o fabricante (Bioclin). Logo após, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado, filtrado usando um filtro de 0,22 μm e novamente centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. A concentração de hemoglobina/100 mg de tecido foi determinada a partir de uma curva padrão de hemoglobina, sendo a leitura feita em ELISA com a absorvância de 540 nm. Os resultados foram expressos em μg de Hb/100 mg de tecido.

3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A análise estatística foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA). Quando houve diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Para a análise das alterações histológicas, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunns. Os resultados foram expresso ou como média \pm E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana \pm mínimo e máximo (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO PROTETOR DO SILDENAFIL NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁLCOOL EM RATOS: CURVA DOSE-RESPOSTA

Nas figuras 9 e 10 podemos observar que os animais tratados apenas com salina não apresentaram lesões na mucosa gástrica, enquanto os animais que receberam somente álcool tiveram grandes lesões hemorrágicas lineares na mucosa. Ainda na figura 10, observa-se que o sildenafil reduziu de forma dose-dependente, as lesões provocadas pelo etanol absoluto na mucosa, com todas as doses testadas (0,1, 0,3, 1 e 3 mg/Kg de sildenafil, por gavagem) apresentando redução significativa dessas lesões. De todas as doses de sildenafil utilizadas no trabalho, a dose de 1 mg/Kg foi a que apresentou o maior efeito protetor na mucosa (nível de significância de $p < 0,01$), diminuindo em 68% o tamanho da lesão.

4.1.1. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS TRATADOS COM SILDENAFIL E/OU ÁLCOOL

Na tabela 1 e figura 9 (Painel B e D) observa-se que o sildenafil na dose de 1 mg/Kg, diminuiu de forma significativa ($p < 0,05$) a hemorragia provocada pelo etanol na mucosa gástrica de ratos. De forma semelhante, o sildenafil nas doses de 0,3, 1 e 3 mg/Kg também diminuíram significativamente o edema na mucosa gástrica provocado pelo etanol. Ainda na tabela 1 verifica-se que o sildenafil diminuiu os danos provocados pelo álcool na superfície epitelial ao reduzir a perda de células no epitélio, efeito observado nas doses de 0,3, 1 e 3 mg/kg. Foi observado também que nenhuma dose de sildenafil testada apresentou diferenças na infiltração de células inflamatórias quando comparado com os controles (salina ou álcool).

A figura 11 mostra o resultado do somatório dos escores de todos os parâmetros histopatológicos avaliados, ou seja, da hemorragia (0-4 escores), do edema (0-4 escores), da perda de células epiteliais (0-3 escores) e do infiltrado inflamatório (0-3 escores), totalizando no máximo 14 escores. Verifica-se que o sildenafil nas doses de 0,3, 1 e 3mg/Kg diminui de forma significativa os efeitos do álcool sobre esses parâmetros.

4.1.2. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS TRATADOS COM SILDENAFIL E/OU ÁLCOOL:

A determinação dos grupos sulfidrílicos não protéicos na mucosa gástrica de ratos mostrou que a administração de etanol diminuiu de forma significativa ($p < 0,05$) o nível gástrico de glutathione quando comparado com o grupo controle (apenas salina). Entretanto, o pré-tratamento dos animais com sildenafil nas doses de 0,3, 1 e 3 mg/Kg aumentou os níveis de glutathione até os valores semelhantes aos normais (figura 12).

4.1.3. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA NA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS TRATADOS COM ÁLCOOL E/OU SILDENAFIL:

De forma semelhante ao observado nas lesões macroscópicas, a administração de etanol absoluto aumentou em 112% os níveis de hemoglobina na mucosa gástrica, indicando que houve hemorragia nesse tecido (figura 13). Entretanto, nos animais previamente tratados com sildenafil, houve uma redução, de forma dose dependente, dos níveis de hemoglobina, com a dose de 1 mg/Kg de sildenafil apresentando redução significativa ($p < 0,05$). Assim, esses resultados mostram que o sildenafil reduz a lesão hemorrágica provocada pelo álcool no estômago.

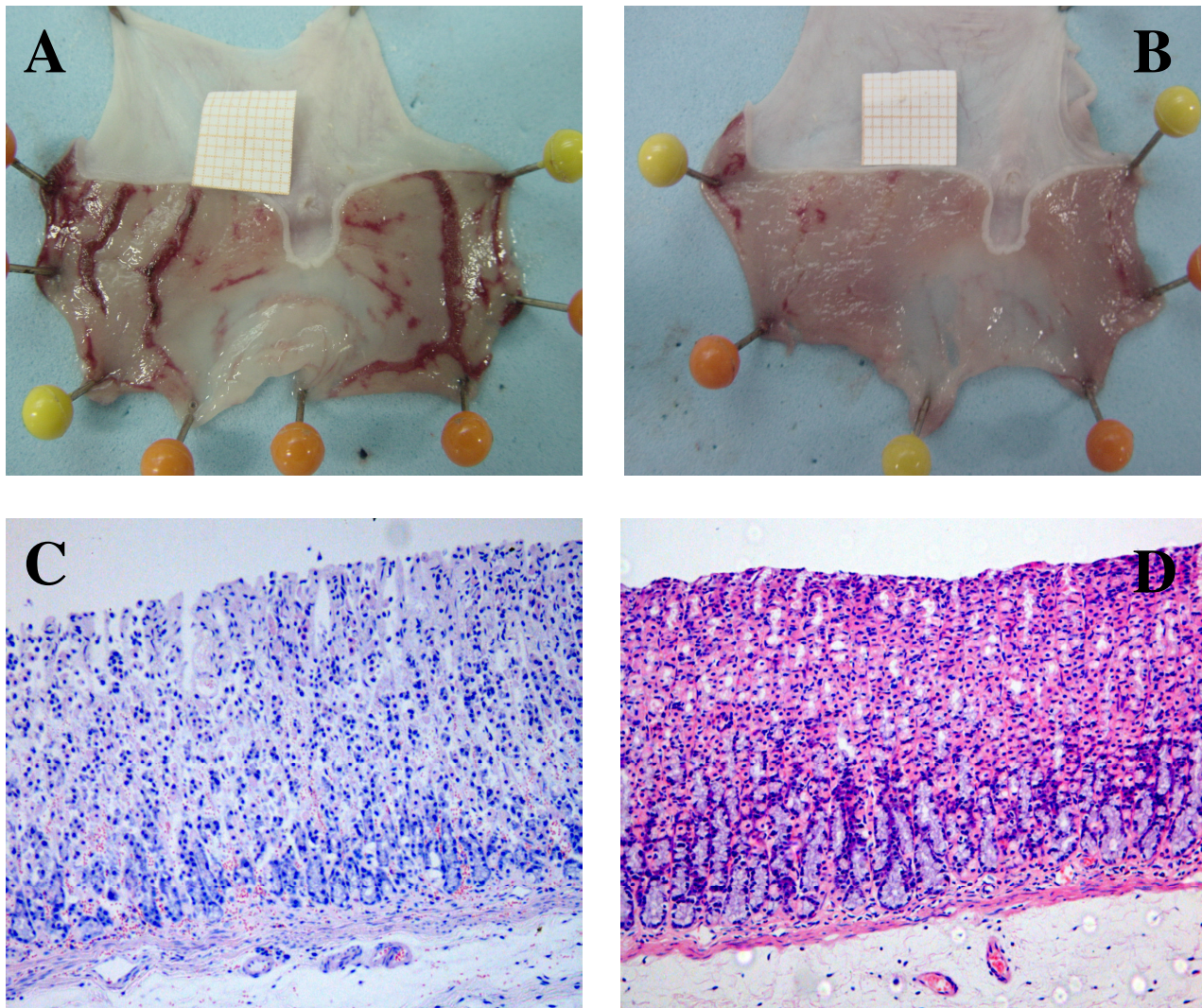


Figura 9: Efeito macroscópico e microscópico do tratamento do sildenafil na lesão gástrica induzida por álcool em ratos. O sildenafil diminuiu o efeito lesivo do etanol absoluto sobre a mucosa gástrica. Fotografias dos estômagos abertos ao longo da grande curvatura (A e B) e análise microscópica. Painel A e C: etanol absoluto 4 ml/Kg, v.o. Painel B e D: etanol absoluto + 4 ml/Kg v.o. + sildenafil 1 mg/Kg, v.o.

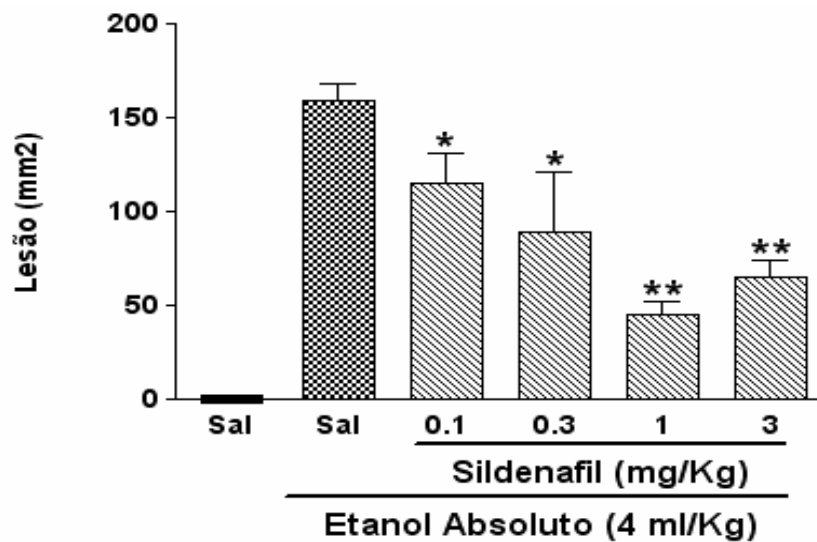


Figura 10: Efeito do tratamento do sildenafil na lesão gástrica induzida por álcool em ratos. Os animais foram tratados com salina (Sal) ou sildenafil nas doses de 0,1, 0,3, 1 e 3 mg/Kg. Uma hora depois, o etanol absoluto (4 ml/Kg) foi administrado. O índice de lesão gástrica foi avaliado depois de 1 hora. O grupo controle recebeu somente salina ou etanol. A administração de sildenafil inibiu de forma dose dependente a lesão gástrica induzida por álcool em ratos, com efeito máximo na dose de 1 mg/Kg (redução de 78 % de lesão). Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$, quando comparado ao grupo tratado com etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Tabela 1: Avaliação microscópica total: edema, hemorragia, perda de células epiteliais e infiltração de células inflamatórias em estômagos de ratos tratados com etanol absoluto ou com etanol absoluto + sildenafil (1mg/Kg). Avaliação medida em escores de acordo com os critérios de Laine *et al.*, 1988.

Tratamentos	Hemorragia (4 escores)	Edema (4 escores)	Perda de Células (3 escores)	Infiltrado Inflamatório (3 escores)
Salina	0	0	0	0 (0 – 1)
Salina + Etanol	3 (1 – 4)	2 (2 – 4)	1,5 (1 – 3)	1 (0 – 1)
Salina + Etanol + Sildenafil 0,1mg/Kg	2 (1 – 4)	1,5 (1 – 2)	1 (1 – 2)	1 (0 – 1)
Salina + Etanol + Sildenafil 0,3mg/Kg	1 (0 – 3)	0 (0 – 2)*	1 (0 – 1)*	0 (0 – 1)
Salina + Etanol + Sildenafil 1 mg/Kg	1 (0 – 2)*	1 (0 – 2)*	1 (0 – 1)*	1 (0 – 1)
Salina + Etanol + Sildenafil 3 mg/Kg	1,5 (0 – 4)	1,5 (0 – 2)	1 (0 – 2)	1 (0 – 2)

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente. Teste de Kruskal-Wallis
 (*) = $p < 0,05$ vs controle (salina + etanol)
 N = 5-7 animais por grupo

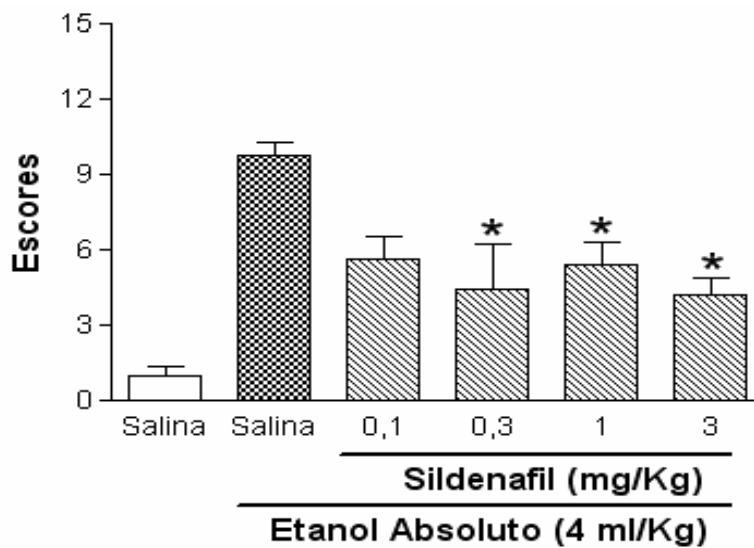


Figura 11: Avaliação microscópica do efeito protetor do sildenafil na lesão gástrica induzida por etanol absoluto em ratos. Os animais foram tratados com salina ou sildenafil nas doses de 0,1, 0,3, 1 e 3 mg/Kg. Uma hora depois, o etanol absoluto (4 ml/Kg) foi administrado. O índice de lesão gástrica foi avaliado depois de 1 hora. O grupo controle recebeu somente salina ou etanol. Uma amostra do estômago foi retirada para análise microscópica, onde foram avaliados hemorragia, edema, perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório e dessaranjo da mucosa. A atividade histológica foi determinada por escores em uma escala de 0-17. A administração de sildenafil nas doses de 0,3, 1 e 3 mg/Kg inibiu de forma significativa o efeito lesivo do álcool na mucosa gástrica. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

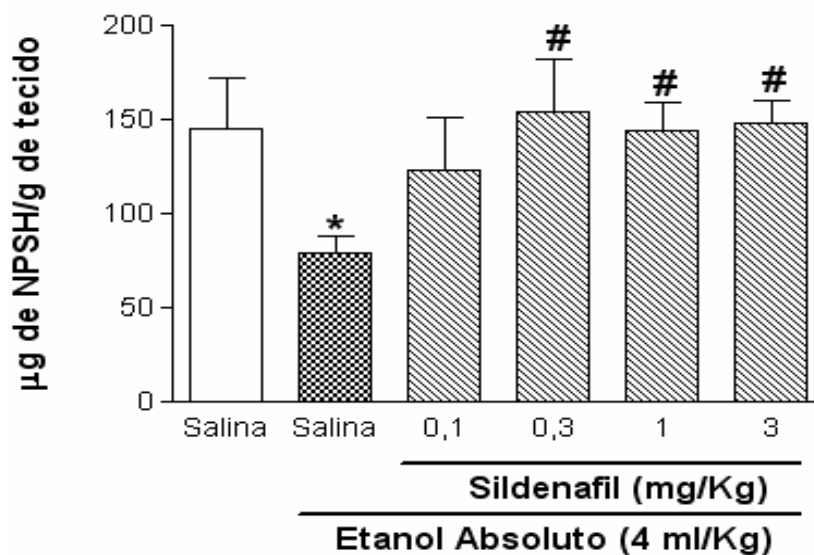


Figura 12: Determinação dos níveis de glutatona presentes na mucosa de ratos tratados com álcool e/ou sildenafil. Os animais receberam por via oral sildenafil (0,1, 0,3, 1 e 3 mg/Kg) ou salina. Após 1 hora, os animais foram tratados com etanol absoluto (4 ml/Kg), também por via oral. O grupo controle foi tratado com salina ou álcool. A administração de etanol absoluto diminuiu de forma significativa o nível gástrico de glutatona. O sildenafil nas doses de 0,3, 1 e 3 mg/Kg, foi capaz de reverter o efeito do etanol, fazendo com que os níveis de NPSH da mucosa gástrica voltassem ao normal. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com salina. (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

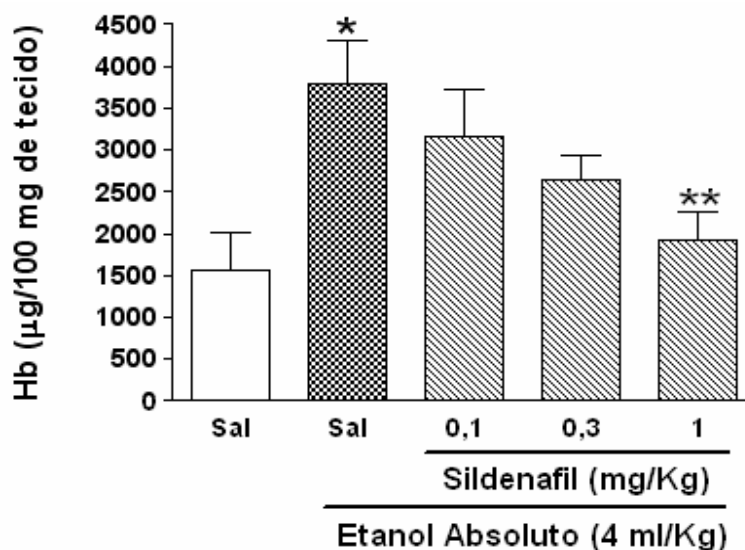


Figura 13: Determinação dos níveis de hemoglobina presentes na mucosa de ratos tratados com álcool e/ou sildenafil. Os animais receberam por via oral sildenafil (0,1, 0,3, 1 e 3 mg/Kg) ou salina. Após 1 hora, os animais foram tratados com etanol absoluto (4 ml/Kg), também por via oral. O grupo controle foi tratado com salina ou álcool. A administração de etanol absoluto aumentou de forma significativa o nível gástrico de hemoglobina. O sildenafil na dose de 1 mg/Kg, foi capaz de reverter o efeito do etanol, fazendo com que os níveis de NPSH da mucosa gástrica voltassem ao normal. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com salina. (**) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

4.2. PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NO EFEITO PROTETOR DO SILDENAFIL NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁLCOOL EM RATOS

Para determinar o papel do óxido nítrico endógeno na proteção da mucosa gástrica, foi usado o L-NAME, que é um inibidor das enzimas NOS. O pré-tratamento dos animais com L-NAME na dose de 3 mg/Kg reverteu totalmente o efeito protetor do sildenafil na lesão gástrica induzida por álcool, tanto macroscopicamente quanto microscopicamente (figuras 14 e 15). Esse efeito do L-NAME é de forma dose dependente, apresentando em doses mais altas, ou seja, acima de 3 mg/Kg uma acentuado aumento na lesão provocada por álcool (dados não mostrados).

As figuras 14 e 15 também mostram que a adição de L-arginina nos animais tratados com L-NAME 3 mg/Kg, sildenafil e álcool reverteu significativamente ($p < 0,01$) o efeito lesivo do álcool e do L-NAME na mucosa gástrica. Esse efeito, provavelmente, foi devido a uma potencialização da ação protetora do sildenafil.

4.2.1. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS TRATADOS COM L-NAME E/OU L-ARGININA:

Na figura 14 (Painel A e C) e na tabela 2 observa-se que a administração de L-NAME na dose de 3 mg/Kg aumentou, significativamente, a hemorragia na mucosa gástrica causada pelo álcool e que, o pré-tratamento com L-arginina foi capaz de abolir esse efeito negativo. Entretanto, na tabela 2 verifica-se que com relação aos outros parâmetros histopatológicos avaliados, ou seja, edema, perda de células epiteliais, dessaranjo da e infiltrado inflamatório não foi verificado alterações significativas.

A figura 16 mostra o resultado do somatório dos escores de todos os parâmetros histopatológicos avaliados, ou seja, da hemorragia (0-4 escores), do edema (0-4 escores), da perda de células epiteliais (0-3 escores) e do infiltrado inflamatório (0-3 escores), totalizando

no máximo 14 escores. Verifica-se que a administração de L-NAME 3 mg/Kg aumentou, de forma significativa, o efeito do etanol absoluto sobre os parâmetros histopatológicos avaliados e que o pré-tratamento com L-arginina (200 mg/Kg) aboliu esse efeito do L-NAME.

4.2.2. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS TRATADOS COM L-NAME e L-ARG:

Para estudar a influência do óxido nítrico sobre os grupos sulfidrilas não protéicos na mucosa gástrica de ratos, foi usado o L-NAME e/ou L-ARG. A figura 17 mostra que a administração de L-NAME na dose de 3 mg/Kg reverteu o efeito protetor do sildenafil ao reduzir os níveis de glutathione. Também pode-se observar que nos animais que receberam L-arginina, concomitante com o L-NAME, há uma tendência de reversão do efeito lesivo do L-NAME e álcool, voltando a aumentar os níveis de glutathione.

4.2.3. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA NA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS TRATADOS COM L-NAME E/OU L-ARGININA:

O pré-tratamento dos animais com L-NAME na dose de 3 mg/Kg reverteu totalmente o efeito protetor do sildenafil na lesão gástrica induzida por álcool, aumentando os níveis de hemoglobina na mucosa (figura 18).

A figura 18 também mostra que a adição de L-arginina nos animais tratados com L-NAME 3 mg/Kg, sildenafil e álcool reverteu significativamente ($p < 0,01$) o efeito do álcool e do L-NAME sobre o nível gástrico de hemoglobina. Esses resultados indicam que o sildenafil, atuando via óxido nítrico, reduz a lesão hemorrágica provocada pelo álcool no estômago.

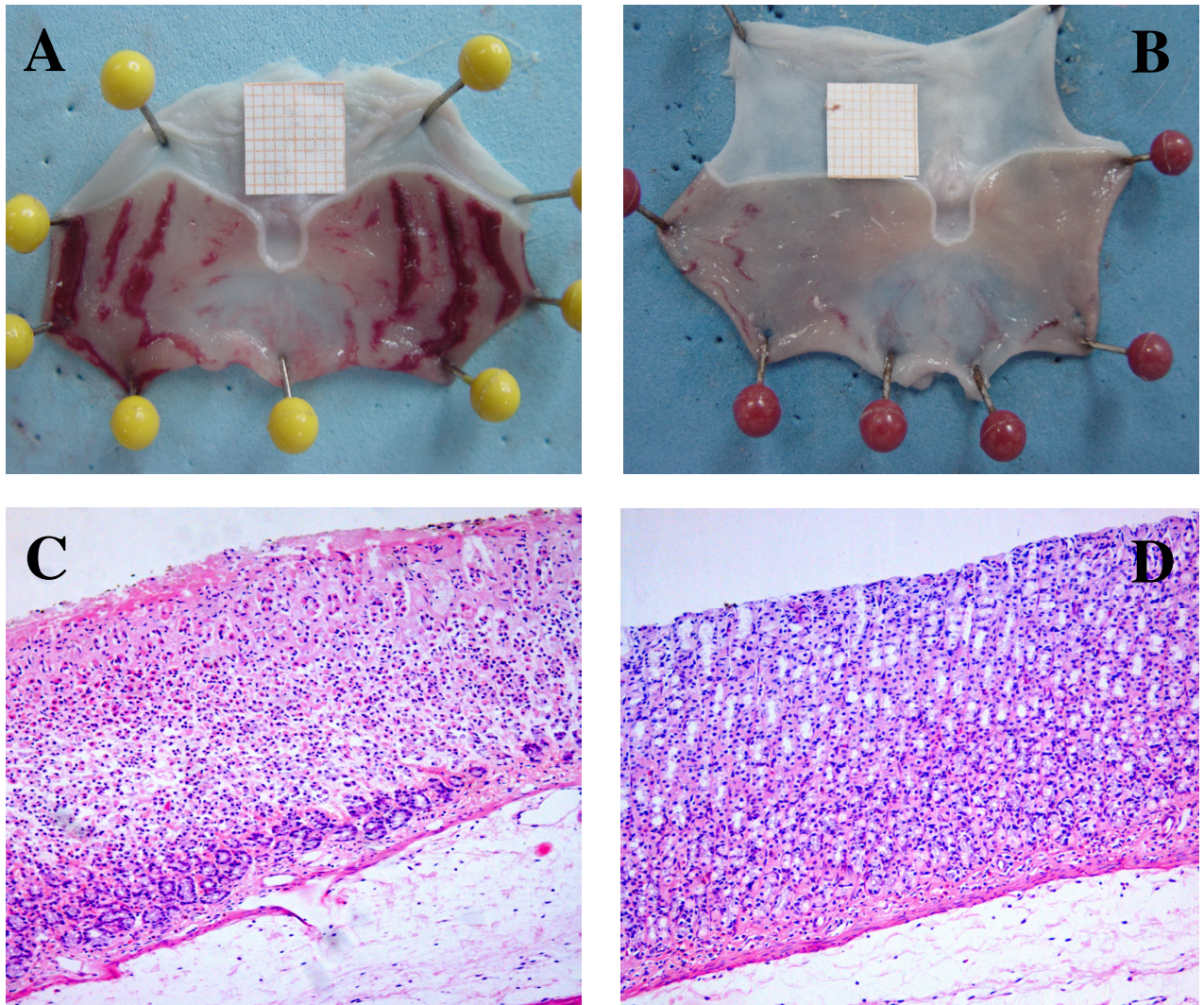


Figura 14: Efeito macroscópico e microscópico do tratamento com L-NAME e/ou L-arginina na lesão gástrica induzida por álcool em ratos. O L-NAME reverteu a gastroproteção do sildenafil e o L-arginina aboliu o efeito lesivo do L-NAME. Fotografias dos estômagos abertos ao longo da grande curvatura (A e B) e análise microscópica. Painel A e C: L-NAME (3 mg/kg, i.p) + sildenafil (1 mg/Kg, v.o) + etanol absoluto (4 ml/Kg, v.o.). Painel B e D: L-arginina (200 mg/kg, i.p) + L-NAME (3 mg/kg, v.o) + sildenafil (1 mg/Kg, v.o) + etanol absoluto (4 ml/Kg, v.o.).

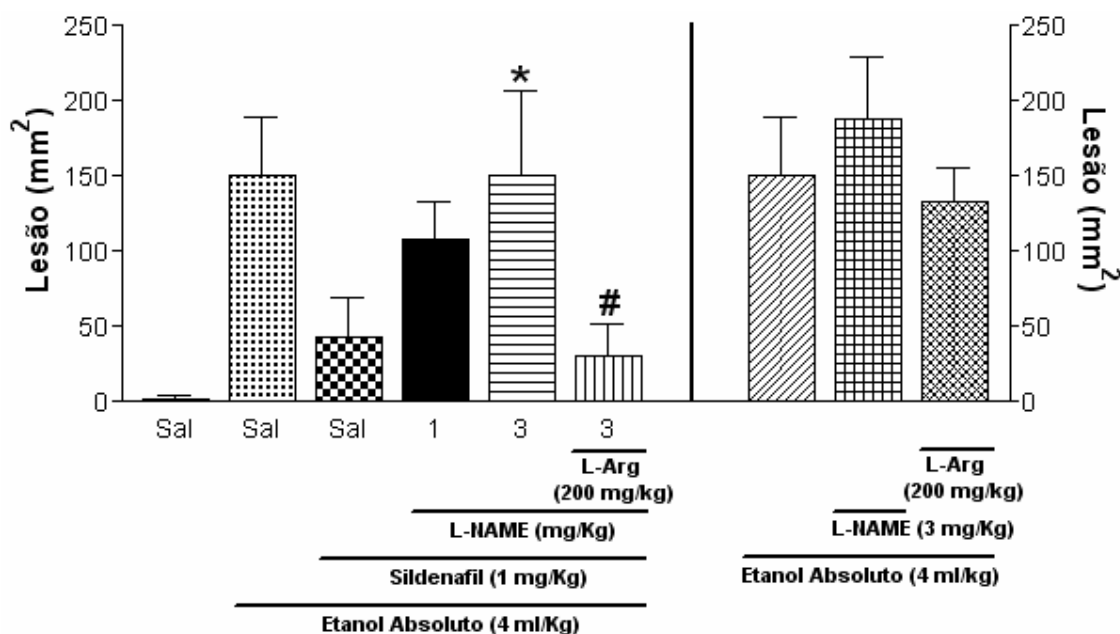


Figura 15: Efeito do tratamento com L-NAME na proteção do sildenafil à lesão gástrica induzida por álcool em ratos. Os animais receberam por via intra-peritoneal L-NAME nas doses de 1 e 3 mg/Kg ou L-Arg (200 mg/Kg). Após 30 minutos, os animais foram tratados com sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem). Uma hora após o sildenafil foi administrado etanol absoluto (4 ml/Kg, por gavagem). O grupo controle foi tratado com salina ou álcool ou sildenafil + álcool. A administração de etanol absoluto causou lesões severas na mucosa gástrica e o sildenafil na dose de 1 mg/Kg foi capaz de diminuir o efeito do etanol. A administração de L-NAME reverteu de forma dose dependente o efeito gastroprotetor do sildenafil. A L-Arginina (200 mg/Kg) aboliu o efeito do L-NAME na gastroproteção do sildenafil. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com sildenafil + álcool. (**) $p < 0,01$, quando comparado ao grupo tratado com sildenafil + etanol. (#) $p < 0,01$, quando comparado ao grupo tratado com L-NAME 3 mg/Kg + sildenafil + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Tabela 2. Avaliação microscópica total: edema, hemorragia, perda de células epiteliais e infiltração de células inflamatórias em estômagos de ratos tratados com etanol absoluto, com etanol absoluto + sildenafil (1mg/Kg) ou pré-tratados com L-NAME (1 e 3 mg/Kg) e/ou L-Arg (200 mg/Kg). Avaliação medida em escores de acordo com os critérios de Laine *et al.*, com modificações.

Tratamentos	Hemorragia (4 escores)	Edema (4 escores)	Perda de Células (3 escores)	Infiltrado Inflamatório (3 escores)	Dessaranjo da mucosa (3 escores)
Salina	0 (0 – 1)	0	0 (0 – 1)	0	0
Salina + Etanol	2 (1 – 4)	2,5 (2 – 3)	2 (1 – 3)	1	3 (2 – 3)
Salina + Etanol + Sildenafil	0,5 (0 – 1)	2 (0 – 2)	1 (1 – 2)	1 (0 – 1)	2 (0 – 3)
Salina + Etanol + Sildenafil + L-NAME 1 mg/Kg	1 (1 – 2)	2 (1 – 2)	1 (1 – 2)	1 (0 – 1)	2 (1 – 3)
Salina + Etanol + Sildenafil + L-NAME 3 mg/Kg	2 (1 – 4)*	2 (2 – 3)	1,5 (1 – 2)	1 (0 – 1)	2 (2 – 3)
Salina + Etanol + Sildenafil + L-Arg +L-NAME 3 mg/Kg	1 (0 – 1)#	1 (0 – 2)#	1 (1 – 2)	0 (0 – 1)	2 (0 – 2)

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente. Teste de Kruskal-Wallis

(*) = $p < 0,05$ vs controle (salina + etanol + sildenafil)

(#) = $p < 0,05$ vs salina + etanol + sildenafil + L-Name 3 mg/kg

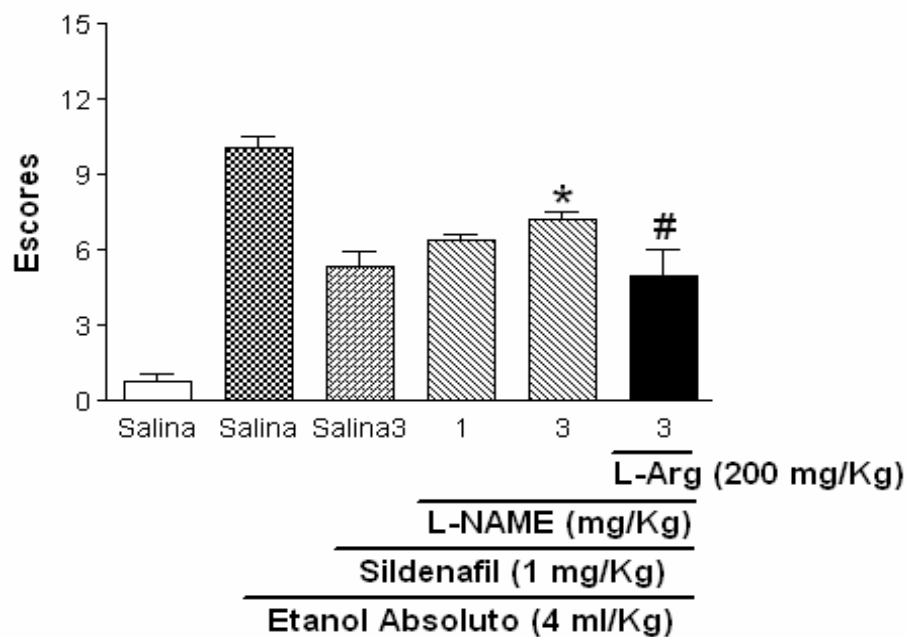


Figura 16: Avaliação microscópica do efeito do L-NAME na proteção do sildenafil à lesão gástrica induzida por álcool em ratos. Os animais receberam por via intra-peritoneal L-NAME nas doses de 1 e 3 mg/Kg ou L-Arg (200 mg/Kg). Após 30 minutos, os animais foram tratados com sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem). Uma hora após o sildenafil foi administrado etanol absoluto (4 ml/Kg, por gavagem). O grupo controle foi tratado com salina ou álcool ou sildenafil + álcool. Uma amostra do estômago foi retirada para análise microscópica, onde foram avaliados hemorragia, edema, perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório e dessaranjo da mucosa. A atividade histológica foi determinada por escores em uma escala de 0-17. A administração de L-NAME (3 mg/Kg) reverteu de forma dose dependente o efeito gastroprotetor do sildenafil. A L-Arginina (200 mg/Kg) aboliu o efeito lesivo do L-NAME na gastroproteção do sildenafil. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com sildenafil + álcool; (#) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com L-NAME 3 mg/Kg. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. Teste t de Student's.

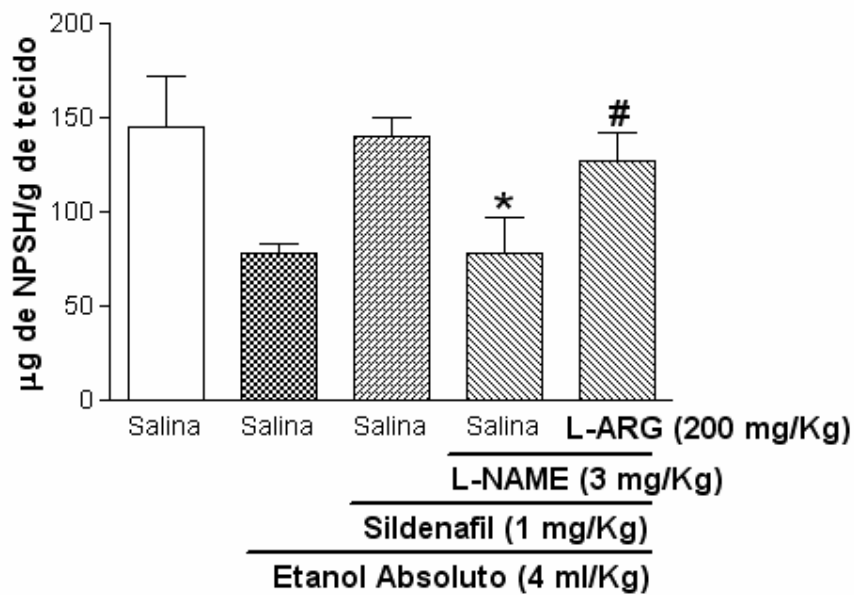


Figura 17: Determinação dos níveis de glutathione presentes na mucosa de ratos tratados com L-NAME e/ou L-ARG. Os animais receberam por via intraperitoneal L-NAME nas doses de 1 e 3 mg/Kg ou L-Arg (200 mg/Kg). Após 30 minutos, os animais foram tratados com sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem). Uma hora após o sildenafil foi administrado etanol absoluto (4 ml/Kg, por gavagem). O grupo controle foi tratado com salina ou álcool ou sildenafil + álcool. A administração de L-NAME reverteu o efeito protetor do sildenafil sobre o nível gástrico de glutathione. Nos animais pré-tratados com L-ARG houve uma tendência de reversão do efeito lesivo do L-NAME sobre a concentração de glutathione na mucosa gástrica. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com sildenafil + álcool; (#) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com L-NAME 3 mg/Kg. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

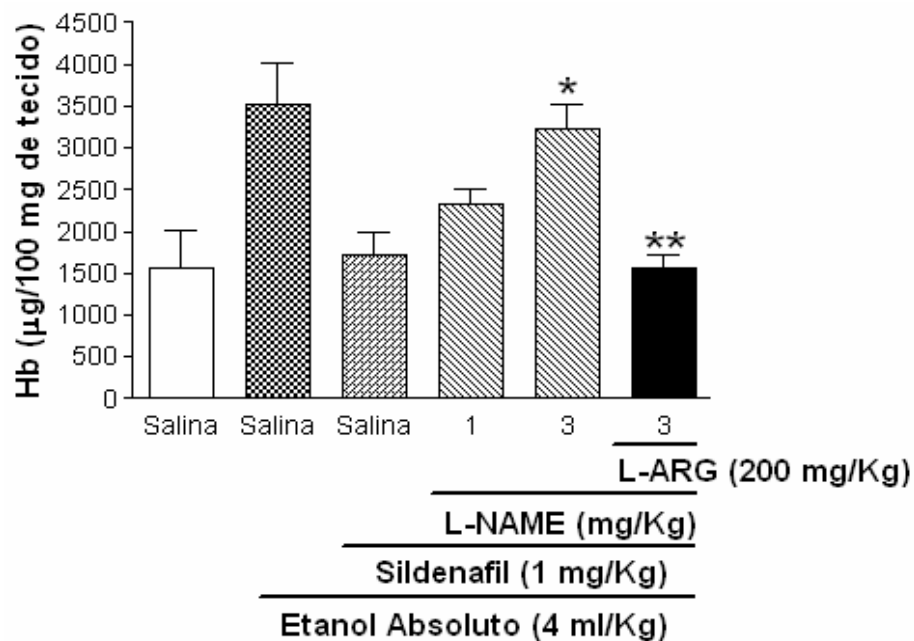


Figura 18: Determinação dos níveis de hemoglobina presentes na mucosa de ratos tratados com L-NAME. Os animais receberam por via intra-peritoneal L-NAME nas doses de 1 e 3 mg/Kg ou L-Arg (200 mg/Kg). Após 30 minutos, os animais foram tratados com sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem). Uma hora após o sildenafil foi administrado etanol absoluto (4 ml/Kg, por gavagem). O grupo controle foi tratado com salina ou álcool ou sildenafil + álcool. A administração de L-NAME aumentou o reverteu o nível gástrico de hemoglobina. Nos animais pré-tratados com L-ARG houve uma tendência de reversão do efeito lesivo do L-NAME sobre a concentração de hemoglobina na mucosa gástrica. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com sildenafil + álcool; (**) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com L-NAME 3 mg/Kg + sildenafil + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

4.3. PAPEL DO GMPc NO EFEITO PROTETOR DO SILDENAFIL NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁLCOOL EM RATOS:

Para determinar o envolvimento do NO e da guanilato ciclase na gastroproteção do sildenafil, os animais foram pré-tratados com ODQ, um inibidor seletivo do sistema guanilato ciclase-cGMP, na dose de 10 mg/Kg. Na figura 20, verifica-se que o ODQ aboliu completamente o efeito gastroprotetor do sildenafil na lesão gástrica aguda induzida por etanol absoluto.

4.3.1. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS TRATADOS COM ODQ ASSOCIADO AO SILDENAFIL:

Na tabela 3 e figura 19 (Painel B e D) observa-se que o pré-tratamento dos animais com ODQ na dose de 10 mg/Kg aboliu o efeito protetor do sildenafil sobre todos os parâmetros histopatológicos avaliados individualmente, exceto sobre a infiltração de células inflamatória.

A figura 21 mostra o resultado do somatório dos escores dos parâmetros histopatológicos avaliados, ou seja, da hemorragia (0-4 escores), do edema (0-4 escores), da perda de células epiteliais (0-3 escores), do infiltrado inflamatório (0-3 escores) e o dessaranjo da mucosa (3 escores), totalizando no máximo 14 escores. Como observado antes, o ODQ também reverteu a proteção do sildenafil com relação aos parâmetros avaliados em conjunto.

4.3.2. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS TRATADOS COM ODQ E SILDENAFIL:

De acordo com os resultados anteriores, na figura 22 verifica-se que, mais uma vez, o álcool diminuiu os níveis de glutathione na mucosa gástrica e o sildenafil aboliu esse efeito lesivo do etanol absoluto. Também observa-se que a administração de ODQ na dose de 10 mg/Kg extinguiu o efeito protetor do sildenafil sobre os níveis de glutathione, além de potencializar o efeito do álcool sobre esse tripeptídeo protetor.

4.3.3. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA NA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS TRATADOS COM ODQ E SILDENAFIL:

O pré-tratamento dos animais com ODQ na dose de 10 mg/Kg diminuiu, de forma significativa, o efeito protetor do sildenafil na lesão gástrica induzida por álcool, aumentando os níveis de hemoglobina na mucosa (figura 23).

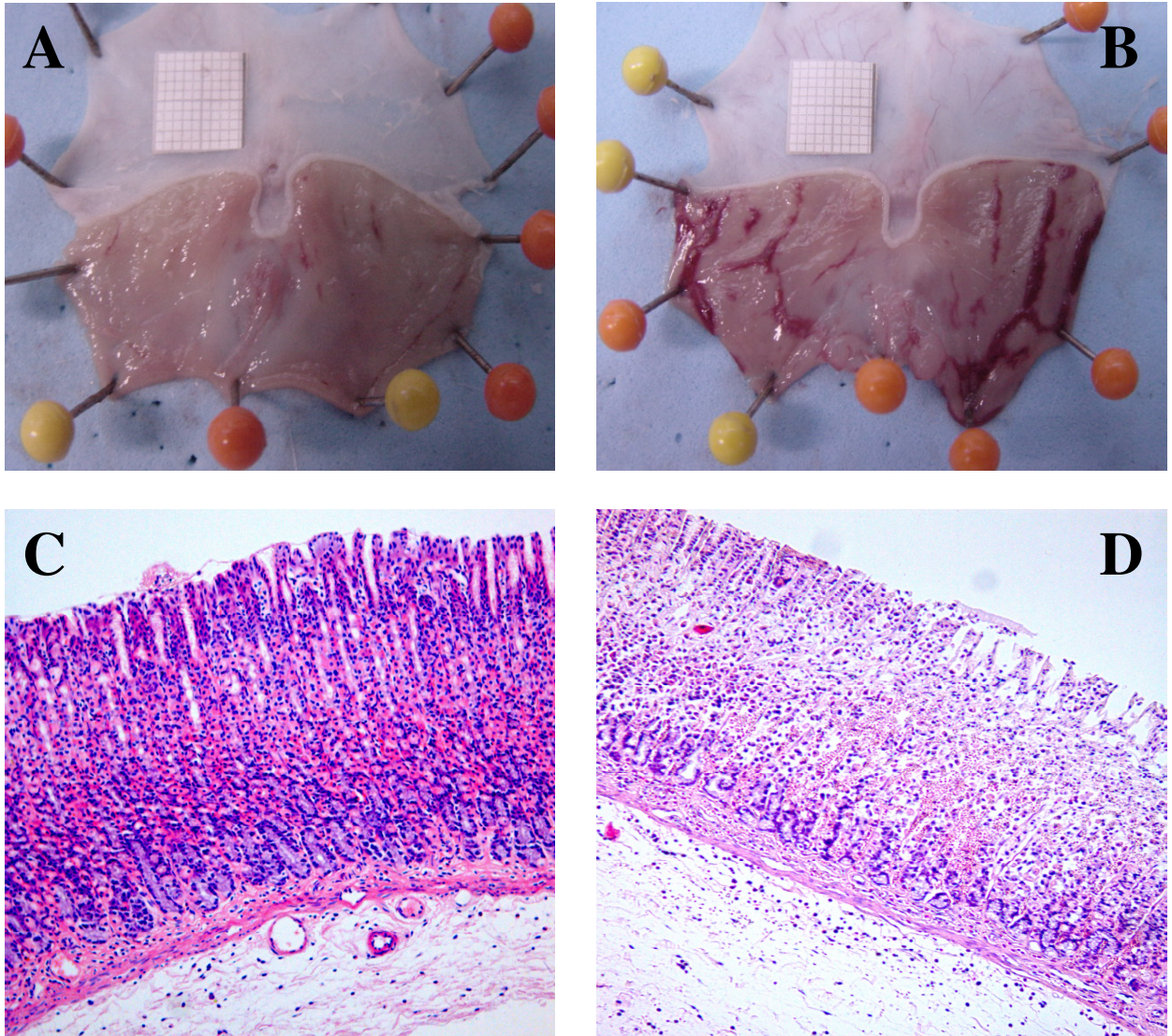


Figura 19: Efeito macroscópico e microscópico do tratamento com ODQ na lesão gástrica induzida por álcool em ratos. O ODQ reverteu a gastroproteção do sildenafil e o diazóxido aboliu o efeito lesivo da glibenclamida. Fotografias dos estômagos abertos ao longo da grande curvatura (A e B) e análise microscópica. Painel A e C: sildenafil (1 mg/Kg, v.o.) + etanol absoluto (4 ml/Kg, v.o.). Painel B e D: ODQ (10 mg/kg, v.o.) + sildenafil (1 mg/Kg, v.o.) + etanol absoluto (4 ml/Kg, v.o.).

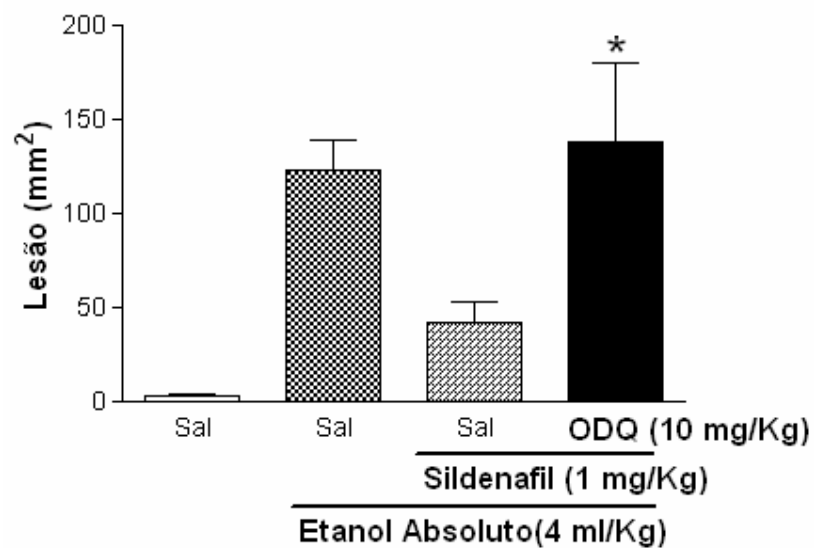


Figura 20: Efeito do tratamento com ODQ na proteção do sildenafil à lesão gástrica induzida por álcool em ratos. Os animais receberam, por gavagem, ODQ na dose de 10 mg/Kg. Após 30 minutos, os animais foram tratados com sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem). Uma hora após o sildenafil foi administrado etanol absoluto (4 ml/Kg, por gavagem). O grupo controle foi tratado com salina ou álcool ou sildenafil + álcool. A administração de etanol absoluto causou lesões severas na mucosa gástrica e o sildenafil na dose de 1 mg/Kg foi capaz de diminuir o efeito do etanol. A administração de ODQ reverteu o efeito gastroprotetor do sildenafil. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com sildenafil + álcool. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Tabela 3. Avaliação microscópica total: edema, hemorragia, perda de células epiteliais e infiltração de células inflamatórias em estômagos de ratos tratados com ODQ. Avaliação medida em escores de acordo com os critérios de Laine *et al.*, com modificações:

Tratamentos	Hemorragia (4 escores)	Edema (4 escores)	Perda de Células (3 escores)	Infiltrado Inflamatório (3 escores)	Dessaranjo da mucosa (3 escores)
Salina	0 (0 – 1)	0	0 (0-1)	0	0
Salina + Etanol	3 (2 – 4)	3 (2 – 3)	2 (1 – 3)	0	3 (2 – 3)
Salina + Etanol + Sildenafil	1 (0 – 1)	2 (0 – 2)	1 (1 – 2)	0	2 (0 – 3)
Salina + Etanol + Sildenafil + ODQ	3 (0 – 4)*	4 (0 – 4)*	1 (0 – 2)	0	3 (0 – 3)

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente. Teste de Kruskal-Wallis (*) = $p < 0,05$ vs controle (salina + etanol + sildenafil)

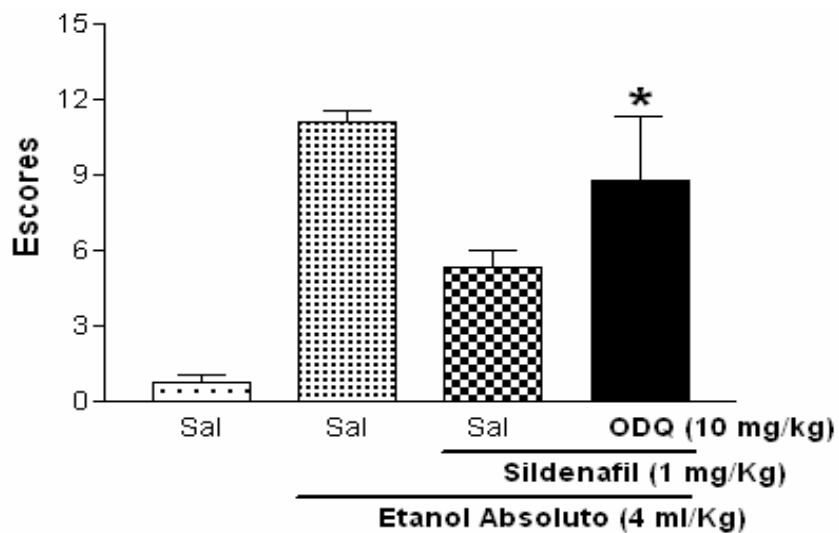


Figura 21: Avaliação microscópica do efeito do ODQ na proteção do sildenafil à lesão gástrica induzida por álcool em ratos. Os animais receberam, por gavagem, ODQ na dose de 10 mg/Kg. Após 30 minutos, os animais foram tratados com sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem). Uma hora após o sildenafil foi administrado etanol absoluto (4 ml/Kg, por gavagem). O grupo controle foi tratado com salina ou álcool ou sildenafil + álcool. O ODQ reverteu o efeito gastroprotetor do sildenafil. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com sildenafil + álcool. Teste t de Student's.

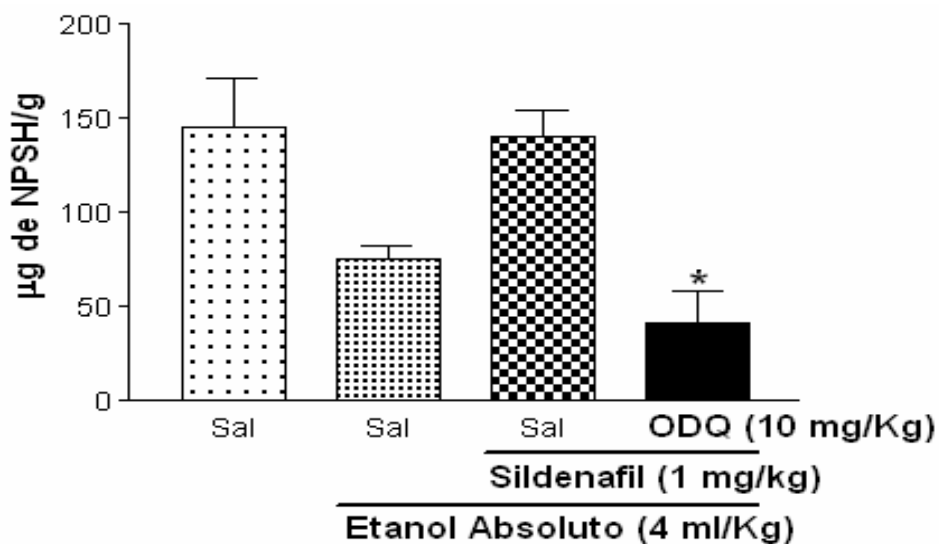


Figura 22: Determinação dos níveis de glutathiona presentes na mucosa de ratos tratados com ODQ. Os animais receberam, por gavagem, ODQ na dose de 10 mg/Kg. Após 30 minutos, os animais foram tratados com sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem). Uma hora após o sildenafil foi administrado etanol absoluto (4 ml/Kg, por gavagem). O grupo controle foi tratado com salina ou álcool ou sildenafil + álcool. A administração de ODQ reverteu o efeito protetor do sildenafil sobre o nível gástrico de glutathiona. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com sildenafil + álcool. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

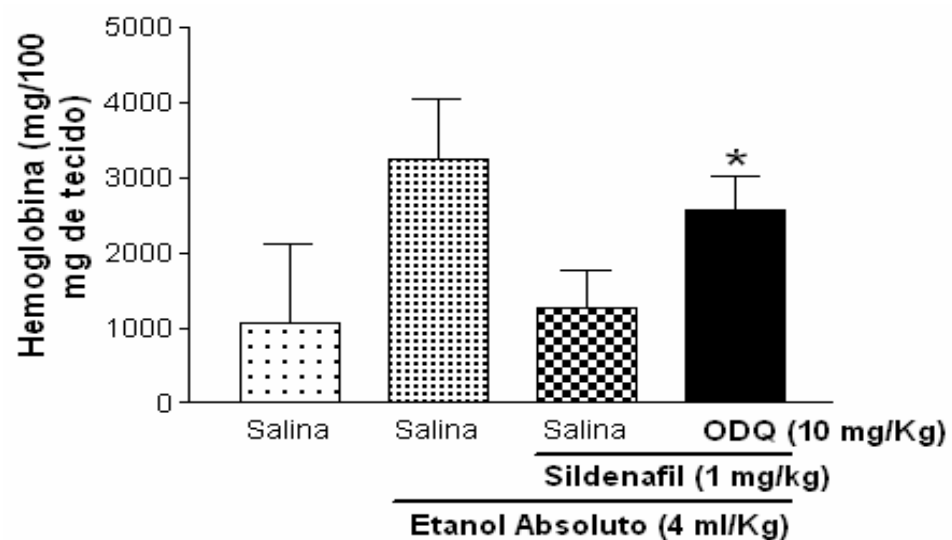


Figura 23: Determinação dos níveis de hemoglobina presentes na mucosa de ratos tratados com ODQ. Os animais receberam, por gavagem, ODQ na dose de 10 mg/Kg. Após 30 minutos, os animais foram tratados com sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem). Uma hora após o sildenafil foi administrado etanol absoluto (4 ml/Kg, por gavagem). O grupo controle foi tratado com salina ou álcool ou sildenafil + álcool. A administração de ODQ aumentou a lesão hemorrágica produzida pelo álcool e, portanto, aumentou o nível gástrico de hemoglobina. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com sildenafil + álcool. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

4.4. PAPEL DOS CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP NA PROTEÇÃO DO SILDENAFIL À LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁLCOOL EM RATOS:

Esse estudo comparou o envolvimento dos canais de potássio na gastroproteção do sildenafil. Observando a figura 25, podemos ver que, mais uma vez, a administração de etanol absoluto causou grandes lesões na mucosa gástrica, efeito este bastante atenuado pelo sildenafil. Na figura 25 também verifica-se que o bloqueio dos canais de potássio pela glibenclamida, em todas as doses testadas (0,1, 0,3 e 1 mg/Kg), aumentou significativamente os danos no estômago induzidos pelo álcool, revertendo o efeito protetor do sildenafil.

A inibição da proteção do sildenafil induzida pela glibenclamida foi abolida pelo pré-tratamento dos animais com diazóxido (3 mg/Kg), que é um ativador dos canais de potássio ATP dependentes.

Ainda na figura 25 observa-se que o diazóxido (3 mg/Kg) sozinho não foi capaz de reverter os lesões provocadas pelo etanol na mucosa gástrica. Entretanto, quando o diazóxido foi administrado concomitantemente com o sildenafil (1 mg/Kg) a gastroproteção do sildenafil retornou.

4.4.1. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS TRATADOS COM GLIBENCLAMIDA E/OU DIZÓXIDO:

Na tabela 4 observa-se que o pré-tratamento com glibenclamida, e todas as doses testadas, aboliu o efeito protetor do sildenafil, aumentando a hemorragia provocada pelo etanol na mucosa gástrica. De forma semelhante, a glibenclamida produziu o mesmo efeito sobre o edema, a perda de células epiteliais e dessaranjo da mucosa, não influenciando na migração celular. Ainda na tabela 4 verifica-se que a administração de diazóxido 30 minutos antes da glibenclamida diminui de forma significativa seu efeito deletério

A figura 26 mostra o resultado do somatório dos escores de todos os parâmetros histopatológicos avaliados, ou seja, da hemorragia (0-4 escores), do edema (0-4 escores), da perda de células epiteliais (0-3 escores), do infiltrado inflamatório (0-3 escores) e o dessarano da mucosa (3 escores), totalizando no máximo 14 escores. Verifica-se que a glibenclamida reverteu a proteção do sildenafil e que o diazóxido diminuiu esse efeito.

4.4.2. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS TRATADOS COM GLIBENCLAMIDA E/OU DIZÓXIDO:

A administração de glibenclamida aboliu o efeito do sildenafil e aumentou o efeito negativo do álcool sobre os níveis de glutaciona, reduzindo de forma acentuada a concentração dos grupos sulfidrilas em todas as doses utilizadas (0,1, 0,3 e 1 mg/Kg) (figura 27). Também observa-se que com a administração de diazóxido na dose de 3 mg/Kg, dose única, os níveis de glutaciona voltaram a aumentar, embora não fosse significativo quando comparado aos tratamentos com glibenclamida.

Na figura 27, demonstra-se que o diazóxido sozinho na dose de 3 mg/Kg é capaz de reverter o efeito negativo do álcool absoluto sobre a concentração de glutaciona. Entretanto, ele não potencializa o efeito do sildenafil sobre os níveis de glutaciona.

4.4.3. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA NA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS TRATADOS COM L-NAME E/OU L-ARGININA:

O pré-tratamento dos animais com glibenclamida nas doses de 0,3 e 1 mg/Kg reverteu totalmente o efeito protetor do sildenafil na lesão gástrica induzida por álcool, aumentando os níveis de hemoglobina na mucosa, o que significa que há uma piora da hemorragia (figura 28).

A figura 28 também mostra que a adição de diazóxido 3 mg/kg reverteu significativamente ($p < 0,05$) o efeito da glibenclamida sobre o nível gástrico de hemoglobina. Esses resultados indicam que o efeito gastroprotetor do sildenafil pode ser devido a abertura dos canais de potássio ATP-dependentes.

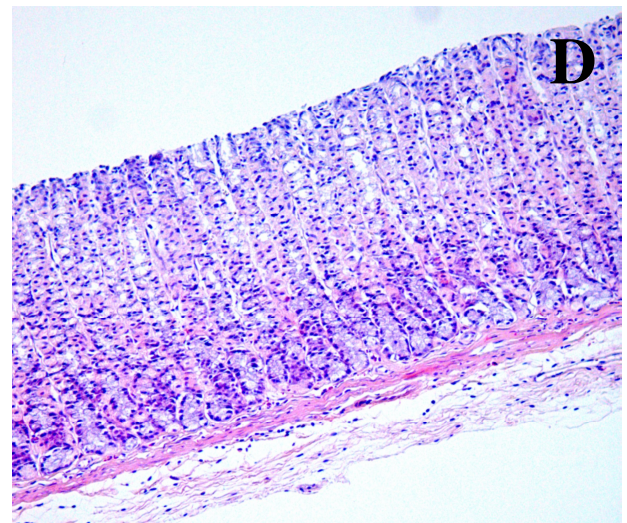
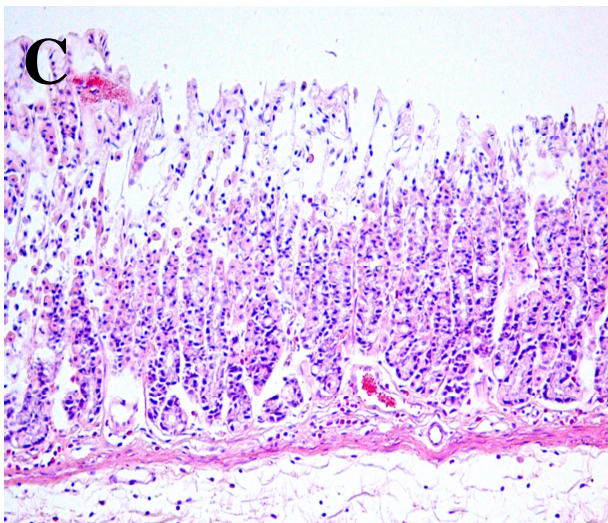
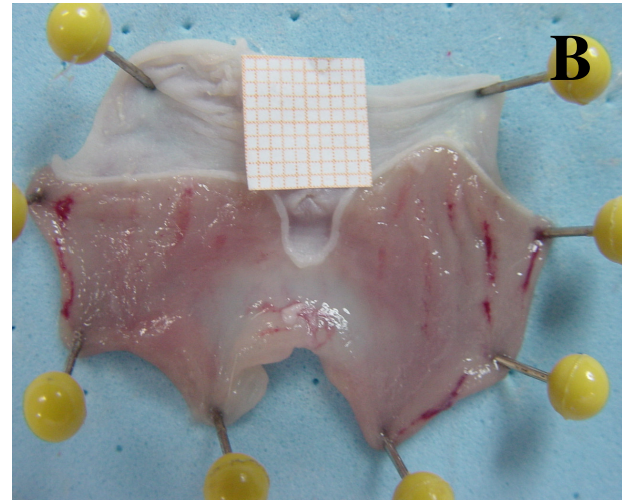
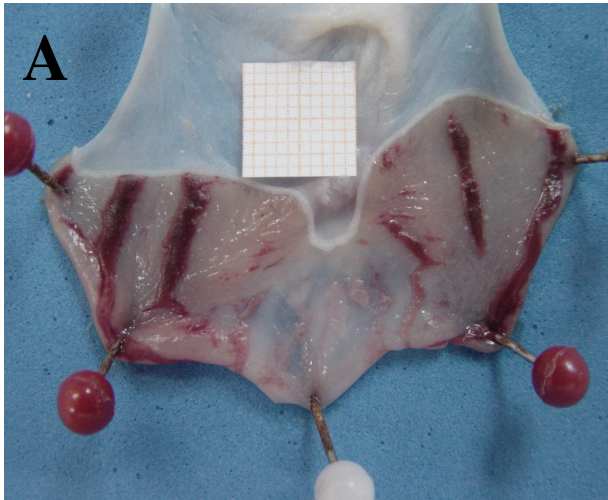


Figura 24: Efeito macroscópico e microscópico do tratamento com glibenclamida e/ou diazóxido na lesão gástrica induzida por álcool em ratos. A glibenclamida reverteu a gastroproteção do sildenafil e o diazóxido aboliu o efeito lesivo da glibenclamida. Fotografias dos estômagos abertos ao longo da grande curvatura (A e B) e análise microscópica. Painel A e C: glibenclamida (1 mg/kg, v.o) + sildenafil (1 mg/Kg, v.o) + etanol absoluto (4 ml/Kg, v.o.). Painel B e D: Diazóxido (3 mg/kg, i.p) + glibenclamida (1 mg/kg, v.o) + sildenafil (1 mg/Kg, v.o) + etanol absoluto (4 ml/Kg, v.o.).

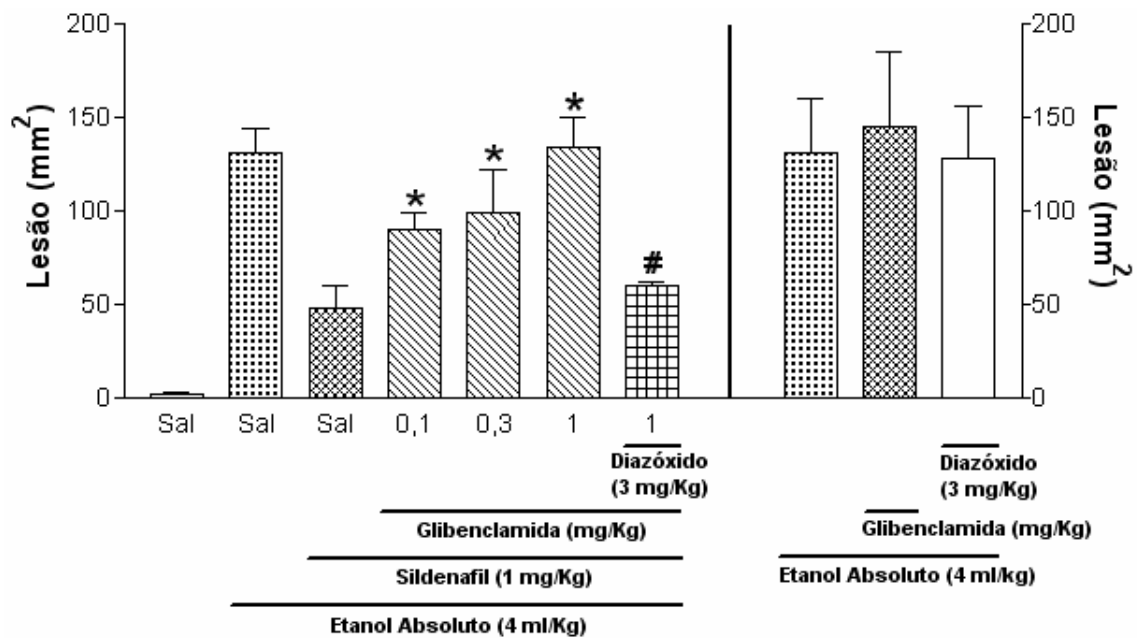


Figura 25: Efeito do tratamento com glibenclamida e diazóxido na proteção do sildenafil contra a lesão gástrica induzida por etanol absoluto. Os animais receberam por via oral glibenclamida (0,1, 0,3, 1 ou 3 mg/kg) e por via-intraperitoneal diazóxido (3 mg/Kg). Após 1 hora foi administrado sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem). Decorridos 60 minutos, a lesão gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de etanol absoluto na dose de 4 ml/kg. O grupo controle foi tratado com salina. O tratamento com glibenclamida reverteu a proteção do sildenafil à lesão gástrica induzida por etanol. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com sildenafil + etanol; (#) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com Glibenclamida 1 mg/Kg. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Tabela 4. Avaliação microscópica total: edema, hemorragia, perda de células epiteliais e infiltração de células inflamatórias em estômagos de ratos tratados com glibenclamida ou glibenclamida + diazóxido. Avaliação medida em escores de acordo com os critérios de Laine *et al.*, com modificações.

Tratamentos	Hemorragia (4 escores)	Edema (4 escores)	Perda de Células (3 escores)	Infiltrado Inflamatório (3 escores)	Dessaranjo da mucosa (3 escores)
Salina	0 (0 – 1)	0	0 (0-1)	0	0
Salina + Etanol	2 (1 – 4)	2,5 (2 – 3)	2 (1 – 3)	0	3 (2 – 3)
Salina + Etanol + Sildenafil	0,5 (0 – 1)	2 (0 – 2)	1 (1 – 2)	0	2 (0 – 3)
Salina + Etanol + Sildenafil + Glib. 0,1 mg/Kg	2 (1 – 4)*	4 *	1,5 (1 – 3)	0	3
Salina + Etanol + Sildenafil + Glib. 0,3 mg/Kg	2 (1 – 4)*	4 (1 – 4)*	2 (1 – 3)	0	3 (0 – 3)
Salina + Etanol + Sildenafil + Glib. 1 mg/Kg	2 (1 – 4)*	4 (3 – 4)*	2 (1 – 3)	0	3 (1 – 3)
Salina + Etanol + Sildenafil + Glib. 1 mg/Kg + Diazóxido 3 mg/kg	1 (0 – 4)	1 (0 – 3)#	1 (0 – 2)	0	1 (0 – 2)#

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente. Teste de Kruskal-Wallis

(*) = $p < 0,05$ vs controle (salina + etanol + sildenafil)

(#) = $p < 0,05$ vs salina + etanol + sildenafil + glibenclamida 1 mg/Kg

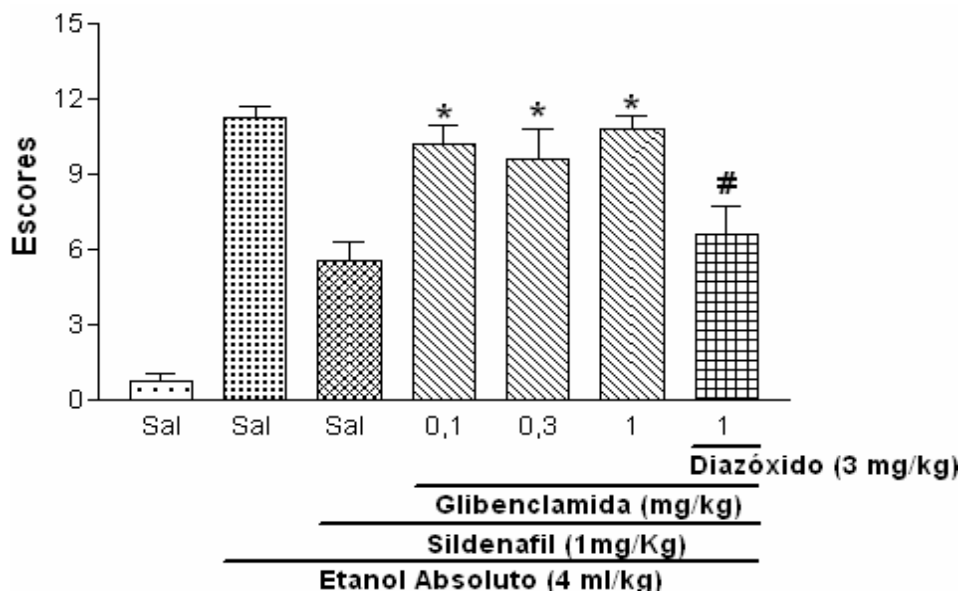


Figura 26: Avaliação microscópica do efeito da glibenclamida sozinha ou com diazóxido na proteção do sildenafil à lesão gástrica induzida por álcool em ratos. Os animais receberam por via oral glibenclamida (0,1, 0,3, 1 ou 3 mg/kg) e por via-intraperitoneal diazóxido (3 mg/Kg). Após 1 hora foi administrado sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem). Decorridos 60 minutos, a lesão gástrica gástrica foi induzida pela administração, por gavagem, de etanol absoluto na dose de 4 ml/kg. O grupo controle foi tratado com salina. Uma amostra do estômago foi retirada para análise microscópica, onde foram avaliados hemorragia, edema, perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório e dessaranjo da mucosa. A atividade histológica foi determinada por escores em uma escala de 0-17. A administração da glibenclamida em todas as doses utilizadas reverteu o efeito gastroprotetor do sildenafil. O diazóxido (3 mg/Kg) aboliu o efeito lesivo da glibenclamida na gastroproteção do sildenafil. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com sildenafil + etanol; (#) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com Glibenclamida 1 mg/Kg Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. Teste t de Student's.

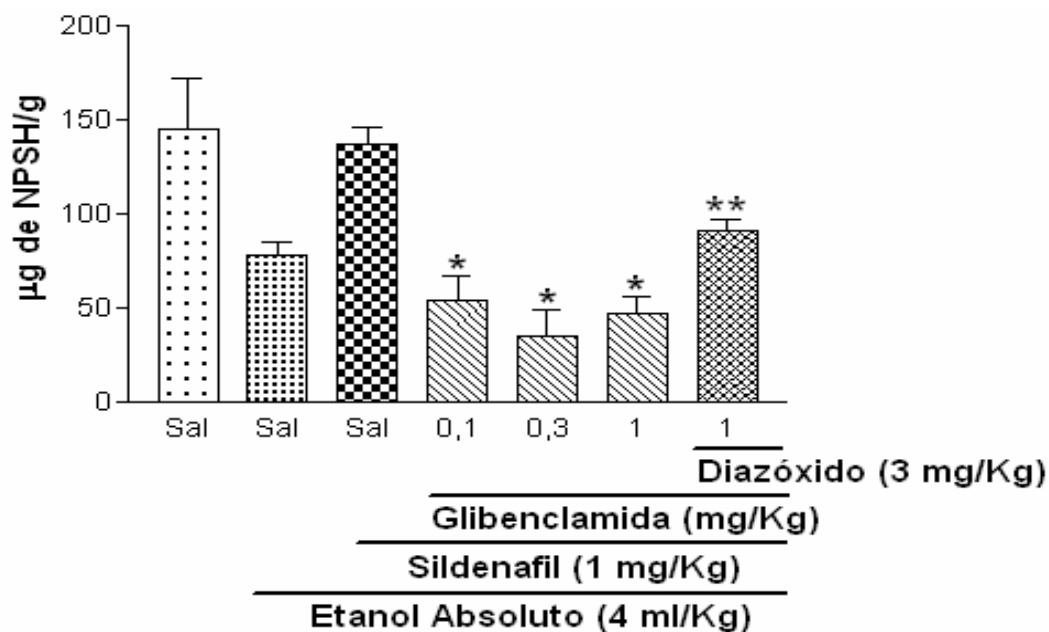


Figura 27: Determinação dos níveis de glutatona presentes na mucosa de ratos tratados com glibenclamida e/ou diazóxido. Os animais receberam, por via oral, glibenclamida nas doses de 0,1, 0,3 e 1 mg/Kg ou Diazóxido (3 mg/Kg, por via intra-peritoneal). Após 1 hora, os animais foram tratados com sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem). Uma hora após o sildenafil foi administrado etanol absoluto (4 ml/Kg, por gavagem). O grupo controle foi tratado com salina ou álcool ou sildenafil + álcool. A administração de glibenclamida, em todas as doses testadas, reverteu o efeito protetor do sildenafil sobre o nível gástrico de glutatona. Nos animais pré-tratados com diazóxido houve uma tendência de reversão do efeito lesivo da glibenclamida sobre a concentração de glutatona na mucosa gástrica. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com sildenafil + álcool; (**) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com glibenclamida 1 mg/Kg. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

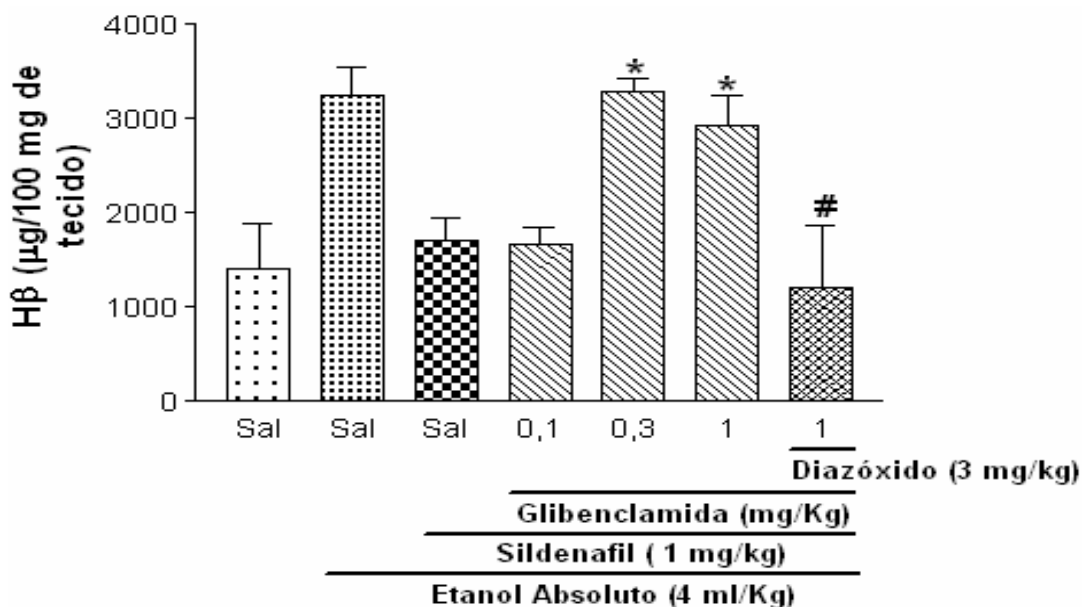


Figura 28: Determinação dos níveis de hemoglobina presentes na mucosa de ratos tratados com glibenclamida e/ou diazóxido. Os animais receberam, por via oral, glibenclamida nas doses de 0,1, 0,3 e 1 mg/Kg ou diazóxido (3 mg/Kg, por via intra-peritoneal). Após 1 hora, os animais foram tratados com sildenafil (1 mg/Kg, por gavagem). Uma hora após o sildenafil foi administrado etanol absoluto (4 ml/Kg, por gavagem). O grupo controle foi tratado com salina ou álcool ou sildenafil + álcool. A administração de glibenclamida nas doses de 0,3 e 1 mg/Kg aumentou o nível gástrico de hemoglobina. Nos animais pré-tratados com diazóxido houve reversão do efeito lesivo da glibenclamida sobre a concentração de hemoglobina na mucosa gástrica. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com sildenafil + álcool; (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com glibenclamida 1 mg/Kg. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

V. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O álcool é um dos principais agressores da mucosa gástrica em homens. Essa substância é conhecida como uma toxina entérica, afetando a estrutura e função de vários elementos do trato gastrointestinal, além de causar efeitos no sistema nervoso central. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2002), o consumo abusivo de etanol é responsável por 29% das hospitalizações em homens, constituindo-se o quinto fator de risco mais importante, podendo contribuir para o desenvolvimento de inúmeras doenças.

Entre as complicações mais graves do trato gastrointestinal, que podem ser provocadas pelo consumo indiscriminado e de forma crônica de etanol, estão a gastrite e as úlceras gástricas (caracterizadas por edema na mucosa, hemorragia, infiltrado inflamatório e aumento da permeabilidade vascular), refluxo gastro-esofágico, diarreia (efeito sobre a absorção de nutrientes no intestino) e pancreatite crônica (SIEGMUND et al, 2002; BECK et al, 1986; DINDA et al, 1996; PITCHUMONI, 2001).

O modelo de lesão gástrica induzido por etanol é um dos principais modelos de lesão gástrica utilizados em pesquisa. O modelo de injúria gástrica induzida por etanol provoca as lesões por solubilização do muco protetor e desta forma a mucosa fica indefesa à ação hidrolítica e proteolítica do ácido clorídrico e da pepsina, respectivamente. O contato com o álcool também leva ao aumento da secreção ácida e alteração da rede vascular local, por rompimento dos vasos sanguíneos que irrigam a mucosa gástrica (OATES E HAKKINEN, 1988).

O álcool tem sido implicado como o responsável por um número grande de doenças, estando associado a altos níveis de morbidade e mortalidade (MURRAY & LOPEZ, 1997; TAYLOR & REHM, 2006). Os efeitos agudos do etanol são verificados de imediato no trato gastrointestinal (TGI). Quando o álcool é consumido, ele passa por vários segmentos do TGI, afetando a estrutura e função destes segmentos e, interferindo na função dos músculos que separam o esôfago do estômago, favorecendo a ocorrência de refluxo gastroesofágico, além de aumentar o risco de câncer de esôfago. No estômago, o álcool interfere na secreção de ácido gástrico, na integridade da mucosa, na microcirculação e na musculatura gástrica.

Similarmente, essa droga pode interferir no movimento do intestino, contribuindo para a diarreia. Além disso, o álcool inibe a absorção de nutrientes na parede intestinal e aumenta a absorção de toxinas, efeito que pode contribuir para danos no fígado e outros órgãos (BODE & BODE, 1997).

Hoje, podem-se obter benefícios clínicos no tratamento da gastrite ou úlcera péptica com o uso de diversas classes de drogas, como os antiácidos e antissecretores. Contudo o tratamento da gastropatia alcoólica permanece limitado a medidas de suporte ou simplesmente no ato de parar de beber. Indubitavelmente, a terapia eficaz para impedir a gastropatia alcoólica poderia ser conseguida investigando os mecanismos subjacentes que contribuem para o ferimento da mucosa gástrica ou a correção de falhas induzidas pelo álcool (LEE et al., 2005). Consequentemente, sinalizar as moléculas preferencialmente envolvidas na gastropatia alcoólica poderia ser um alvo final para a prevenção dessa enfermidade, podendo ser mais valioso do que a simples abstinência ou o uso de bloqueadores de ácido gástrico. Portanto, a busca de substâncias que diminuam esses efeitos provocados pelo álcool é de suma importância para a sociedade, e entre a terapia endoscópica e cirúrgica, a farmacoterapia pode realçar os mecanismos de defesa. Baseado nisso, o nosso trabalho teve como objetivo determinar o efeito gastroprotetor do sildenafil e a participação da via NO/GMPc/K_{ATP} na proteção do sildenafil sobre a lesão gástrica induzida por álcool em ratos.

Nossos dados mostram que a administração de etanol absoluto induziu uma importante lesão gástrica hemorrágica. É bem conhecido que a administração de etanol em altas concentrações causa severas lesões na mucosa gástrica, envolvendo extensas hemorragias e destruição de tecido (LACY, 1988). Além disso, o etanol induz distúrbios da microcirculação, isquemia, liberação de endotelina, degranulação de mastócitos, inibição de prostaglandinas e diminuição da produção de muco (SAMONINA et al., 2004). O termo “gastrite hemorrágica” é usado para descrever o aparecimento de hemorragias subepiteliais no estômago e pacientes com gastrite hemorrágica subepitelial podem ter também gastrite histológica associada. Patofisiologicamente, a lesão gástrica provocada pelo álcool é mediada ou modulada por diversos fatores tais como a ciclooxigenase, lipoxigenase, citocinas, tromboxanos e radicais livres derivados do oxigênio (SAIKA et al., 2000; TARNAWISKI et al., 1998).

Histologicamente, o nosso trabalho mostrou que o etanol absoluto (4 ml/kg) provocou hemorragia, edema, perda de células epiteliais e desarranjo da mucosa. Esses resultados estão de acordo com outros autores que mostram que o etanol provoca, microscopicamente, hemorragias subepiteliais focais na mucosa gástrica e que esses efeitos são devidos diretamente a seus efeitos tóxicos e indiretamente causados por mediadores como COX, citocinas, radicais livres e outras moléculas de sinalização provocando inflamação ou apoptose ou pela redução do fluxo sanguíneo gástrico (GOTTFRIED et al., 1978; PARL et al., 1979; LEE et al., 2005; SZABO et al., 1985). Além disso, o etanol promove a peroxidação de lipídios e a ativação de NF- κ B que são eventos críticos responsáveis pela hemorragia e edema nas células musculares lisas e endoteliais (ALTURA & GEBREWOLD, 2002; JONSSON & PALMBLAD, 2001). No nosso estudo, não houve migração de células inflamatórias para a mucosa gástrica, provavelmente devido ao curto tempo de lesão (1 hora). Porém, Lieber (1997) e Lee e colaboradores mostram que a administração de etanol aumenta a resposta inflamatória juntamente com infiltração de células inflamatórias para a mucosa gástrica (LIEBER, 1997; LEE et al., 2005). Assim a proteção histológica e a proteção da integridade vascular são os dois principais critérios de gastroproteção (KO et al., 1997).

A manutenção da integridade da mucosa gástrica depende, entre outros fatores, de um balanço entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras. As prostaglandinas e o óxido nítrico, que são vasodilatadores endoteliais, preservam a integridade da mucosa gástrica por providenciar um fluxo sanguíneo adequado (WITTLE et al., 1990; LIPPE & HOLZER 1992). O NO também aumenta a produção de muco e secreção de bicarbonato no trato gastrintestinal (MUSCARA & WALLACE, 1999).

O nosso estudo demonstra que o sildenafil (inibidor da fosforodiesterase 5) em doses baixas (0,1, 0,3 e 1 mg/Kg), possui um efeito gastroprotetor na gastropatia induzida por álcool, diminuindo a extensão da lesão gástrica macro e microscópica, bem como a hemorragia, medida pela concentração de hemoglobina na mucosa. Está estabelecido na literatura que o tratamento de diversas doenças como disfunção erétil e doenças pulmonares e cardiovasculares envolve a modulação da via de sinalização NO/GMPc (ZANG et al., 2004). Recentemente, foi demonstrado que o sildenafil, tanto em humanos (BORTOLOTTI et al., 2001) quanto em animais (ROSALMEIDA et al., 2003), diminui a motilidade gastrintestinal. Por outro lado, há poucos estudos avaliando o efeito do sildenafil na defesa da mucosa

gástrica e o nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a avaliar o efeito do sildenafil no modelo de inflamação gástrica, onde foi demonstrado que o sildenafil, atuando via NO, previne a gastropatia induzida por indometacina em ratos, possivelmente devido a uma redução da adesão de leucócitos e manutenção do fluxo sanguíneo gástrico (SANTOS et al., 2005).

Neste estudo, nós também investigamos o papel da glutathiona (GSH) na proteção gástrica do sildenafil à lesão provocada pelo etanol. A administração de etanol absoluto, em nossos experimentos, diminuiu consideravelmente o nível gástrico de GSH, provavelmente devido ao consumo destes pelos radicais livres. O sildenafil, quando administrado antes do álcool aumentou a glutathiona para os níveis normais, causando proteção. Este efeito do sildenafil pode ter ocorrido devido a um menor consumo de GSH por uma inibição da liberação de radicais livres, ou por um aumento na síntese de novo de GSH. Nossos dados estão de acordo com outros autores que mostram que o etanol depleta o nível de glutathiona nos tecidos do estômago e que a restauração parece ser importante na gastroproteção (TRIER et al., 1987; OLIVEIRA et al., 2004; SZABO et al., 1981). SMITH et al. (1996) também demonstrou que o efeito lesivo do álcool no estômago é diminuído pelo aumento da concentração de glutathiona. A mucosa gástrica possui uma alta concentração basal de glutathiona, que funciona como um antioxidante (MUTOH et al., 1990). A glutathiona é um tripeptídeo que possui função protetora contra agentes agressores, eliminando radicais livres endógenos derivados do oxigênio. Vários estudos têm demonstrado que a glutathiona possui um importante papel na defesa da mucosa gástrica (SZABO et al., 1981; BOYD et al., 1981). Assim, diversas substâncias conhecidas por causar lesão na mucosa gástrica foram associadas à diminuição dos níveis de glutathiona, provocando injúrias e um dos principais mecanismos de gastroproteção é aumentar a concentração de glutathiona.

Uma vez demonstrado que a injúria provocada pelo álcool independe da secreção de ácido gástrico e do pH do lúmen, alguns agentes mucoprotetores, incluindo prostaglandinas ou drogas equivalentes, mostraram ser efetivas na prevenção na lesão gástrica induzida por etanol (LEE et al., 2005). Por instância, o 4-metilpirazolo (IAQUINTO et al., 1998), a glutathiona (LOGUERCIO et al., 1999), o ornoprostil (KOBAYASHI et al., 1991), misoprostol (BLANDIZZI et al., 1995) e wogonina (PARK et al., 2004), mostraram ser preventivas da gastrite alcoólica.

Nós verificamos nos experimentos que o sildenafil em doses mais altas (acima de 10 mg/Kg) não possui efeito gastroprotetor e que ainda há uma potencialização do efeito do etanol na mucosa gástrica (dados não mostrados). Outros autores também mostraram que em altas concentrações, os inibidores de fosfodiesterases do tipo 5 como o sildenafil, vardenafil e tadalafil aumentam adicionalmente o cGMP por inibir outras fosfodiesterases, como a fosfodiesterase do tipo 1 dependente de Ca^{++} /calmodulina, aumentando de forma demasiada a vasodilatação e, com isso, provocando dores de cabeça e distúrbios gastrintestinais e por inibir a fosfodiesterase do tipo 6, prejudicando a atividade da retina causando, assim, distúrbios visuais (LATIES & ZRENNER, 2002 ; ROSIEN & KOSTIS, 2003; SCHLOSSMANN & ROFMANN, 2005).

Nós observamos que o efeito gastroprotetor do sildenafil contra a lesão gástrica induzida por álcool em ratos é revertido com o co- tratamento com L-NAME (um inibidor não específico das enzimas NO sintases) sozinho, mas não com o co- tratamento L-NAME + L-arginina (um substrato da NOS). Assim, nossos resultados mostram que o efeito do sildenafil depende da presença de NO, pois a inibição da produção de NO endógeno reverte o seu efeito. MacNaughton e colaboradores reportaram que a lesão gástrica causada por etanol pode ser significativamente reduzida pela administração de um doador de NO (MACNAUGHTON et al., 1989). Esses achados estão de acordo com outros da literatura, na qual SANTOS et al. (2005) mostrou efeito semelhante do sildenafil na lesão gástrica por indometacina. LAMARQUE & WHITTLE (2001) também mostraram que a liberação de baixas doses de NO protege contra a gastropatia induzida por AINES e ELLIOT et al. (1995) demonstrou que o NO acelera a cicatrização de úlceras em ratos provocada pelos AINES. Porém, nosso trabalho é o primeiro a mostrar esse efeito do sildenafil na lesão por etanol. Sabe-se também que a L-arginina induz um aumento na concentração dos níveis de cGMP nas glândulas gástrica isoladas de coelhos, causando citoproteção (CONTRERAS et al., 1997). Além disso, a L-arginina acelera a cicatrização da úlcera gástrica devido ao realce da microcirculação e angiogênese (BRZOZWSKI et al., 1997; KONTUREK et al., 1993). Por outro lado, o L-NAME atrasa a cicatrização da injúria gástrica aguda e prolonga a cicatrização das úlceras gástricas crônicas (KONTUREK et al., 1993). Foi demonstrado também que o L-NAME aumenta e a L-arginina diminui a quantidade e intensidade da lesão provocada por álcool no estômago de ratos (NAHAVANDI et al., 1999).

Como foi comentado anteriormente, o sildenafil atua através da inibição da fosfodiesterase 5 (PDE5), uma enzima responsável pela degradação do cGMP que é um segundo mensageiro importante e sua produção é estimulada pelo NO. É conhecido que os processos de modulação neuronal tais como a liberação de mediadores vasoativos é crucial para a resistência da mucosa gástrica contra agentes agressores (KO et al., 2004; YONEI et al., 1990). WHITTLE et al. (1990) sugeriu que há uma interação entre mediadores vasodilatadores derivados do endotélio, incluindo as prostaglandinas (PGs), e que eles podem regular a microcirculação e a integridade da mucosa gástrica. As células endoteliais também liberam óxido nítrico (NO) que medeia o relaxamento vascular induzido por estimulação vagal (PALMER et al., 1987).

O NO possui um papel importante de modulação dos componentes fisiológicos e de defesa do trato gastrointestinal, incluindo o controle da motilidade gastrointestinal (UEKI et al., 1988), fluxo sanguíneo gástrico (WHITTLE et al., 1981), adesão de neutrófilos (KUBES et al., 1991; MAY et al., 1991) e secreção de muco (WALLACE & MILLER, 2000).

Foi relatado que ativação da isoforma cálcio-independente (induzível) da NO sintase, que produz grandes quantidades de NO, provoca injúria nas células endoteliais gástricas (PALMER et al., 1992). Entretanto a formação de NO induzido pela forma constitutiva da NO sintase pode ser benéfica, uma vez que participa da modulação da integridade da mucosa gástrica (TEPPERMAN & WHITTLE, 1992). KO et al. (2004) verificou que a administração de etanol 50% não influencia a atividade da NO sintase induzida, porém inibe a atividade da NO sintase constitutiva, provocando perda da integridade da mucosa.

O GMPc é um nucleotídeo sintetizado no interior da célula pela ação de uma enzima conhecida como guanilato ciclase. Esta enzima é ativada por NO, formando cGMP a partir do ATP (BEAVO, 1995; POLSON & STRADA, 1996). A produção do cGMP é o principal mecanismo pelo qual o NO produz muitos dos seus efeitos fisiológicos. Há evidências que o NO e o cGMP podem atuar sobre diversos alvos como as proteínas quinases cGMP-dependente, as fosfodiesterases reguladas por cGMP e diferentes tipos de canais de potássio (BOLOTINA et al., 1994; HAN et al., 2002; LEVY & STRASSMAN, 2004). A importância das proteínas quinases no trato gastrointestinal foi demonstrada pela deleção do

seu gene em camundongos, que induziu disfunções gastrintestinais, incluindo dilatação do estômago e ceco, contração pilórica e distúrbios na motilidade gastrintestinal (NY et al., 2000).

O nosso trabalho mostrou que a inibição da enzima guanilato ciclase e, conseqüente inibição da formação de GMPc elimina o efeito gastroprotetor do sildenafil na lesão provocada por etanol absoluto. Neste experimento foi utilizado como ferramenta farmacológica o ODQ na concentração de 10 mg/kg (um inibidor altamente seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel). Foi demonstrado também que a inibição da guanilato ciclase aumentou a hemorragia e o edema na mucosa, além de diminuir os níveis de glutathione na mucosa gástrica. Assim, esse experimento mostrou que a gastroproteção do sildenafil é dependente do NO derivado do sildenafil, e que seus efeitos benéficos na mucosa gástrica envolve a guanilato ciclase intracelular e o GMPc. O ODQ é potencialmente muito significativo para reconhecer compostos com evidência de envolvimento da guanilato ciclase solúvel (BOHLE, 1998). Sakai e colaboradores obtiveram resultados semelhantes aos nossos, na qual mostraram que o GMPc e o NO protegem as células parietais da citotoxicidade provocada pelo etanol e que a citoproteção dependente de GMPc está relacionada a ativação da via NO/cGMP e a abertura dos canais de cloro basolaterais (SAKAY et al., 1995). Hillinger e colaboradores mostraram que a aplicação de 8-Bromo-GMPc (um análogo do GMPc que ativa proteína quinases) melhora a resistência vascular pulmonar, aumenta o fluxo sanguíneo, melhora a oxigenação arterial, diminui a infiltração de neutrófilos e diminui o edema no pulmão pós-transplantado (HILLINGER et al., 1999). Um fato curioso é que a via NO/cGMP possui efeito citoprotetores ou efeitos citotóxicos, dependendo do tipo celular. Assim, em culturas de células endoteliais bovinas, a via NO/GMPc apresenta efeito citoprotetor contra a injúria provocada pelo fator de necrose tumoral α (TNF- α) (POLTE et al., 1997). Em contraste, essa via induziu citotoxicidade em vários tipos de células, tais como: cultura de neurônios do córtex cerebral de camundongos (FRANDSEN et al., 1992), células PC12 de feocromocitoma (NAKAMURA et al., 1997) e a linhagem HIT-T15 de células B-pancreáticas de hamsters (LOWETH et al., 1997). Parece que um aumento moderado da concentração de NO induz efeitos citoprotetores em alguns tipos de células, enquanto um aumento maior de NO geralmente causa lesão celular via formação de peroxinitrito.

Outros autores mostraram ainda que o NO inibe a estimulação da secreção de ácido gástrico pela histamina nas células parietais de ratos (BROWN et al., 1993) e nas glândulas gástricas de coelhos (KIM & KIM 1996). Esta inibição é acompanhada por um aumento do GMPc intracelular (BROWN et al., 1993; KIM & KIM 1996) e é prevenido por inibidor da proteína quinase cGMP-dependente (BROWN et al., 1993). Portanto, a via NO/GMPc possui duas atividades importantes: antissecreção e citoprotetora

Recentemente, Peskar e colaboradores demonstraram a participação dos canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}) em vários modelos de proteção gástrica, como 16,16-prostaglandina dimetil E2, etanol 20%, salicilato de sódio, dimercaprol e dietilmaleato, com a glibenclamida inibindo a proteção por esses compostos (PESKAR et al., 2002). Gomes e colaboradores mostraram que o LPS protege a gastropatia induzida por indometacina, em parte devido a abertura dos canais de K_{ATP} (GOMES et al., 2006) e Akar e colaboradores mostraram que o diazóxido inibiu a lesão gástrica induzida por indometacina em ratos, com a glibenclamida revertendo essa proteção (AKAR et al., 1999). Entretanto, o papel dos canais de K_{ATP} na proteção gástrica a lesões induzidas por álcool não está completamente elucidado. Usando como ferramenta farmacológica a glibenclamida (um bloqueador dos canais de K_{ATP}) ou o diazóxido (uma droga ativadora de canais de K_{ATP}), nós demonstramos que o efeito protetor do sildenafil na lesão gástrica induzida por etanol absoluto foi mediado, em parte, pela abertura dos canais de K_{ATP} .

Tem sido postulado que os canais de K_{ATP} estão envolvidos em uma variedade de funções fisiopatológicas no estômago tais como: regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido gástrico e contratilidade da musculatura gástrica. A capacidade da glibenclamida e do diazóxido de alterar de alterar a resposta de algumas drogas tem sido aceita como evidência para sugerir o envolvimento dos K_{ATP} nos eventos biológicos (STANDEN et al., 1989). Nossos estudos evidenciaram que a glibenclamida reverteu, de forma dose dependente, o efeito protetor do sildenafil e que a associação da glibenclamida mais diazóxido restaurou o efeito gastroprotetor do sildenafil. Recentemente, Peskar e colaboradores sugeriram a ação das prostaglandinas endógenas como ativadoras de canais de K_{ATP} em modelos de gastroproteção (PESKAR et al., 2002). Assim, uma explicação possível para o nosso resultado é que o sildenafil, via NO, poderia aumentar a síntese de PGE2, e dessa forma ativaria o canal de K_{ATP} .

Nós evidenciamos ainda que a glibenclamida, um bloqueador de canais de K_{ATP} , induziu uma diminuição no nível gástrico de glutathione e aumento na concentração de hemoglobina, indicando, respectivamente, que ela aumentou a produção de radicais livres e a hemorragia. Portanto, a glibenclamida reverteu o efeito gastroprotetor do sildenafil na lesão por álcool sobre os níveis de glutathione e na hemorragia. Quando a glibenclamida foi administrada concomitantemente com diazóxido, o efeito gastroprotetor do sildenafil foi restaurado. Uma outra possibilidade é que a glibenclamida poderia induzir uma diminuição do fluxo sanguíneo gástrico e dessa forma aumentar as lesões na mucosa gástrica induzidas por etanol. Akar e colaboradores demonstraram que o diazóxido reduziu a lesão gástrica na mucosa gástrica de ratos tratados com indometacina, e que o relaxamento de artérias gástricas pré-contraídas pela noradrenalina induzida por diazóxido foi revertido pela glibenclamida. Então, estes autores sugeriram que os canais de K_{ATP} possuem uma função importante na manutenção da integridade da mucosa gástrica pelo aumento da perfusão gástrica e da regulação de neutrófilos (AKAR et al., 1999). Foi sugerido também que os canais de K_{ATP} possuem um papel na produção de radicais livres induzidos por neutrófilos em tecidos lesados (PIEPER & GROSS, 1992) e que a glibenclamida reverteu o efeito protetor do LPS na determinação do nível de glutathione (GOMES et al., 2006). Isso sugere que a glibenclamida ao reverter o efeito protetor do sildenafil na gastropatia por álcool, também pode ter aumentado a liberação de radicais livres e conseqüentemente isso resultou em uma diminuição dos níveis de glutathione. Este nível de glutathione só foi restaurado no grupo tratado com glibenclamida mais diazóxido, onde o efeito protetor do sildenafil foi mantido. Neste caso, provavelmente a liberação de radicais livres foi diminuída e os níveis de glutathione foram semelhantes ao grupo tratado com sildenafil mais etanol absoluto. A ativação dos canais de K_{ATP} poderia oferecer mecanismos protetores a injúrias por inibição da ativação dos neutrófilos e subseqüente diminuição do consumo de glutathione, como conseqüência da diminuição da produção de radicais livres por estes leucócitos.

A glibenclamida é um agente hipoglicemiante oral que estimula a secreção de insulina por bloquear os canais de K_{ATP} (DUNNE & PETERSEN, 1991), podendo produzir hipoglicemia. Foi relatado que a glicose pode reduzir a lesão gástrica induzida por indometacina (TAKEUCHI et al., 1990). Por outro lado, Takeuchi e colaboradores em 1994, mostraram que o nível de glicose no sangue pode contribuir de forma significativa no desenvolvimento de lesões na mucosa por alteração da motilidade gástrica (TAKEUCHI et al.,

1994). Durante todo o nosso estudo, a glibenclamida foi diluída em 2,5 ml/Kg de NaOH 0,02 N contendo 4% de glicose de modo a minimizar a hipoglicemia provocada pela droga.

É conhecido que a prostaglandina E2 possui uma ação protetora contra a lesão gástrica provocada pelo etanol (GLAVIN et al., 1996). Foi recentemente demonstrado que essa proteção da PGE2 é devido a um aumento do GMPc intracelular, que é mediado via aumento da concentração de cálcio intracelular livre e a produção de óxido nítrico (SAKAI et al., 1995). Outros autores mostraram que a via NO/GMPc apresenta ação protetora contra a lesão celular nas células endoteliais de artérias pulmonares de bovinos (POLTE et al., 1997), no pulmão de ratos (PINSKY et al., 1994) e na mucosa gástrica de cobaias (YANAKA et al., 1995).

Mais de 20 anos após a identificação do NO como uma substância biológica importante produzida pelas células, muito se tem discutido sobre a modulação do NO na terapia de doenças. Talvez, não surpreendentemente, o aumento no entendimento da biologia do NO na saúde e na doença em termos quantitativos (não apenas descritivos ou observacionais) emerge como um pré-requisito fundamental para a descoberta, alvo e otimização das terapias relacionadas ao NO e, com sucesso, realizando seu potencial comercial como uma droga segura e com benefícios clínicos decisivos. Informações adicionais na biologia do NO devem ajudar a formular estratégias terapêuticas novas baseadas na identificação molecular e manipulação direta dos alvos sensíveis ao NO. A descoberta de que o NO é essencialmente um neurotransmissor, vasodilatador e mediador que participa na defesa do organismo e a compreensão dos aspectos fisiológicos e patofisiológicos dessa molécula tiveram grandes avanços. Entretanto, muitas questões permanecem abertas a respeito do papel do NO na fisiologia normal e modulação/potencialização da patologia de doenças inflamatórias.

Baseado no exposto acima, acreditamos que o tratamento com sildenafil em baixas doses e por via oral é capaz de diminuir consideravelmente a lesão gástrica induzida por etanol, através da potencialização da via NO/cGMP e por um aumento na concentração de glutatona no tecido gástrico. Este evento é dependente da abertura de canais de K_{ATP} , visto que o pré-tratamento com glibenclamida sozinha, mas não com glibenclamida associada com diazóxido, reverteu completamente este evento. A compreensão dos mecanismos pelo qual o

sildenafil aumenta a defesa da mucosa gastrintestinal poderá ser um alvo interessante para o desenvolvimento de novas terapêuticas citoprotetoras.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-BRYAN, L.; BRYAN, J. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. **Endocrinology Reviews**, v. 20, p. 101–135, 1999.

AGUILAR-BRYAN, L.; NICHOLS, C.G.; WECHSLER, S.W.; CLEMENT, J.P.T.; BOYD, A.E.; GONZALEZ, G.; HERRERA-SOSA, H.; NGUY, K.; BRYAN, J.; NELSON, D.A. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. **Science**, v. 268 (5209), p. 423–426, 1995.

AKAR, F.; UYDES-DOGAN, B.S.; BUHARALIOGLU, C.K.; ABBAN, G.; HEINEMANN, A.; HOLZER, P.; VAN DE VOORDE, J. Protective effect of cromokalim and diazóxido, and proulcerogenic effect of glibenclamida on indomethacin-induced gastric injury. **European Journal of Pharmacology**, v. 25, p. 461-470, 1999.

ALPHIN, R.S.; VOKAC, V.A.; GREGORY, R.L.; BOLTON, P.M.; TAWES, J.W. Role of intragastric pressure, pH, and pepsin in gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, v. 73, p. 495–500, 1977.

ALTURA, B.M.; GEBREWOLD, A. Inhibitor of nuclear factor-Kappa B activation attenuates venular constriction, leukocyte rolling/adhesion and microvessel rupture induced by ethanol in intact rat brain microcirculation: relation to ethanol-induced brain injury. **Neuroscience Letters**, v. 334, p. 21–24, 2002.

ARNOLD, W.P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, p. 3203-3207, 1977.

ASHCROFT, F.M.; GRIBBLE, F.M. New windows on the mechanism of action of KATP channel openers. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21 (11), p. 439-445, 2000.

ASHCROFT, F.M.; HARRISON, D.E.; ASHCROFT, S.J.H. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. **Nature.**, v. 312, p. 446-448, 1984.

ASHFORD, M.L.; STURGESS, N. C.; TROUT, N.J.; GARDNER, N.J.; HALES, C.N. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurons. **Pflugers Arch.**, v. 412, p. 297-304, 1988.

ASHMAN, D.F.; LIPTON, R.; MELICOW, M.M.; PRICE, T.D. Isolation of adenosine 3_:5_ monophosphate and guanosine 3_:5_-monophosphate from rat urine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 11, p. 330-334, 1963.

BALLARD, S.A.; GINGELL, C.J.; TANG, K.; TURNER, L.A.; PRICE, M.E.; NAYLOR, A.M. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue *in vitro* and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. **Journal of Urology**, v. 159, p. 2164-2171, 1998.

BATTISTON, L.; MORETTI, M.; TULISSI, P.; FANNI-CANELLES M.; POZZATO G. Alcohol hepatic toxicity in rat: evidence of the utility of gastric ethanol metabolism. **International Hepatology Communications**, v. 6, p. 61-70, 1996.

BEAVO, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiological Reviews**, v. 75, p. 725–745, 1995.

BECK, I.T.; MORRIS, G.P. & BUELL, M.G. Ethanol-induced vascular permeability changes in the jejunal mucosa of the dog. **Gastroenterology**, v. 90, p. 1137–1145, 1986.

BECKMAN, J.S.; SMITH, C.M.; KOPPENOL, W.H. SOD, and peroxyntirite. **Nature**, v. 364, p. 584, 1993.

BEECH, D.J.; ZHANG, H.; NAKAO, K.; BOLTON, T.B. K channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 573–582, 1993.

BEHRENDTS, S.; STEENPASS, A.; PORST, H.; SCHOLZ, H. Expression of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase subunits in human corpus cavernosum. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 713–717, 2000.

BIENENGRÆBER, M. ; ALEKSEEV, A.E. ; ABRAHAM, M.R. ; CARRASCO, A.J. ; MOREAU, C. ; VIVAUDOU, M. ; DZEJA, P.P. ; TERZIC, A. ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the KATP channel complex. **The FASEB Journal**, v. 14 (13), p. 1943–1952, 2000.

BLACK, M.D.; MATTHEWS, E.K.; HUMPHREY, P.P.A. The effects of a photosensitive nitric oxide donor on basal and electrically-stimulated dopamine efflux from the rat striatum in vitro. **Neuropharmacology**, v. 33 (11), p. 1357, 1994.

BLANDIZZI, C.; GHERARDI, G.; MARVEGGIO, C.; NATALE, G.; CARIGNANI, D.; DEL TACCA, M. Mechanisms of protection by omeprazole against experimental gastric mucosal damage in rats. **Digestion**, v. 56, p. 220–229, 1995.

BLONDEAU, N.; PLAMONDON, H.; RICHELME, C.; HEURTEAUX, C.; LAZDUNSKI, M. KATP channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. **Neuroscience**, v. 100, p. 465–474, 2000.

BODE, J.C. Alcohol and the gastrointestinal tract. **Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde**, v. 45, p. 1–75, 1980.

BODE, C.; BODE, J.C. Alcohol's role in gastrointestinal tract disorders. **Alcohol Health Res World.**, v. 21(1), p. 76-83, 1997.

BOECKXSTAENS, G.E.; PELCKMANSI, I.A. Nitric Oxide and the Non-Adrenergic NonCholinergic Neurotransmission. **Camp Rwchem. Physical. Vul. IIBA**, v. 4, p. 925-937, 1997.

BOHLE, D.S. Pathophysiological chemistry of nitric oxide and its oxygenation by-products. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 2, p. 194-200, 1998.

BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850–853, 1994.

BORTOLOTTI, M.; MARI, C.; LOPILATO, C.; LA ROVERE, L.; MIGLIOTO, M. Sildenafil inhibits gastroduodenal motility. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 15, p. 157-161, 2001.

BOOLELL, M. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**, v. 8, p. 47-52, 1996.

BOU-ABBOUD, C.F.; WAYLAND, H.; PAULSEN, G.; GUTH, P.H. Microcirculatory stasis preceds tissue necrosis in ethanol-induced gastric mucosal injury in the rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 33, p. 872-877, 1988.

BOYCE, E.G.; UMLAND, E.M. Sildenafil Citrate: A Therapeutic Update. **Clinical therapeutics**, v. 23, 2001.

BOYD, S.D.; SESAME, H. A.; BOYD, M. R. Gastric glutathione depletion and acute ulcerogenesis by diethyl maleate given sub-cutaneously to rats. **Life Sciences**, v. 28, p. 2987, 1981.

BROWN, J.F.; HANSON, P.J.; WHITTLE, B.J.R. The nitric oxide donor, *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine, inhibits secretory activity in rat isolated parietal cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 195, p. 1354-1359, 1993.

BRZOZWSKI, T.; KONTUREK, S.J.; SLIWOWSKI, Z.; DROZDOWICZ, D.; LACZEK, M.; KEDRA, D. Role of arginine, a substrate for nitric oxide synthase in gastroprotection and ulcer healing. **Journal of Gastroenterology**, v. 32, p. 442-52, 1997.

BURNETT, A. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology. **Journal of Urology**, v. 157, p. 320–324, 1997.

BUTTNER, A.R.; FLITNEY, F.W.; WILLIAMS, D.L.H. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16 (1), p. 18-22, 1995.

CABALLERIA, J.; BARAONA, E.; LIEBER, C.S. The contribution of the stomach to ethanol oxidation in the rat. **Life Sciences**, v. 41, p. 1021– 1027, 1987.

CABALLERIA, J.; FREZZA, M.; HERNÁNDEZ-MUNÓZ, R.; DIPAPOVA, C.; BARAONA, E.; LIEBER, C.S. Gastric origin of the first-pass metabolism of ethanol in humans: effect of gastrectomy. **Gastroenterology**, v. 97, p. 1205–1209, 1989.

CALATAYUD, S.; SANZ, M.J.; CANET, A. Mechanisms of gastroprotection by transdermal nitroglycerin in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, p. 1111-1118, 1999.

CHAMBERLAIN, C.E. Acute hemorrhagic gastritis. **Gastroenterol Clin North Am.**, v. 22, p. 843-873, 1993.

CHARNESS, M.E.; SIMNO, R.P.; GREENBERG, D.A. Ethanol and the nervous system. **N. Engl. J. Med.**, v. 321, p. 442– 454, 1989.

CHO, C.H.; HUA, M.F.; CHOU, C.K.; HO, L.T. Protection of zinc sulphate against necrosis induced by ethanol in rats. **Proc Natl Sci Council.**, V. 7, P. 261-267, 1983.

CHUANG, A.T.; STRAUSS, J.D.; MURPHY, R.A.; STEERS, W.D. Sildenafil, a type 5 c-GMP phosphodiesterase inhibitor, specifically amplifies endogenous cGMP-dependent relaxation in rabbit corpus cavernosum smooth muscle *in vitro*. **Journal of Urology**, v. 160, p. 257–261, 1998.

CHUANG, A.T.; STRAUSS, J.D.; STEERS, W.D.; MURPHY, R.A. cGMP mediates corpus cavernosum smooth muscle relaxation with altered cross-bridge function. **Life Sciences**, v. 63, p. 185-194, 1998.

CONTI, L.R.; RADEKE, C.M.; SHYNG, S.L.; VANDENBERG, C.A. Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. **J. Biol. Chem.**, v. 276 (44), p. 41270–41278, 2001.

CONTRERAS, R.; FUENTES, O.; MANN, G.; SOBREVIA, L. Diabetes and insulin-induced stimulation of L-arginine transport and nitric oxide synthesis in rabbit isolated gastric glands. **J. Physiol. Lond.**, v. 498, p. 787–796, 1997.

COOK, D.L.; SATIN, L.S.; ASHFORD, M.L.; HALES, C.N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells. **Sparechannelhypothesis Diabetes**, v. 37, p. 495–498, 1988.

COOPER, J.D.; MUIRHEAD, D.C.; TAYLOR, J.E.; BAKER, P.R. Development of an assay for simultaneous determination of sildenafil (Viagra™) and its metabolite (UK-103,320) using automated sequential trace enrichment of dialysates and high performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B Biomed. Appl.**, v. 701, p. 87–95, 1997.

DAVENPORT, H.W. Ethanol damage to canine oxyntic glandular mucosa. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 126, p. 657–662, 1967.

DAVENPORT, H.W. Gastric mucosal hemorrhage in dogs. Effects of acid, aspirin, and alcohol. **Gastroenterology**, v. 56, p. 439–449, 1969.

DAVIES, M.G.; FULTON, G.J.; HAGEN, P.O. Clinical biology of nitric oxide. **Br J Surg.**, v. 82(12), p. 1598-610, 1995.

DINDA, P.K.; KOSSEV, P.; BECK, I.T. & BUELL, M.G. Role of xanthine oxidase-derived oxidants and leukocytes in ethanol-induced jejunal mucosal injury. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 41, p. 2461–2470, 1996.

DING, A.; NATHAN, C.P.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediate from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J Immunol.**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.

DAUT, J.; KLIEBER, H.G.; CYRYS, S.; NOACK, T.K. ATP channels and basal coronary vascular tone. **Cardiovasc Res.**, v. 28, p. 811–817, 1994.

DUNNE, M.J.; PETERSEN, O.H. Potassium selective ion channels in insulin-secreting cells: physiology, pharmacology and their role in stimulus-secretion coupling. **Biochim. Biophys Acta**, v. 7, p. 67-82, 1991.

EISERICH, J.P.; PATEL, R.P.; O'DONNELL, V.B.O. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Molec. Aspects Med.**, v. 19, p. 221-357, 1998.

ELLIOTT, S.N.; McKNIGHT, W. CIRINO, G. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology**, v. 109, p. 524-30, 1995.

ESTONIUS, Mats.; SVENSSON, S.; HOOG, J.O. Alcohol dehydrogenase in human tissues: localisation of transcripts coding for five classes of the enzyme. **FEBS Letters**, v. 397, p. 338-342, 1996.

FAWCETT, L.; BAXENDALE, R.; STACEY, P.; MCGROUTHER, C.; HARROW, I.; SODERLING, S. Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 97, p. 3702–3707, 2000.

FISCHER, D.A.; SMITH, J.F.; PILLAR, J.S.; DENIS, S.H.; CHENG, J.B. Isolation and characterization of PDE9A, a novel cGMP-specific phosphodiesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 15559–15564, 1998.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Endothelial Dysfunction: a Novel Therapeutic Target NO: the Primary EDRF. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 31, p. 5–14, 1999.

FORSELL, H. Gastric mucosal defence mechanisms. A brief review. **Gastroenterology**, p. 23-28, 1988.

FORSTERMANN, U.; CLOSS, E.I.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; SCHWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, p. 1121-1131, 1994.

FOX, D.A.; CAMPBELL, M.L.; BLOCKER, Y.S. Functional alterations and apoptotic cell death in the retina following developmental or adult lead exposure. **Neurotoxicology.**, v. 18, p. 645–664, 1997.

FRANCIS, S.H.; COLBRAN, J.L.; McALLISTER-LUCAS, L.M.; CORBIN, J.D. Zinc interactions and conserved motifs of the cGMP-binding, c-GMP-specific phosphodiesterase suggest that it is a zinc hydrolase. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 22477–22480, 1994.

FRANCIS, S.H.; LINCOLN, T.M.; CORBIN, J.D. Characterization of a novel cGMP binding protein from rat lung. **J. Biol. Chem.**, v. 255, p. 620–626, 1980.

FRANSEN, A.; ANDERSEN, C.F.; SCHOUSBOE, A. Possible role of cGMP in excitatory amino acid-induced cytotoxicity in cultured cerebral cortical neurons. **Neurochem. Res.** v. 17, p. 35–43, 1992.

FRITZ, E.; HAMMER, J.; SCHMIDT, B.; EHERER, A.J.; HAMMER, H.F. Stimulation of the nitric oxide-guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate pathway by sildenafil: effect on rectal muscle tone, distensibility, and perception in health and in irritable bowel syndrome. **Am J Gastroenterol.**, v. 98(10), p. 2253-2260, 2003.

FUJIMURA, N.; TANAKA, E.; YAMAMOTO, S.; SHIGEMORI, M.; HIGASHI, H. Contribution of ATP-sensitive potassium channels to hypoxic hyperpolarization in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. **J. Neurophysiol.**, v. 77 (1), p. 378–385, 1997.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.**, v. 27, p. 373-376, 1980.

GASSER, R.N.; VAUGHAN-JONES, R.D. Mechanism of potassium efflux and action potential shortening during ischaemia in isolated mammalian cardiac muscle. **J. Physiol.**, v, 431, p. 713–741, 1990.

GERKE, P.; HAPKE, U.; RUMPF, H.J. & JOHN, U. Alcohol-related diseases in general hospital patients. **Alcohol and Alcoholism**, v. 32, p. 179–184, 1997.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S.; JOHNSON, B.R.; XING, P.L.; MORALES, R.E.; PLEBANI, M.; NAGY, L. Isolated rat gastric mucosal cells: optimal conditions for cell harvesting, measures of viability and direct cytoprotection. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 276, p. 1174–1179, 1996.

GOLDSTEIN, I.; LUE, T.F.; PADMA-NATHAN, H.; ROSEN, R.C.; STEERS, W.D.; WICKER, P.A. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil study group. **New Engl. J. Med.**, v. 338, p. 1397–1404, 1998.

GOMES, A.S.; LIMA, L. M.F.; SANTOS, C.L.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H.L.P. LPS from E.coli protects indomethacin-induced gastropathy in rats – role of ATP-sensitive K channels. **European Journal of Pharmacology**, In Press. 2006.

GOTTFRIED, E.B.; KORSTEN, M.A.; LIEBER, C.S. Alcohol-induced gastric and duodenal lesions in man. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 70, p. 587–592, 1978.

GRIBBLE, F.M.; TUCKER, S.J.; SEINO, S.; ASHCROFT, F.M. Tissue specificity of sulfonylureas: studies on cloned cardiac and beta-cell KATP channels. **Diabetes**, v. 47 (9), p. 1412–1418, 1998.

GRUETTER., C.A.; BARRY, B.K.; McNAMARA, D.B.; GRUETTER, D.Y.; KADOWITZ, P.J.; IGNARRO, L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosamine. **J. Cyclic Nucleotide Res.**, v. 5, p. 211-224, 1979.

GUSLANDI, M. Effect of ethanol on the gastric mucosa. **Dig. Disg.**, v. 5, p. 21-32, 1987.

GUTH, P.H.; PAULSEN, G.; NAGATA, H. Histologic and microcirculatory changes in alcohol-induced gastric lesions in the rat: Effect of prostaglandin cyto \pm protection. **Gastroenterology**, v. 87, p. 1083-1090, 1984.

HALCOX, J.P.; NOUR, K.R.; ZALOS, G.; MINCEMOYER, R.A.; WACLAWIW, M.; RIVERA, C.E. The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol.*, v. 40, p. 1232–1240, 2002.

HAN, J.; KIM, N.; JOO, H.; KIM, E.; EARM, Y.E. ATP-sensitive K⁺ channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 283, p. 1545–1554, 2002.

HARDMAN, J.G.; SUTHERLAND, E.W. Guanylyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate, **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 6363–6370, 1969.

HILLINGER, S.; SCHMID, R.A.; SANDERA, P.; STAMMBERGER, U.; SCHNEITER, D.; SCHOEDON, G.; WEDER, W. 8-Br-cGMP is superior to prostaglandin E1 for lung preservation. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 68, p. 1138–1142, 1999.

HOGG, N.; KALYANARAMAN, B.; JOSEPH, J.; STRUCK, A.; PARTHASARATHY, S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. **FEBS Letters**, v. 334, p. 170-174, 1993.

HUIE, R.E.; PADMAJA, S. The reaction of NO with superoxide. **Free Rad. Res. Commun.**, v. 18, p. 195-199, 1993.

HUNTER, M.; GIEBISCH, G. Calcium-activated K-channels of *Amphiuma* early distal tubule: inhibition by ATP. **Pflugers Arch.**, v. 412 (3), p. 331-333, 1988.

IAQUINTO, G.; DEL TACCA, M.; CUCCURULLO, L.; PARODI, M.C.; GIARDULLO, N.; D'ONOFRIO, V.; NATALE, G.; CARIGNANI, D.; FERRARACCIO, F.; SZABO, S. Gastroprotection by 4-methylpyrazole against ethanol in humans. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 43, p. 816-825, 1998.

INAGAKI, N.; GONOI, T.; CLEMENT, J.P.; WANG, C.Z.; AGUILAR-BRYAN, L.; BRYAN, J.; SEINO, S. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. **Neuron**, v. 16 (5), p.1011-1017, 1996.

INAGAKI, N.; TSUURA, Y.; NAMBA, N.; MASUDA, K.; GONOI, T.; HORIE, M.; SEINO, Y.; MIZUTA, M.; SEINO, S. Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. **J. Biol. Chem.**, v. 270 (11), p. 5691-5694, 1995.

ISHIHARA, K.; KUWARA, H.; OHARA, S.; Ohkawa H, OKABE, H.; HOTTA, K. Mucus glycoprotein and mucosal protection. **Journal Clinical Gastroenterology**, v. 10, p. 24-27, 1988.

JAHANGIR, A.; TERZIC, A.; SHEN, W. Potassium channel openers: therapeutic potential in cardiology and medicine. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 2 (12), p. 1995–2010, 2001.

JANSSEN-HEININGER, Y.M.W.; POYNTER, M.E.; BAEUERLE, P.A. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kB. **Free Radical Biol. Med.**, v. 28, p. 1317–1327, 2000.

JONSSON, A.S.; PALMBLAD, J.E. Effects of ethanol on NF-kappaB activation, production of myeloid growth factors, and adhesive events in human endothelial cells. **J. Infect. Dis.**, v. 184, p. 761–769, 2001.

KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Nitric oxide as an antioxidant. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 289, p. 130-136, 1991.

KAPLAN, N.M. Alcohol and hypertension. **Lancet**, v. 345, p. 1588–1589, 1995.

KERWIN, J.F.; HELLER, M. The arginine-nitric oxide pathway: a target for new drugs. **Medical Care Research and Review**, v. 14, p. 23-74, 1994.

KIECHLE, F.L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am. J Clin Pathol.**, v. 100, p. 567-75, 1993.

KIM, H.; KIM, K.H. Effects of a nitric oxide donor and nitric oxide synthase inhibitors on acid secretion of isolated rabbit gastric glands. **Pharmacology**, v. 53, p. 331–339, 1996.

KIM, P.K.M.; ZAMORA, R.; PETROSKO, P.; BILLIAR, T.R. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. **International Immunopharmacology**, v. 01, p. 1421–1441, 2001.

KISHORE, R.; HILL, J.R.; MCMULLEN, M.R.; FRENKEL, J.; NAGY, L.E. ERK1/2 and Egr-1 contribute to increased TNF-alpha production in rat Kupffer cells after chronic ethanol feeding. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 282, p. 6-15, 2002.

KOBAYASHI, K.; ARAKAWA, T.; HIGUCHI, K.; NAKAMURA, H. Gastric cytoprotection by ornoprostil, a PGE1 analogue, in human subjects. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 13 (1), p. 32-36, 1991.

KO, J. K.-S.; CHING, C.K.; CHOW, J.Y.C.; ZHANG, S.T.; LAM, S.K.; CHO, C.H. The vascular and glandular organoprotective properties of metronidazole in the rodent stomach. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 11, p. 811-819, 1997.

KO, J. K.-S.; CHO, C.H. Histological Study of Mechanisms of Adaptive Cytoprotection on Ethanol-Induced Mucosal Damage in Rat Stomachs. **Digestive Diseases and Sciences**, v.43, p.1248-1257, 1998.

KO, J. K.-S.; CHO, C.H.; LAM, S.K. Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, p. 2503-2508, 2004.

KOESLING, D. Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. **Methods**, v. 19, p. 485–493, 1999.

KONTUREK, S.J.; BRZOZOWSKI, T.; MAJKA, J.; PYTKO-POLONCZYK, J.; STACHURA, J. Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers. **European Journal of Pharmacology**, v. 239, p. 215-217, 1993.

KOTERA, J.; YANAKA, N.; FUJISHIGE, K.; IMAI, Y.; AKATSUKA, H.; ISHIZUKA, T.; KAWASHIMA, K.; OMORI, K. Expression of rat cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase mRNA in Purkinje cell layers during postnatal neuronal development. **European Journal of Biochemistry**, v. 249, p. 434–442, 1997.

KRUMENACKER, J.S.; HANAFY, K.A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. **Brain Research Bulletin**, v. 62, p. 505–515, 2004.

KUO, P.C.; SCHROEDER, R.A. The emerging multifaced roles of nitric oxide. **Ann Surg.**, v. 221 (3), p. 220-35, 1995.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of eukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 4651–4655, 1991.

KUTHE, A.; MAGERT, H.; UCKERT, S.; FORSSMANN, W. G.; STIEF, C. G.; JONAS, U. Gene expression of the phosphodiesterases 3A and 5A in human corpus cavernosum penis. **Eur Urol.**, v. 38, p. 108– 114, 2000.

KUTHE, A.; WIEDENROTH, A.; MAGERT, H. J.; UCKERT, S.; FORSSMANN, W. G.; STIEF, C. G. Expression of different phosphodiesterase genes in human cavernous smooth muscle. **J Urol.**, v. 165, p. 280– 283, 2001.

KVIETYS, P.R.; TWOHIG, B.; DANZELL, J.; SPECIAN, R.D. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals. **Gastroenterology**, v. 98, p. 909–920, 1990.

LACY, E.R. Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. **J Clin Gastroenterol.**, v. 10, p. 72-77, 1988.

LACY, E.R.; ITO, S. Microscopic analysis of ethanol damage to rat gastric mucosa after treatment with a prostaglandin. **Gastroenterology**, v. 83, p. 619-625, 1982.

LAINE, L.; WEINSTEIN, W.M. Histology of alcoholic hemorrhagic gastritis: a prospective evaluation. **Gastroenterology**, v. 94, p.1254-1262, 1988.

LAMARQUE, D.; WHITTLE, B.J. Increase in gastric intramucosal hydrogen ion concentration following endotoxin challenge in the rat and the actions of nitric oxide synthase inhibitors. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 28(3), p. 164-8, 2001.

LAMAS, S.; PEREZ-SALA, D.; MONCADA, S. Nitric oxide: from discovery to the clinic. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 19, p. 436– 438, 1998.

LATIES, A.; ZRENNER, E. Viagra (sildenafil citrate) and ophthalmology. **Prog. Retin. Eye Res.**, v. 21, p. 485–506, 2002.

LEE, J.S.; OHB, T.Y.; KIMC, Y.K.; BAIK, J.H.; SOC, S.; HAHMB, K.B.; SURH Y.J. Protective effects of green tea polyphenol extracts against ethanol-induced gastric mucosal damages in rats: Stress-responsive transcription factors and MAP kinases as potential targets. **Mutation Research**, v. 579, p. 214–224, 2005.

LEE, M.R.; LI, L.; KITAZAWA, T. Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating myosin light chain phosphatase. *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 5063–5068, 1997.

LEVY, D.; STRASSMAN, A.M. Modulation of dural nociceptor mechanosensitivity by the nitric oxide-cyclic GMP signaling cascade. **J. Neurophysiol.**, v. 92, p. 766–772, 2004.

LIEBER, C.S. Gastric ethanol metabolism and gastritis: interactions with other drugs, *Helicobacter pylori*, and antibiotic therapy (1957–1997)—a review. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 21, p. 1360–1366, 1997.

LIM, R.T.J.R.; GENTRY, R.T.; ITO, D.; YOKOYAMA, H.; BARAONA, E.; LIEBER CS. First-pass metabolism of ethanol is predominantly gastric. **Alcoholism Clin Exp Res.**, v. 17, p. 1337-3-1344, 1993.

LIPPE, I.T.; HOLZER, P. Participation of endothelium-derived nitric oxide but not prostacyclin in the gastric mucosal hyperemia due to acid back-diffusion. *British Journal of Pharmacology*, v. 105, p. 708–714, 1992.

LIPTON, S.A.; CHOI, Y.-B.; PAN, Z.-H.; LEI, S.Z.; CHEN, H.-S.V.; SUCHER, N.J.; LOSCALZO, L.; SINGEL, D.J.; STAMLER, J.S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. **Nature**, v. 364, p. 626-631, 1993.

LISS, B.; BRUNS, R.; ROEPER, J. Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of KATP channels in dopaminergic midbrain neurons. **EMBO J.**, v. 18, p. 833-846, 1999.

LOGUERCIO, C.; BLANCO, F.D.; DE GIROLAMO, V.; DISALVO, D.; NARDI, G.; PARENTE, A.; BLANCO, C.D. Ethanol consumption, amino acid and glutathione blood levels in patients with and without chronic liver disease. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 23, p. 1780–1784, 1999.

LOWETH, A.C.; WILLIAMS, G.T.; SCARPELLO, J.H.B.; MORGAN, N.G. Evidence for the involvement of cGMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic B-cell line, HIT-T15. **FEBS Letters**, v. 400, p. 285–288, 1997.

LUCAS, K. A.; PITARI, G. M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol Rev.**, v. 5, p. 375–414, 2000.

MACMATH, T.L. Alcohol and gastrointestinal bleeding. *Emerg Med Clin North Am.*, v. 8(4), p. 859-872, 1990.

MACNAUGHTON, W.K.; CIRINO, G.; WALLACE, J.L. Endothelium-derived relaxing factor nitric oxide has protective action in the stomach. *Life Sciences*, v. 45, p. 1869–1876, 1989.

MARLETTA, M.A. J. Nitric oxide synthase structure and mechanism. ***Biol. Chem.***, v. 268 (17), p. 12231-12234, 1993.

MASUDA, E.; KAWANOP, S.; NAGAN, K.; TSUJI, S.; TAKEI, Y.; TSUJI, M.; OSHITA, M.; MICHIDA, T.; KOBAYASHI, I.; NAKAMA, A.; FUSAMOTO, H.; KAMADA, T. Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. ***Gastroenterology***, v. 108, p. 58–64, 1995.

MAY, G. R.; CROOK, P.; MOORE, P.K.; PAGE, C.P. The role of nitric oxide as an endogenous regulator of platelet and neutrophil activation within the pulmonary circulation of the rabbit. *British Journal of Pharmacology*, v. 102, p. 759–763, 1991.

McALLISTER-LUCAS, L.M.; SONNENBURG, W.K.; KADLECEK, A.; SEGER, D.; TRONG, H.L.; COLBRAN, J.L.; THOMAS, M.K.; WALSH, K.A.; FRANCIS, S.H.; CORBIN, J.D. The structure of a bovine lung cGMP-binding site of cGMP-binding, c-GMPspecific phosphodiesterase deduced from a cDNA clone. ***Journal of Biological Chemistry***, v. 268, p. 22863–22873, 1993.

MEISTER, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; Applications in research and therapy. ***Pharmacol. Ther.***, v. 51, p. 155, 1991.

MILLER, T.A.; LI, D.; KUO, Y.; SCHMIDT, K.L.; SHANBOUR, L.L. Nonprotein sulfhydryl compounds in canine gastric mucosa: Effects of PGE2 and ethanol. **Am. J. Physiol.**, v. 249, p. 137, 1985.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide; Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharmacol. Research**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONTORSI, F.; BRIGANTI, A.; SALONIA, A.; RIGATTI, P.; BURNETT, A.L. Can Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Cure Erectile Dysfunction? **European Urology**, *In press*, 2006.

MORALES, A.; GINGELL, C.; COLLINS, M.; WICKER, P.A.; OSTERLOH, I.H. Clinical safety of oral sildenafil citrate (Viagra™) in the treatment of erectile dysfunction. **Int. J. Impot. Res.**, v. 10, p. 69–74, 1998.

MORELAND, R.B.; GOLDSTEIN, I.; KIM, N.N.; TRAISH, A. Sildenafil Citrate, a Selective Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor: Research and Clinical Implications in Erectile Dysfunction. **TEM**, v. 10, No. 3, 1999.

MORELAND, R.B.; GOLDSTEIN, I.; TRAISH, A. Sildenafil, a novel inhibitor of phosphodiesterase type 5 in human corpus cavernosum. **Life Sciences**, v. 62, p. 309-318, 1998.

MORROW, A.L.; FERRANI-KILE, K.; DAVIS, M.I.; SHUMILLA, J.A.; KUMAR, S.; MALDVE, R.; PANDEY, S.C. Ethanol effects on cell signaling mechanisms. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 28, p. 217–227, 2004.

MURAD, F.; MITTAL, C.K.; ARNOLD, W.P.; KATSUKI, S.; KIMURA, H. Guanylate cyclase: Activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. **Adv. Cyclic. Nucleotide Res.**, v. 9, p. 145- 158, 1978.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global burden of disease study. **Lancet**, v. 349, p. 1436–1442, 1997.

MUSCARA, M. N.; WALLACE, J. L. Nitric oxide. V. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. 1313–1316, 1999.

MUTOH, H.; HIRAISHI, H.; OTA, S.; YOSHIDA, H.; IVEY, K.J.; TERANO, A.; SUGIMOTO, T. Protective role of intracellular glutathione against ethanol-induced damage in cultured rat gastric mucosal cells. **Gastroenterology**, v. 98, p. 1452–1460, 1990.

MUZUI, T.; DOTEUCHI, M. Lipid peroxidation: A possible role in gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sciences.*, v. 38, p. 2163, 1986.

NAHAVANDI, A.; DEHPOUR, A.R.; MANI, A.R.; HOMAYOUNFAR, H.; ABDOLI, A. *NG*-nitro-L-arginine methylester is protective against ethanol-induced gastric damage in cholestatic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 370, p. 283–286, 1999.

NAKAMURA, Y.; YASUDA, M.; FUJIMORI, H.; KIYONO, M.; PAN-HOU, H. Cytotoxic effect of sodium nitroprusside on PC12 cells. **Chemosphere**, v. 34, p. 317–324, 1997.

NANJI, A.A.; JOKELAINEN, K.; TIPOE, G.L.; RAHEMTULLA, A.; THOMAS, P.; DANNENBERG, A.J. Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-kappa B-dependent genes. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 284, p. 321-327, 2003.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 268 (4 Part 1), p. 799-822, 1995.

NOMA, A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. **Nature**, v. 305 (5930), p. 147-148, 1983.

NY, L.; PFEIFER, A.; ASZODI, A.; AHMAD, M.; ALM, P.; HEDLUND, P.; FASSLER, R.; ANDERSSON, KE. Impaired relaxation of stomach smooth muscle in mice lacking cyclic GMP-dependent protein kinase I. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, p. 395-401, 2000.

OATES, P.J.; HAKKINEN, J.P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterology**, v. 94, p. 10-21, 1988.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; FLORÊNCIO, M.G.; LIMA JR, R.C.P.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v. 49, p. 105-111, 2004.

OLKEN, N.M.; MARLETTA, M.A. NG-Methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase. **Biochemistry**, v. 32, p. 9677-9685, 1993.

PADMA-NATHAN, H.; EARDLEY, I.; KLONER, R.A.; LATIES, A.M.; MONTORSI, F. A 4-year update on the safety of sildenafil citrate (viagra®). **Urology**, v. 60 (Supplement 2B), 2002.

PALMER, R.M.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 16;333(6174), p. 664-666, 1988.

PALMER, R.M.; BRIDGE, L.; FOXWELL, N.A.; MONCADA S. The role of nitric oxide in endothelial cell damage and its inhibition by glucocorticoids. **British Journal of Pharmacology**, v. 105, p. 11-12, 1992.

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

PARL, F.F.; LEV, R.; THOMAS, E.; PITCHUMONI, C.S. Histologic and morphometric study of chronic gastritis in alcoholic patients. **Hum. Pathol.**, v. 10, p. 45-56, 1979.

PARK, S.; HAHM, K.B.; OH, T.Y.; JIN, J.H.; CHOUE, R. Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 49, p. 384-394, 2004.

PESKAR, B.M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B.A. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 301, p. 969-974, 2002.

PESKAR, B.M.; LANGE, K.; HOPPE, U.; PESKAR, B.A. **Ethanol stimulates formation of leukotriene C4 in rat gastric mucosa**, v. 2, p. 283-293, 1986.

PFEILSCHIFTER, J.; EBERHARDT, W.; HUWILER, A. Nitric oxide and mechanisms of redox signalling: matrix and matrix-metabolizing enzymes as prime nitric oxide targets. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, p. 279–286, 2001.

PIEPER, G.M.; GOSS, G. Anti-free-radical and neutrophil-modulating properties of the nitrovasodilator, nicorandil. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 06, p. 225-232, 1992.

PINSKY, D.J.; NAKA, Y.; CHOWDHURY, N.C.; LIAO, H.; OZ, M.C.; MICHLER, R.E.; KUBASZEWSKI, E.; MALINSKI, T.; STERN, D.M. The nitric oxidercyclic GMP pathway in organ transplantation: critical role in successful lung preservation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 12086–12090, 1994.

PITCHUMONI, C.S. Pathogenesis of alcohol-induced chronic pancreatitis: facts, perceptions, and misperceptions. **Surgical Clinics of North America**, v. 81, p. 379–390, 2001.

POLSON, J.B.; STRADA, S.J. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 36, p. 403–427, 1996.

POLTE, T.; OBERLE, S.; SCHRODER, H. Nitric oxide protects endothelial cells from tumor necrosis factor- α -mediated cytotoxicity: possible involvement of cyclic GMP. **FEBS Letters**, v. 409, p. 46–48, 1997.

PROST, H. The rationale for prostaglandin E1 in erectile failure: a survey of worldwide experience. **J. Urol.**, v. 155, p. 802–815, 1996.

PREEDY, V.P.; RICHARDSON, P.J. Ethanol-induced cardiovascular disease. **Br Med Bull**, v. 50, p. 152–163, 1994.

PYNE, N.J.; ARSHAVSKY, V.; LOCHHEAD, A. cGMP signal termination. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 24, p. 1019–1022, 1996.

RADOMSKI, M.W.; MONCADA, S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. **Thromb. Haemost.**, v. 70, p. 36–41, 1993.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Pharmacology*, 5a Edição, Elsevier, 2003.

REED, D. J.; FARISS, M. W. Glutathione depletion and susceptibility. **Pharmacol. Rev.**, v. 36, p. 25, 1984.

REFFELMANN, T.; KLONER, R.A. Therapeutic potential of phosphodiesterase 5 inhibition for cardiovascular disease. **Circulation**, v. 108, p. 239–44, 2003.

REMBOLD, C.M. Regulation of contraction and relaxation of arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, p. 129–137, 1991.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats; prevention of gastric necrosis produced by alcohol. *Gastroenterology*, v. 77, p. 433–443, 1979.

ROSALMEIDA, M.C.; SARAIVA, L.D.; DA GRAÇA, J.R.; BARRETO, B.I.; DA NÓBREGA, M.V.; GONDIM, F.A.; ROLA, F.H.; SANTOS, A.A. Sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, delays gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid in awake rats. ***Digestive Diseases and Sciences***, v. 48, p. 2064-2068, 2003.

ROSENKRANZ, S. Alcohol consumption and arterial hypertension. ***Dtsch Med Wochenschr***, v. 128, p. 2497–2502, 2003.

ROSEN, R.C.; KOSTIS, J.B. Overview of phosphodiesterase 5 inhibition in erectile dysfunction. ***Am. J. Cardiol.***, v. 92, p. 9–18, 2003.

ROSS D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms an free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. ***Pharmacol. Ther.***, v. 37, p. 231-235, 1988.

ROWN, J.F.; HANSON, P.J.; WHITTLE, B.J.R. Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach. ***European Journal of Pharmacology***, v. 223, p. 103-104, 1992.

SAIKA, M.; UEYAMA, T.; SENBA, E. Expression of immediate early genes HSP70, and COX-2 mRNAs in rat stomach following ethanol ingestion. *Digestive Diseases and Science*, v. 45, p. 2455–2462, 2000.

SANCHEZ, L.S.; DE LA MONTE, S.M.; FILIPPOV, G.; JONES, R.C.; ZAPOL, W.M.; BLOCH, K.D. Cyclic-GMP-binding, cyclic-GMP-specific phosphodiesterase (PDE5) gene expression is regulated during rat pulmonary development. **Pediatr. Res.**, v. 43, p. 163–168, 1998.

SAKAI, H.; KUMANO, E.; IKARI, A.; TAKEGUCHI, N. A gastric housekeeping Cl channel activated via prostaglandin EP3 receptor-mediated Ca²⁺ nitric oxide/ cGMP pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 18781– 18785, 1995.

SAMONINA, G.E.; KOPYLOVA, G.N.; LUKJANZEVA, G.V.; ZHUYKOVA, S.E.; SMIRNOVA, E.A.; GERMAN, S.V.; GUSEVA, A.A. Antiulcer effects of amylin: a review. **Pathophysiology**, v. 11, p. 1–6, 2004.

SANTILLANA, M.B.; CIUFFO, G.M.; JAUREGUI, E.A.; CSIZMADIA, I.G. A model mechanism of nitric oxide (NO) formation by NO synthase. **Journal of Molecular Structure**, v. 468, p. 223–239, 1999.

SANTOS, C.L.; SOUZA, A.G.; LEMOS, H.P.; SANTOS, A.A.; WALLACE, J.L.; CUNHA, F.Q.; SOUZA, M.H.L.P. Sildenafil(Viagra®), Acting bu Nitric Oxide(NO) Pathway, prevents Indomethacin-Induced Gastropathy in Rats- Role of Leukocyte Adherence and Gastric Blood Flow. Nitric Oxide, Cytokines and Inflammation. **An International Symposium**. 2004.

SANTOS, C.L.; SOUZA, M.H.L.P.; SOUZA, A.G.; LEMOS, H.P.; SANTOS, A.A.; CUNHA, F.Q.; WALLACE, J.L. Sildenafil prevents indomethacin- induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, p. 481-486, 2005.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. 1,8-Cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 46, p. 331-337, 2001.

SASTRY, B.K.; NARASIMHAN, C.; REDDY, N.K.; RAJU, B.S. Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. **J Am Coll Cardiol.**, v. 43(7), p. 1149-1153, 2004.

SCHLOSSMANN, J.; HOFMANN, F. cGMP-dependent protein kinases in drug discovery. Reviews. **Drug Discovery Today**, v. 10, No 9, 2005.

SCHMIDT, K.L.; MILLER, T.A.; Morphological characteristics of prostaglandin cytoprotection. **Toxicology Pathology**, v. 16, p. 223-236, 1988.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v. 24;25(1), p. 192-2005, 1968.

SEINO, S.; IWANAGA, T.; NAGASHIMA, K.; MIKI, T. Diverse roles of KATP channels learned from Kir6.2 genetically engineered mice. **Diabetes**, v. 49 (3), p. 311–318, 2000.

SEINO, S.; MIKI, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 81, p. 133–176, 2003.

SIEGMUND, S.; TEYSSEN, S.; SINGER, M.V. Alkoholassoziierte Organschäden. Gesundheitliche Folgen durch moderaten Alkoholkonsum. **Internist.**, v. 43, p. 287–293, 2002.

SIMONYI, A.; WOODS, D.; SUN, A.Y.; SUN, G.Y. Grape polyphenols inhibit chronic ethanol-induced COX-2 mRNA expression in rat brain. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 26, p. 352-357, 2002.

SMITH, G.S.; TORNWALL, M.S.; BARRETO, J.C.; MILLER, T.A. Gastric Injury and Protection against Alcohol and Acid: Influence of Perturbations in Glutathione Metabolism. **Journal of Surgical Research**, v. 61, p. 395-403, 1996.

SOBEY, C.G. Potassium channel function in vascular disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio.**, v. 21(1), p. 28-38, 2001.

SONDERLING, S.H.; BAYUGA, S.J.; BEAVO, J.A. Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 15553-15558, 1998.

SOUZA, M.H.; LEMOS, H.P.; OLIVEIRA, R.B.; CUNHA, F.Q. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. **Gut.**, v. 53, p. 791-796, 2004.

SOUZA, M.H.; TRONCON, L.E.; CUNHA, F.Q.; OLIVEIRA, R.B. Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. **Braz J Med Biol Res.**, v. 36, p. 1383-1390, 2003.

SPRUCE, A.E.; STANDEN, N.B.; STANFIELD, P.R. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. **Nature**, v. 316(6030), p. 736-738, 1985.

STACEY, P.; RULTEN, S.; DAPLING, A.; PHILLIPS, S.C. Molecular cloning and expression of human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 247, p. 249–254, 1998.

STANDEN, N.B.; QUAYULE, J.M.; DAVIES, N.W.; BRAYDEN, J.E.; HUANG, Y.; NELSON, M.T. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. **Science**, v. 14, p. 177-180, 1989.

STIEF, C.G.; NOACK, T.; ANDERSSON, K.-E. Signal transduction in cavernous smooth muscle. **World J. Urol.**, v. 15, p. 27–31, 1997.

STUEHR, D.J.; GRIFFITH, O.W. Mammalian nitric oxide synthases, in: A. Meister (Ed.), **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, John Wiley and Sons, New York, NY, v. 65, p. 287– 346, 1992.

SZABO S, TRIER, J.S.; BROWN, A.; SCHNOOR, J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterology**, v. 88, p. 228–236, 1985.

SZABO S, TRIER, J.S.; FRANKEL, P. W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, v. 214, p. 200, 1981.

TAKEUCHI, K.; NIIDA, H.; OHUCHI, T.; OKABE, S. Influences of urethane anesthesia on indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. Relation to blood glucose levels. **Digestive Diseases and Science**, v. 39, p. 2536-2542, 1994.

TAKEUCHI, K.; OKADA, M.; NIIDA, H.; OKABE, S. Possible mechanisms involved in gastric hypermotility caused by indomethacin in the rat. Role of glycoprivic response. **Dig Digestive Diseases and Science**, v. 35, p. 984-992, 1990.

TAKEUCHI, K.; SUZUKI, K.; ARAKI, H.; MIZOGUCHI, H.; SUGAMOTO, S.; UMDEDA, M. Roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide in gastroduodenal ulcerogenic responses induced in rats by hypothermic stress. **Physiol, Paris.**, v. 93(5), p. 423-31, 1999.

TARNAWSKI, A.; LU, S.Y.; STACHURA, J. & SARFEH, I.J. Adaptation of gastric mucosa to chronic alcohol administration is associated with increased mucosal expression of growth factors and their receptor. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 193, p. 59–63, 1992.

TARNAWSKI, A.; STACHURA, J.; HOLLANDER, D.; SARFEH, I.J.; BOGDAL, J. Cellular aspects of alcohol-induced injury and prostaglandin protection of the human gastric mucosa. Focus on the mucosal microvessels. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 10, p. 35-45, 1988.

TAYLOR, A.B.; REHM, J. When risk factors combine: The interaction between alcohol and smoking for aerodigestive cancer, coronary heart disease, and traffic and fire injury. **Addictive Behaviors**, *In press*, 2006.

TEPPERMAN, B.L.; WHITTLE, B.J.R. Endogenous nitric oxide and sensory neuropeptides interact in the modulation of the rat gastric microcirculation. **British Journal of Pharmacology**, v. 105, p. 171-175, 1992.

TORRABADELLA, L.; SALGADO, G.; BURNS, R.W.; BERMAN, I.R. Manometric study of topical sildenafil (Viagra) in patients with chronic anal fissure: sildenafil reduces anal resting tone. **Dis Colon Rectum**, v. 47(5), p. 733-738, 2004.

TOROUDI, H.P.; RAHGOZAR, M.; BAKHTIARIAN, A.; DJAHANGUIRI, B. Potassium channel modulators and indomethacin-induced gastric ulceration in rats. **Scand J Gastroenterology**, v. 34(10), p. 962-966, 1999.

TRIER, J.S.; SZABO, S.; ALLAN, C.H. Ethanol-induced damage to mucosal capillaries of rat stomach. Ultrastructural features and effects of prostaglandin E2 and cysteamine. **Gastroenterology**, v. 92, p. 13-22, 1987.

TURKO, I.V.; FRANCIS, S.H.; CORBIN, J.D. Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding c-GMPspecific phosphodiesterase (PDE 5) is required for its phosphorylation. **Biochem. J.**, v. 329, p. 505–510, 1998.

UEKI, S.; TAKEUCHI, K.; OKABE, S. Gastric motility is an important factor in the pathogenesis of indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats, **Digestive Diseases and Science**, v. 33, p. 209- 216, 1988.

WALLACE, J.L.; GRANGIER, N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB J.**, v. 10, p. 731–740, 1996.

WALLACE, J.L.; MILLER, M.J. Nitric Oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, p. 512-520, 2000.

WARRINGTON, J.S.; SHADER, R.I.; VON MOLTKE, L.L.; GREENBLATT, D.J. In vitro biotransformation of sildenafil (Viagra): Identification of human cytochromes and potential drug interactions. **Drug Metab Dispos**, v. 28, p. 392-397. 2000.

WHITTLE, B.J.R.; KAUFFMAN, G. L.; MONCADA, S. Vasoconstriction with thromboxane A2 induces ulceration of the gastric mucosa. **Nature**, v. 292, p. 472- 474, 1981.

WHITTLE, B.J.R.; LASZLO, F.; EVANS, S.M.; MONCADA, S. Induction of nitric oxide synthase and injury in the rat jejunum provoked by indomethacin. **British Journal of Pharmacology**, v. 116, p. 2286-2290, 1995.

WHITTLE, B.J.R.; LOPEZ-BELMONTE, J.; MONCADA, S. Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interaction with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 99, p. 607-611, 1990.

WILDE, A.A.; JANSE, M.J. Electrophysiological effects of ATP sensitive potassium channel modulation: implications for arrhythmogenesis. **Cardiovasc. Res.**, v. 28 (1), p. 16–24, 1994.

WINK, D.A.; COOK, J.A.; PACELLI, R.; LIEBMANN, J.; KRISHNA, M.C.; MITCHEL, J.B. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. **Toxicology Letters**, v. 82/83, p. 221-226, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The world health report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. Geneva: World Health Organization. 2002.

WU, D.; CEDERBAUM, A.I. Role of p38 MAPK in CYP2E1-dependent arachidonic acid toxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 1115–1124, 2003.

YANAKA, A.; MUTO, H.; FUKUTOMI, H.; ITO, S.; SILEN, W. Role of nitric oxide in restitution of injured guinea pig gastric mucosa in vitro. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. 933–942, 1995.

YOKOSHIKI, H.; SUNAGAWA, M.; SEKI, T.; SPERELAKIS, N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. 25–37, 1998.

YONEI, Y.; HOLZER, P.; GUTH, P.H. Laparotomy-induced gastric protection against ethanol injury is mediated by capsaicin-sensitive sensory neurons. **Gastroenterology**, v. 99, p. 3-9, 1990.

ZHANG, J.; CHEN, Z.; COBB, F.R.; STAMLER, J.S. Role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin-induced vasodilation of coronary and systemic vessels: an intact canine model. **Circulation**, v. 110, p. 750–755, 2004.