

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

JERÔNIMO JUNQUEIRA JÚNIOR

EFEITO GASTROPROTETOR DA AMIFOSTINA (ETHYOL®) NA LESÃO GÁSTRICA
INDUZIDA POR ETANOL EM RATOS: PAPEL DOS GRUPOS SULFIDRÍLICOS NÃO-
PROTÉICOS E NEURÔNIOS SENSORIAIS AFERENTES.

FORTALEZA

2008

JERÔNIMO JUNQUEIRA JÚNIOR

EFEITO GASTROPROTETOR DA AMIFOSTINA (ETHYOL®) NA LESÃO GÁSTRICA
INDUZIDA POR ETANOL EM RATOS: PAPEL DOS GRUPOS SULFIDRÍLICOS NÃO-
PROTÉICOS E NEURÔNIOS SENSORIAIS AFERENTES.

Dissertação submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre em Farmacologia.

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

FORTALEZA

2008

J94e

Junqueira Júnior, Jerônimo

Efeito gastroprotetor da amifostina (ethyol®) na lesão gástrica induzida por etanol em ratos: papel dos grupos sulfidrílicos não-protéicos e neurônios sensoriais aferentes / Jerônimo Junqueira Júnior; Orientador: Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza. - Fortaleza, 2008 .

117f. :il.

Dissertação – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, 2008.

1. Amifostina 2. Úlcera Gástrica 3 Compostos de Sulfidril I. Souza, Marcellus Henrique Loiola Ponte de (Orient.) II. Título

CDD: 615.1

JERÔNIMO JUNQUEIRA JÚNIOR

EFEITO GASTROPROTETOR DA AMIFOSTINA (ETHYOL®) NA LESÃO GÁSTRICA
INDUZIDA POR ETANOL EM RATOS: PAPEL DOS GRUPOS SULFIDRÍLICOS NÃO-
PROTÉICOS E NEURÔNIOS SENSORIAIS AFERENTES.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Farmacologia.

Aprovada em 06 / 06 / 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida
Universidade Federal do Ceará - UFC

*Dedico esta dissertação aos meus pais
Jerônimo e Socorro, ao meu irmão Rênio
e a minha esposa Flávia,
pelo amor e apoio de sempre.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os êxitos e projetos realizados ao longo da minha vida.

Ao professor Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, por sua completa e dedicada orientação, disponibilidade, ensinamentos, profissionalismo e incentivo na realização deste trabalho.

À professora Dra. Gerly Anne de Castro Brito, por sua disponibilidade e colaboração nas leituras histológicas deste estudo.

À professora Dra. Mariana Lima Vale, por sua dedicação e agradável convivência.

Ao professor Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, exemplo de competência e dedicação ao ensino e à pesquisa.

Ao professor Dr. Miguel Nasser Hissa, pelo incentivo à minha formação acadêmica e pelo exemplo de profissionalismo e ética.

À minha esposa Ana Flávia, pela presença constante em minha vida, pelo amor e dedicação e pelo apoio fundamental na realização deste trabalho.

Aos meus pais e meu irmão, que ajudaram a construir meu caráter, pelo amor e incentivo e pela oportunidade de chegar a este nível acadêmico.

Aos alunos de medicina, Sérgio e Ana Carolina, pela grande ajuda e amizade construída na realização deste trabalho.

Aos meus amigos, Roberto, Jand e Antonieila, pelo conhecimento e disposição constante em ajudar.

A todos os meus amigos, pela valiosa amizade, estímulo, suporte e pelos momentos de alegria proporcionados.

Aos pós-graduandos do LAFICA pela agradável convivência e ajuda constante.

Ao técnico José Ivan, por seu exemplo de profissional público, fé e constante disponibilidade na confecção das lâminas.

À técnica de laboratório Maria Silvandira (Vandinha) pela ajuda, convivência e dedicação ao LAFICA.

À Aura, secretária da pós-graduação, e a todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A amifostina (WR-2721) tem sido largamente estudada como agente citoprotetor em diferentes órgãos e contra os mais diversos agressores do organismo humano. Recentemente, um efeito gastroprotetor deste fármaco foi observado em modelo de lesão gástrica induzida por indometacina (MOTA *et al.*, 2007). **OBJETIVOS:** Este trabalho investigou o efeito da amifostina na lesão gástrica por etanol e o papel dos neurônios sensoriais aferentes, grupos sulfidrílicos não-protéicos, óxido nítrico, canais de potássio sensíveis ao ATP e ciclooxigenase-2 nesse processo. **MÉTODOS:** Ratos Wistar foram tratados com amifostina (22,5, 45, 90 ou 180 mg/kg, v.o. ou s.c.). Após 30 minutos, os animais receberam etanol absoluto (5 ml/kg v.o.). Decorridos 60 minutos da administração de etanol, os animais foram sacrificados. Foram realizados estudos macroscópicos e histológicos, bem como dosagem de grupos sulfidrílicos não-protéicos e de hemoglobina em fragmentos de estômago. Outros grupos foram pré-tratados com L-NAME (10 mg/kg i.p.), glibenclamida (10 mg/kg v.o.), celecoxibe (10 mg/kg v.o.) ou salina. Após 30 minutos os ratos receberam amifostina (90 mg/kg v.o. ou s.c.) e depois de mais 30 minutos etanol absoluto (5 ml/kg), com sacrifício ocorrendo 60 minutos depois. Um grupo de animais foi desensibilizado com capsaicina (125 mg/kg s.c.) entre 10 a 14 dias antes do protocolo de tratamento com amifostina. **RESULTADOS:** A amifostina preveniu de forma significativa o dano macroscópico causado por etanol no estômago nas doses de 45, 90 e 180 mg/kg quando administrada por via oral e 90 e 180 mg/kg quando utilizada por via subcutânea. Os parâmetros histológicos, edema, hemorragia e perda de células epiteliais, também foram reduzidos ($p < 0,05$) com o uso de amifostina. Os animais que receberam apenas etanol apresentaram níveis reduzidos de GSH no estômago. A amifostina reverteu esse efeito através de um estímulo à produção *de novo* de GSH ou pela prevenção do consumo destes grupos. A gastroproteção da amifostina na lesão induzida pelo etanol foi revertida pela administração prévia de doses neurotóxicas de capsaicina, mas não pelo uso de L-NAME, glibenclamida ou celecoxibe. **CONCLUSÕES:** A amifostina protege a mucosa gástrica contra a injúria induzida pelo etanol através de um aumento dos níveis de GSH e estimulação de neurônios sensoriais aferentes no estômago. Esse efeito parece ser independente da ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP e da atividade de óxido nítrico sintase e ciclooxigenase-2.

Palavras-chave: Amifostina, Etanol, Grupos Sulfidrílicos Não-Protéicos, Neurônios Sensoriais Aferentes, Lesão Gástrica, Defesa Gástrica.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Amifostine (WR-2721) has been widely tested as a cytoprotective agent against a number of aggressors in different organs. Recently, a gastroprotective effect was observed for this drug in a model of indomethacin-induced gastric injury (MOTA *et al.*, 2007). **OBJECTIVES:** We investigated the effect of amifostine on ethanol-induced gastric injury and the role played by afferent sensory nerves, non-protein sulfhydryl groups, nitric oxide, ATP-sensitive potassium channels and cyclooxygenase-2 in the mechanism. **METHODS:** Wistar rats were treated with amifostine (22.5, 45, 90 or 180 mg/kg, p.o. or s.c.). Thirty minutes after amifostine administration, the animals were given 100% ethanol (5 ml/kg p.o.). Sixty minutes after ethanol administration the animals were euthanized. Macroscopic and histological studies were carried out and stomach fragments were retrieved and submitted to analysis for non-protein sulfhydryl groups and hemoglobin. Some animals were pretreated with L-NAME (10 mg/kg i.p.), glibenclamide (10 mg/kg p.o.), celecoxib (10 mg/kg p.o.) or saline solution. Thirty minutes after pretreatment the animals were given amifostine (90 mg/kg p.o. or s.c.) and, after another 30 minutes, 100% ethanol (5 ml/kg). The animals were euthanized 60 minutes later. Other rats were desensitized with capsaicin (125 mg/kg s.c.) 10-14 days before amifostine treatment. **RESULTS:** Amifostine treatment significantly reduced ethanol-induced macroscopic stomach injury at 45, 90 and 180 mg/kg p.o. and at 90 and 180 mg/kg s.c. The histological parameters (edema, hemorrhage and epithelial cell loss) were also reduced ($p < 0.05$) when the animals were treated with amifostine. Animals receiving ethanol only presented reduced GSH levels in the stomach. Amifostine reverted this effect either by stimulating *de novo* GSH production or by preventing the consumption of GSH. Amifostine-promoted gastroprotection against ethanol-induced stomach injury was reversed by pretreatment with neurotoxic doses of capsaicin, but not by L-NAME, glibenclamide or celecoxib. **CONCLUSIONS:** Amifostine protects against ethanol-induced gastric injury by increasing GSH levels and stimulating the afferent sensory nerves in the stomach independently of ATP-sensitive potassium channels activation, nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 activity.

Keywords: Amifostine, Ethanol, Non-Protein Sulfhydryl Groups, Afferent Sensory Nerves, Gastric Injury, Gastric Defense.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Esquema representativo dos efeitos do consumo agudo e crônico de etanol no estômago.....	22
FIGURA 2	Estado reduzido (GSH) e oxidado (GSSH) da glutatona. Doação de elétrons e inativação de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	25
FIGURA 3	Estrutura química da amifostina (WR-2721).....	32
FIGURA 4	Amifostina: Fórmulas estruturais e ativação dos principais metabólitos.....	33
FIGURA 5	Efeito macroscópico e microscópico do uso de amifostina na lesão gástrica induzida por etanol. Fotos A e C: salina e etanol 5 ml/kg v.o. Fotos B e D: amifostina s.c. 90 mg/kg e etanol 5 ml/kg.....	52
FIGURA 6	Efeito protetor da amifostina (v.o.) na lesão gástrica induzida por etanol.....	53
FIGURA 7	Efeito protetor da amifostina (s.c.) na lesão gástrica induzida por etanol.....	53
FIGURA 8	Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina v.o.....	55
FIGURA 9	Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina s.c.....	55
FIGURA 10	Análise dos níveis de glutatona (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina v.o.....	56
FIGURA 11	Análise dos níveis de glutatona (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina s.c.....	56
FIGURA 12	Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina v.o.....	57
FIGURA 13	Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina s.c.....	57
FIGURA 14	Efeito macroscópico e microscópico do uso de amifostina na lesão gástrica induzida por etanol. Fotos A e C: salina e etanol 5 ml/kg v.o. Fotos B e D: amifostina v.o. 90 mg/kg 24h antes e etanol 5 ml/kg v.o.....	60
FIGURA 15	Efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol: estudo tempo-resposta.....	61

FIGURA 16	Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina, v.o. ou s.c., 6 ou 24 horas antes.	63
FIGURA 17	Análise dos níveis de Glutathione (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina. Estudo tempo-resposta.....	64
FIGURA 18	Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina. Estudo tempo-resposta.....	65
FIGURA 19	Efeito da depleção de neurônios aferentes pela capsaicina sobre o efeito gastroprotetor da amifostina na lesão gástrica induzida pelo etanol. Fotos A e C: amf v.o. 90 mg/kg e etanol 5 ml/kg v.o. Fotos B e D: Capsaicina 125 mg/kg s.c., amf v.o. 90 mg/kg e etanol 5 ml/kg.....	68
FIGURA 20	Efeito da depleção de neurônios aferentes pela capsaicina sobre o efeito gastroprotetor da amifostina na lesão gástrica induzida pelo etanol. Estudo macroscópico.....	69
FIGURA 21	Avaliação histológica do efeito da depleção de neurônios aferentes pela capsaicina sobre o efeito gastroprotetor da amifostina na lesão gástrica por etanol.....	71
FIGURA 22	Análise dos níveis de Glutathione (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com doses neurotóxicas de capsaicina e amifostina.....	72
FIGURA 23	Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com doses neurotóxicas de capsaicina e amifostina.....	73
FIGURA 24	Efeito macroscópico e microscópico do uso de glibenclâmida, celecoxibe e L-NAME na proteção promovida pela amifostina contra a lesão gástrica induzida por etanol.....	76
FIGURA 25	Avaliação macroscópica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg v.o. – Modulação farmacológica.....	77
FIGURA 26	Avaliação macroscópica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg s.c. – Modulação farmacológica	77
FIGURA 27	Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg v.o. – Modulação farmacológica.....	79
FIGURA 28	Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg s.c. – Modulação farmacológica.....	79

FIGURA 29	Análise dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg v.o.– Modulação farmacológica.....	80
FIGURA 30	Análise dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg s.c. – Modulação farmacológica.....	80
FIGURA 31	Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg v.o.– Modulação farmacológica.....	81
FIGURA 32	Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg s.c. – Modulação farmacológica.....	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Avaliação microscópica: perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia em estômago de ratos tratados com amifostina v.o.....	54
TABELA 2	Avaliação microscópica: perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia em estômago de ratos tratados com amifostina s.c.....	54
TABELA 3	Avaliação microscópica: perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia em estômago de ratos tratados com amifostina 90mg/kg, v.o. e s.c., 6 e 24 horas.....	62
TABELA 4	Avaliação microscópica do efeito da depleção de neurônios aferentes pela capsaicina no efeito gastroprotetor da amifostina na lesão gástrica por etanol.....	70
TABELA 5	Avaliação microscópica: perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia em estômago de ratos tratados com amifostina v.o. – Modulação farmacológica.....	78
TABELA 6	Avaliação microscópica: perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia em estômago de ratos tratados com amifostina s.c. – Modulação farmacológica.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato de Adenosina
Amf	Amifostina
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de Adenosina
Bcl-2	Célula-B de linfoma 2
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
Clx	Celecoxibe
cm	Centímetro
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CSSN	Neurônios Sensoriais Sensíveis a Capsaicina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
DSMO	Dimetil Sulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPM	Erro Padrão da Média
et al.	E colaboradores
etc.	Et cetera
g	Gramas
Glib	Glibenclamida
GMP _C	Guanosina Monofosfato Cíclico
GSH	Glutathione
GSSH	Dissulfeto de Glutathione
h	Hora
Hb	Hemoglobina
HIF-1	Fator 1 Induzível por Hipóxia

i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
Inc.	Corporação
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
K _{ATP}	Canais de Potássio Sensíveis ao ATP
kg	Quilograma
L	Litro
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil-éster
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
LNM	L-NAME
MD	Estado de Maryland
µg	Micrograma
mg	Miligrama
µm	Micrômetro
mm ²	Milímetros quadrados
µL	Microlitro
ml	Mililitro
nm	Nanômetro
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NP-SH	Grupos Sulfidrílicos Não-Protéicos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PG _S	Prostaglandinas
pH	Potencial Hidrogeniônico
p.o.	Per os
Prof.	Professor
PTH	Hormônio da Paratireóide
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
rpm	Rotações Por minuto

s.c.	Subcutâneo
SNC	Sistema Nervoso Central
SUR	Receptores de Sulfoniuréia
TCA	Ácido Tricloroacético
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRPV1	Canal de Potencial Transiente tipo Vanilóide subtipo 1
UFC	Universidade Federal do Ceará
v.o.	Via Oral
VR1	Receptor Vanilóide tipo 1
vs	Versus
WR	Walter Reed

LISTA DE SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
<	Menor que
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
®	Marca Registrada
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
H ⁺	Hidrogênio
H ₂	Receptores de histamina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
K	Potássio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Lesão gástrica por etanol	21
1.2. Mecanismos de defesa gástrica	23
1.2.1. Grupos sulfidrílicos não-protéicos e defesa da mucosa gástrica	23
1.2.2. Neurônios sensoriais aferentes e defesa da mucosa gástrica	25
1.2.3. Prostaglandinas e defesa da mucosa gástrica	27
1.2.4. Óxido nítrico e defesa da mucosa gástrica	29
1.2.5. Canais de potássio sensíveis ao ATP e defesa da mucosa gástrica	30
1.3. Amifostina	31
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Animais	42
3.2. Aparelhos e instrumentos laboratoriais	42
3.3. Drogas utilizadas	43
3.4. Corantes	43
3.5. Soluções	43
3.6. Efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol em ratos	45
3.7. Papel dos neurônios aferentes no efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol em ratos	45
3.8. Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP, do óxido nítrico e da ciclooxigenase-2 no efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol em ratos	46
3.9. Avaliação histológica da mucosa dos animais	47
3.10. Análise dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica dos animais	47

3.11. Quantificação dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais	47
3.12. Análise estatística	48
4. RESULTADOS	49
4.1. Efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol: curva dose-resposta	50
4.1.1. Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina	50
4.1.2. Análise dos níveis de glutathione (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina	51
4.1.3. Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina	51
4.2. Efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol: estudo tempo-resposta	58
4.2.1. Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina: estudo tempo-resposta	58
4.2.2. Análise dos níveis de glutathione (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina: estudo tempo-resposta	58
4.2.3. Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina: estudo tempo-resposta	59
4.3. Papel dos neurônios de via aferente no efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol em ratos	66
4.3.1. Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com capsaicina e/ou amifostina	66
4.3.2. Análise dos níveis de glutathione (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com capsaicina e/ou amifostina	66
4.3.3. Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com capsaicina e/ou amifostina	67
4.4. Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP, do óxido nítrico e da ciclooxigenase-2 no efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol em ratos	74
4.4.1. Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina – modulação farmacológica com glibenclamida, L-NAME e celecoxibe	74

4.4.2. Análise dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina – modulação farmacológica com glibenclamida, L-NAME e celecoxibe	75
4.4.3. Quantificação dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina – modulação farmacológica com glibenclamida, L-NAME e celecoxibe	75
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	94

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O consumo de etanol, principal componente das bebidas alcoólicas, acompanha a humanidade desde a era pré-histórica. Resíduos de etanol foram encontrados recentemente em uma olaria de aproximadamente 9.000 anos, implicando que as bebidas alcoólicas são utilizadas desde o povo neolítico (ROACH, 2005). Hoje, muitos efeitos do etanol no organismo são conhecidos, sendo a maioria deles maléfica quando o uso é exagerado. A maioria dos países regula ou restringe a venda e o consumo desta droga; por exemplo, no Brasil, Austrália e Canadá apenas pessoas acima de 18 anos têm permissão para comprar bebidas alcoólicas. No Japão, a idade legal para comprar e consumir bebidas alcoólicas é de 20 anos.

O impacto do etanol na sociedade é tamanho que a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem designado subdivisões para o estudo da epidemiologia do seu consumo. Esse mesmo órgão divulgou na 60ª Assembléia Mundial de Saúde em Genebra que o consumo de etanol era responsável por 4,4% de todos os problemas de saúde no mundo, representando a quinta causa de morte prematura (WORLD AND HEALTH ORGANIZATION, 2002). O CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), agência do Departamento de Saúde dos Estados Unidos, apontou o consumo de etanol como responsável por aproximadamente 79.000 mortes a cada ano entre 2001 e 2005 naquele país. Diversos órgãos relacionados com a saúde pública têm direcionado esforços para promover a redução destes números. Da mesma forma, pesquisadores do mundo inteiro estudam os efeitos do etanol no organismo humano e procuram meios de prevenir e tratar as patologias ocasionadas por esta substância.

Apesar de possuir ações em diversos sistemas do organismo humano, os efeitos do etanol são mais conhecidos nos sistemas nervoso e gastrointestinal. No sistema nervoso central, seu efeito vai desde uma breve euforia até coma e morte dependendo da quantidade ingerida. O uso de etanol está também relacionado à síndrome de Wernicke-Korsakoff, consequência da deficiência de tiamina, vitamina B1 (BUTTERWORTH, 1995). No trato gastrointestinal, o etanol provoca exacerbação do refluxo gastroesofágico, carcinoma de células escamosas do esôfago (TUYNS *et al.*, 1979; BROWN *et al.*, 1997; HORI *et al.*, 1997), gastrite aguda (MINCIS *et al.*, 1995), cirrose (LIEBER, 1997), pancreatite crônica

(PITCHUMONI, 2001), diarreia e má absorção de nutrientes (BODE & BODE, 1997), além de muitos outros efeitos.

1.1. Lesão gástrica por etanol

O etanol é uma causa comum de lesão gástrica em humanos. É conhecido como uma substância tóxica que causa injúria à mucosa gástrica. Sua ingestão excessiva pode resultar em gastrite aguda, caracterizada por edema de mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (GUSLANDI, 1987). O etanol absoluto promove rapidamente a formação de bolhas enantemáticas na mucosa gástrica, devido a uma reação inflamatória aguda que provoca um aumento na permeabilidade vascular (SZABO *et al.*, 1985).

No estômago, o etanol aumenta a secreção de ácido gástrico, um efeito possivelmente mediado pela histamina e gastrina. A barreira da mucosa é uma das principais proteções 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). O etanol causa também depleção do muco protetor, 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 sua restituição. Alguns autores demonstraram que o óxido nítrico e as prostaglandinas são capazes de aumentar a secreção de muco no estômago (BROWN *et al.*, 1992).

Um importante efeito deletério do etanol no estômago é depleção dos grupos sulfidrílicos não-protéicos, que são necessários para a estabilização das membranas celulares, bem como para a eliminação de radicais livres. O etanol também influencia a atividade da musculatura, provoca estase gástrica, congestão capilar e aumento da permeabilidade vascular, aumentando o risco de hemorragia e ulceração, associados a lesões macroscópicas e microscópicas na mucosa (MACMATH, 1990; SANTOS & RAO, 2001).

Como consequência dos danos aos microvasos, o etanol 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 levam à formação de mais necrose na mucosa. Fisiopatologicamente, a lesão gástrica por etanol é mediada ou modulada por diversos fatores tais como a ciclooxigenase, lipoxigenase, citocinas, tromboxanos e radicais livres derivados do oxigênio (SAIKA *et al.*, 2000; TARNAWSKI *et al.*, 1998) Foi verificado também que o etanol causa um aumento na transmigração neutrofílica, de forma dose-dependente, com consequente dano celular no epitélio gástrico (KVIETYS *et al.*, 1990; SZABO *et al.*, 1985).

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

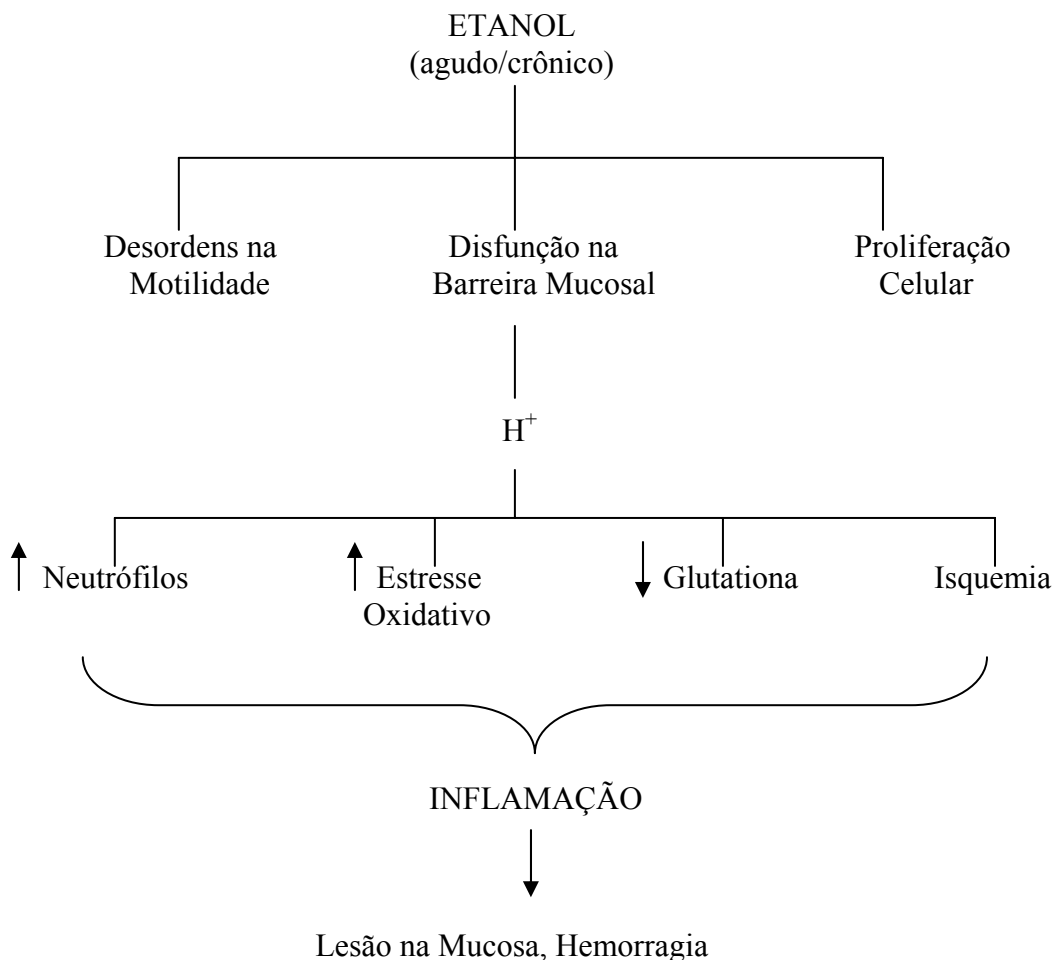


Figura 1: Esquema representativo dos efeitos do consumo agudo e crônico de etanol no estômago (SIEGMUND *et al.*, 2002).

1.2. Mecanismos de defesa gástrica

A secreção de ácido e pepsina, o refluxo de bile e conteúdo duodenal, a ingestão de drogas, particularmente os antiinflamatórios não esteroidais e o consumo de etanol entre outros, são ameaças constantes à integridade da mucosa gástrica (AASE, 1989; RICHARDSON, 1985). Estes estímulos lesivos determinam o aparecimento de uma reação inflamatória coordenada por vários mediadores liberados por células do epitélio e da lâmina própria, tendo como conseqüências a reparação ou o aparecimento de lesões na mucosa. A defesa da mucosa gástrica é a combinação de fatores responsáveis pela capacidade da mucosa em resistir a várias injúrias, como pH, osmolaridade, produtos bacterianos, bile e etanol. Alguns dos importantes mecanismos de defesa propostos são: secreção de muco e bicarbonato, proliferação e restituição celular, fluxo sangüíneo adequado e presença de óxido nítrico, prostaglandinas e compostos sulfidrílicos não-protéicos (CHEUNG, 1984; HUI *et al.*, 1991; MILLER, 1983). Pode-se agrupar estes mecanismos em pelo menos cinco níveis de defesa da mucosa gástrica. O primeiro nível é composto pelo muco e bicarbonato; o segundo nível é composto pela barreira formada pelo epitélio; o terceiro nível é constituído pela microcirculação; o quarto nível pelo sistema imunológico das mucosas e o quinto nível pela capacidade de reparação. A perda do equilíbrio entre as agressões e a defesa da mucosa, tanto pelo aumento das agressões como pela diminuição das defesas, determina o aparecimento das lesões inflamatórias no estômago, como a gastrite, mucosite, úlcera gástrica e as erosões gástricas. Estas condições clínicas são prevalentes no nosso meio, sendo importante a compreensão de suas fisiopatologias.

Dentre os vários mecanismos de defesa da mucosa gástrica pode-se destacar a presença dos grupos sulfidrílicos não-protéicos, a ativação de neurônios sensoriais aferentes, a ativação da síntese de prostaglandinas pelas COXs, a presença do óxido nítrico pela ativação da NOS constitutiva e a ativação dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}).

1.2.1. Grupos sulfidrílicos não-protéicos e defesa da mucosa gástrica

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo formado por cisteína, glutamato e glicina. Sua molécula possui uma ligação peptídica não muito comum entre o grupo amina da cisteína e o grupo carboxila do glutamato. A glutathiona é um antioxidante hidrossolúvel reconhecido como o mais importante componente endógeno do *pool* dos grupos sulfidrílicos não-protéicos

do nosso organismo (PARK *et al.*, 2000; GONZALES *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004), e atua protegendo as células contra toxinas como os radicais livres (STRUZYŃSKA *et al.*, 2005).

A síntese de GSH ocorre em duas etapas: primeiro, gama-glutamilcisteína é sintetizada a partir de glutamato e cisteína pela ação da enzima glutamilcisteína sintetase. Essa reação é a etapa limitante da síntese de GSH. Segundo, glicina é adicionada ao terminal C da glutamilcisteína pela ação da enzima glutathione sintetase (figura 2) (SMITH *et al.*, 1996). Embora todas as células do corpo humano sejam capazes de sintetizar GSH, a síntese hepática de GSH parece ser essencial à vida. Camundongos, geneticamente modificados, com ausência de síntese hepática de GSH têm sobrevida de apenas um mês após o nascimento (CHEN *et al.*, 2007).

Nas células, a glutathione existe em dois estados, reduzido (GSH) e oxidado (GSSH). No estado reduzido, o grupamento tiol da cisteína é capaz de doar um equivalente redutor ($H^+ + e^-$) para moléculas instáveis como os radicais livres. Ao doar elétrons, a glutathione torna-se reativa e prontamente reage com outra glutathione reativa formando dissulfetos de glutathione, sua forma oxidada (GSSH). Posteriormente, o GSH pode ser regenerado a partir de GSSH pela ação da enzima glutathione redutase (figura 2). Nas células normais, 90% do *pool* de glutathione estão no estado reduzido e só 10% encontram-se oxidado. Um aumento na razão GSSH/GSH é considerado indicativo de *stress* oxidativo. Além de atuar inativando radicais livres, a glutathione funciona como substrato da glutathione peroxidase, metabolizando H_2O_2 e outros hidroperóxidos no citosol e nas mitocôndrias (REED & FARISS, 1984).

A participação da glutathione nos mecanismos de defesa gástrica tem sido motivo de pesquisas já há algum tempo. Miller *et al.* (1985) e Mizui *et al.* (1986) mostraram que o GSH está presente em altas concentrações no estômago, quando comparado com outros órgãos, sugerindo seu papel gastroprotetor como um composto antioxidante endógeno. O etanol depleta os níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos contidos no tecido gástrico, e a restauração destes parece ser importante na gastroproteção (TRIER *et al.*, 1987; SZABO *et al.*, 1981). O GSH inibe o dano gástrico induzido por etanol, através da inativação de espécies reativas de oxigênio e produtos de peroxidação lipídica (SZABO *et al.*, 1992). Em adição, pesquisadores também têm relatado o aumento de GSH como mecanismo gastroprotetor de

algumas substâncias. Compostos sulfidrílicos, como o dimercaprol e a cisteamina, possuem atividade citoprotetora no tecido gástrico (SZABO *et al.*, 1981). O aumento nos grupos sulfidrílicos não-protéicos é um dos responsáveis pelo efeito protetor da amifostina na gastropatia induzida por indometacina (MOTA *et al.*, 2007).

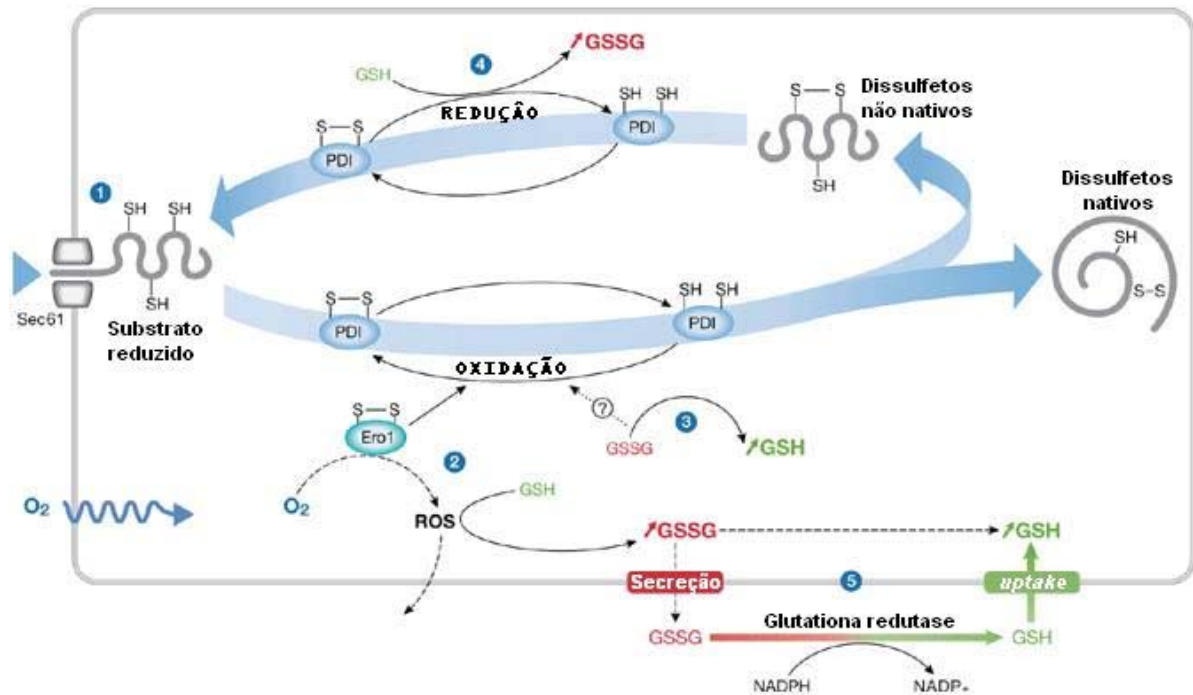


Figura 2: Estado reduzido (GSH) e oxidado (GSSH) da glutatona. Doação de elétrons e inativação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Adaptado de CHAKRAVARTHI *et al.*, 2006.

1.2.2. Neurônios sensoriais aferentes e defesa da mucosa gástrica

A pimenta vermelha, também conhecida como chili ou páprica, é comumente utilizada como especiaria na culinária mundial. A capsaicina (8-metil-N-Vanilil-6-nonamida) é um dos principais componentes desta planta do gênero *Capsicum* (MAGA, 1975; ROZIN, 1990). Uma vez que a capsaicina é naturalmente consumida pelos seres humanos, seus efeitos na mucosa gástrica são de particular interesse aos gastroenterologistas. Os estudos iniciais sobre o efeito da capsaicina na úlcera gastrointestinal mostraram resultados conflitantes. Em animais, a capsaicina exacerbou a lesão gástrica em modelos experimentais de úlcera (LEE, 1963; MAKARA *et al.*, 1965). A direta instilação de solução aquosa de capsaicina a 3% em estômago humano de voluntários, por gastroscopia, causou danos à mucosa gástrica (VIRANUVATTI, 1972). Foi então que Szolcsányi & Barthó (1981) mostraram que

neurônios sensoriais sensíveis a capsaicina (CSSN) estavam envolvidos nos mecanismos de defesa local contra a ulceração e que a capsaicina possuía efeitos benéficos contra úlcera gástrica. Suas observações foram posteriormente confirmadas por um grande número de investigadores (ABDEL-SALAM *et al.*, 1995; HOLZER & LIPPE, 1988; HOLZER & SAMETZ, 1986; MERCHANT *et al.*, 1994).

A importância do papel dos neurônios sensoriais sensíveis a capsaicina veio de estudos que mostraram que a administração sistêmica de capsaicina (GRAY *et al.*, 1994; HOLZER & LIPPE, 1988; SZOLCSÁNYI & BARTHÓ, 1981) ou a administração dentro do estômago de capsaicina em concentrações elevadas (ABDEL-SALAM *et al.*, 1995; SZOLCSÁNYI, 1990) resultaram em exacerbação do efeito lesivo de agentes ulcerogênicos. Por outro lado, a administração em baixas concentrações estimulou terminações periféricas de nervos sensoriais sensíveis a capsaicina e protegeu a mucosa gástrica contra injúrias diversas (ABDEL-SALAM *et al.*, 1997; HOLZER *et al.*, 1990; MERCHANT *et al.*, 1994).

A compreensão da via neuronal de defesa gástrica tem evoluído bastante nos últimos anos. A identificação do alvo molecular da capsaicina pela clonagem do receptor vanilóide (VR1) em ratos e humanos (CATERINA *et al.*, 1997; HAYES *et al.*, 2000) e a geração de camundongos nocauteados para o gene relativo a esse receptor (CATERINA *et al.*, 2000; DAVIS *et al.*, 2000) permitiram grandes avanços no estudo do papel desta via na gastroproteção. O receptor vanilóide tipo 1 (VR1), chamado de acordo com a nova nomenclatura de canal de potencial transiente tipo vanilóide subtipo 1 (TRPV1), está expresso numa subpopulação de nervos sensoriais sensíveis a capsaicina que respondem a estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos. Durante anos, pesquisadores concordaram com a idéia de que a expressão de TRPV1 era restrita a um subtipo específico de nervos sensoriais primários conhecidos como fibras finas C não mielinizadas (BUCK & BURKS, 1986). Posteriormente, a sensibilidade à capsaicina foi estendida também a neurônios A δ e neurônios vagais na raiz do gânglio dorsal (HOLZER, 1991).

A expressão de TRPV1 no estômago e trato gastrointestinal já foi demonstrada em ratos (NOZAWA *et al.*, 2001; PATTERSON *et al.*, 2003) e em humanos (FAUSSONE-PELLEGRINI *et al.*, 2005). A estimulação desses receptores sensoriais gástricos leva a liberação de substância P (KWOK & MCINTOSH, 1990), somatostatina e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (INUI *et al.*, 1991; REN *et al.*, 1993), mas inibe a

secreção de gastrina (REN *et al.*, 1993). O mecanismo pelo qual a capsaicina exerce seu efeito antiulcerogênico envolve primariamente um aumento do fluxo sanguíneo para a mucosa gástrica através da liberação de peptídeos vasodilatadores como o CGRP (ABDEL-SALAM *et al.*, 1996; HOLZER *et al.*, 1991; TACHÉ *et al.*, 1991). Aihara *et al.*, (2005 e 2006) demonstraram que fibras nervosas sensoriais que expressam o receptor TRPV1 são ativadas quando a barreira de muco protetora é rompida e ácido entra em contato com a lâmina própria. Essa ativação libera CGRP e óxido nítrico e leva a uma pronta hiperemia da mucosa facilitando outros mecanismos de defesa como secreção de bicarbonato e inibição da secreção de ácido gástrico. Ichikawa *et al.*, 2006 demonstraram que o CGRP e o óxido nítrico estimulam a síntese de mucina na mucosa do corpo gástrico. Okajima & Harada (2006) concluíram que o estímulo das vias aferentes tem papel antiinflamatório ao liberar CGRP, uma vez que esse peptídeo aumenta a formação de prostaciclina (PGI₂) e diminui a liberação de TNF- α .

1.2.3. Prostaglandinas e defesa da mucosa gástrica

O nome prostaglandina deriva de próstata. Estes compostos foram assim denominados devido a sua descoberta no líquido seminal em 1935 por um fisiologista sueco chamado Ulf von Euler. Na verdade, as prostaglandinas presentes no líquido seminal são produzidas nas vesículas seminais. Posteriormente, descobriu-se que muitos outros tecidos secretam essas substâncias para uma grande variedade de efeitos (Rang *et al.*, 2007).

As prostaglandinas (PGs) são encontradas virtualmente em todos os órgãos e tecidos humanos. Elas são sintetizadas nas células a partir de ácidos graxos essenciais como ácido gama-linolênico, ácido araquidônico e ácido eicosapentaenóico. A formação das PGs inicia-se com a ativação da fosfolipase A2 que pode ser provocada por estímulos fisiológicos (angiotensina, bradicinina, noradrenalina) ou por estímulos patológicos (lesão tecidual). A fosfolipase A2 atua sobre fosfolipídeos transformando-os em ácido araquidônico que por sua vez pode percorrer duas vias: a via da ciclooxigenase (COX), com formação de PGs e tromboxano, ou a via da lipoxigenase, com formação de leucotrienos (Rang *et al.*, 2007).

As PGs possuem diversas ações sobre o organismo humano, como vasodilatação, contração uterina, broncoconstrição e broncodilatação, inibição da agregação plaquetária, efeito pirogênico, etc. No estômago, as prostaglandinas exercem papel gastroprotetor e anti-

secretório (ROBERT *et al.*, 1979). Entre os mecanismos envolvidos nesta gastroproteção estão: o aumento da secreção de muco e bicarbonato (WILSON *et al.*, 1986), o aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (COLTON *et al.*, 1978), a modulação da secreção gástrica e a inibição da liberação de mediadores inflamatórios por mastócitos (BATISTA *et al.*, 2004). Alguns estudos mostraram o efeito das prostaglandinas na lesão induzida por etanol. O aparecimento de lesão gástrica induzida por etanol é inibido pela liberação de prostaglandinas endógenas na superfície da mucosa gástrica (HOLLANDER *et al.*, 1984). É conhecido que a prostaglandina E₂ (PGE₂) possui uma ação protetora contra a lesão gástrica provocada pelo etanol (GLAVIN *et al.*, 1996).

As prostaglandinas são resultantes de uma série de reações sobre o ácido araquidônico pelas ciclooxigenases (COX). Atualmente, sabe-se que há três isoformas desta enzima. A COX-1, também chamada de COX constitutiva, está presente na maioria dos tecidos e é responsável pela produção basal de PGs. A COX-2, chamada de COX induzida, produz PGs em estados patológicos como inflamação, dano tecidual e malignidade (WALLACE, 1997). A COX-3 tem sido identificada, mas sua exata função ainda está sendo avaliada. Essas isoformas apresentam algumas semelhanças: similar peso molecular, 65% da seqüência de aminoácidos homóloga e sítios catalíticos muito próximos. Contudo, são codificadas por genes diferentes e apresentam modelos de expressão também diferentes (HALTER *et al.*, 2001).

Acredita-se que a maior parte das prostaglandinas no tecido gástrico normal seja sintetizada pela ação da ciclooxigenase-1 (COX-1) (HALTER *et al.*, 2001). Segundo Vane & Botting (1988), a COX-1 é responsável por manter a integridade da mucosa e o fluxo sanguíneo, enquanto a ciclooxigenase-2 (COX-2) está envolvida no processo inflamatório. No entanto, estudos recentes vêm demonstrando um papel relevante da COX-2 na defesa da mucosa gastrointestinal. Tegeder *et al.* (2000) mostraram a contribuição da COX-2 na síntese de prostaglandinas no estômago de ratos. Brzozowski *et al.* (1999) e Maricic *et al.* (1999) demonstraram que inibidores seletivos da COX-2 pioraram a lesão gástrica por isquemia e reperfusão. Recentemente, Miyake *et al.* (2002) observaram que no curso de uma reação inflamatória gástrica ocorreu um aumento da expressão de COX-2 e uma adaptação da mucosa à lesão por etanol. Souza *et al.* (2003) demonstraram que o efeito protetor da gastrite por iodocetamina em ratos é inibido pelo rofecoxibe, um inibidor seletivo de COX-2.

1.2.4. Óxido nítrico e defesa da mucosa gástrica

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que participa da sinalização de inúmeros processos fisiológicos como o relaxamento do músculo liso, neurotransmissão, agregação plaquetária, regulação de mecanismos pró e anti-apoptóticos e controle da pressão arterial e fluxo sanguíneo regional (RADOMSKI & MONCADA, 1993; KIM *et al.*, 2001). Na presença de oxigênio molecular, o terminal guanidino nitrogenado da L-arginina produz NO e L-citrulina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (KUO & SCHROEDER, 1995).

Atualmente, existem três isoformas conhecidas de NOS: NOS neuronal (nNOS ou NOS1), NOS induzível (iNOS ou NOS2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3) (MONCADA *et al.*, 1991; PFEILSCHIFTER *et al.*, 2001). A nNOS é uma NOS constitutiva, presente em neurônios, células epiteliais, mácula densa do rim, medula adrenal, músculo esquelético, órgão sexual masculino, células β pancreáticas e outros. É cálcio-calmodulina dependente e regula a transmissão sináptica no SNC além de atuar na regulação central da pressão sanguínea, no relaxamento do músculo liso e na vasodilatação via nervos periféricos. A iNOS está normalmente ausente em células sob condições basais. Sua expressão pode ser induzida em diferentes tipos de células e tecidos seguindo a exposição a estímulos imunológicos e inflamatórios como citocinas e produtos bacterianos como o lipopolissacarídeo. Esta isoforma produz grande quantidade de NO que tem efeito citostático e citotóxico por inibição de enzimas contendo ferro, causando fragmentação de DNA. Entre os efeitos protetores do NO gerado pela iNOS estão sua ação microbicida, antiviral, antiparasitária e antitumoral. A eNOS é uma NOS constitutiva e produz NO no endotélio vascular sob condições basais. O NO liberado no lúmen vascular é um potente inibidor de adesão e agregação plaquetária, da adesão de leucócitos ao endotélio vascular, da proliferação de células da musculatura lisa vascular e também é responsável pela regulação da pressão sanguínea e contratilidade do músculo cardíaco (FÖRSTERMANN *et al.*, 1994).

O óxido nítrico tem propriedades citoprotetoras no trato gastrointestinal (PALMER *et al.*, 1988). Em relação à mucosa gastrointestinal, Wallace & Miller propuseram que o NO seria um importante mediador na defesa da mucosa, mas, paradoxalmente, em várias situações, poderia contribuir para a lesão desta. A presença de NO em baixas concentrações está associada aos efeitos benéficos no TGI, como o aumento na secreção de muco,

manutenção da barreira epitelial e da microcirculação e estimulação do reparo da mucosa. Por outro lado, o NO em elevadas concentrações, pode induzir a formação de radicais derivados do nitrogênio, que são tóxicos para várias linhagens celulares (WALLACE & MILLER, 2000).

Alguns trabalhos recentes têm confirmado o papel do óxido nítrico endógeno na gastroproteção contra diferentes agressores. Santos *et al.* (2005) mostraram que o sildenafil, droga estimuladora da via NO/GMP_C, protegeu a mucosa gástrica da lesão por indometacina. Medeiros *et al.* (2008) mostraram também uma ação protetora do sildenafil na lesão gástrica induzida por etanol. O uso de L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase, prolongou a cicatrização da injúria gástrica aguda (KONTUREK *et al.*, 1993) e aumentou a intensidade da lesão provocada por etanol em estômago de ratos (NAHAVANDI *et al.*, 1999).

1.2.5. Canais de potássio sensíveis ao atp e defesa da mucosa gástrica

Os canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) são um tipo de canal de potássio, canais iônicos mais amplamente distribuídos no organismo humano, e são formados por subunidades Kir6.0 e receptores de sulfoniuréia (SUR), além de outros componentes adicionais. Esses canais podem ser encontrados não só na membrana plasmática, mas também nas mitocôndrias e no núcleo das células. Inicialmente descobertos em células cardíacas (NOMA, 1983), logo foram reconhecidos em diversos órgãos como pâncreas (ASHCROFT *et al.*, 1984), músculo esquelético (SPRUCE *et al.*, 1985), rins (HUNTER & GIEBISCH, 1988), cérebro (ASHFORD *et al.*, 1988) e músculo liso (STANDEN *et al.*, 1989).

Os canais de potássio sensíveis ao ATP são formados por oito subunidades protéicas. Quatro destas são subunidades Kir6.0, podendo ser Kir6.1 ou Kir6.2. Os outros quatro componentes são receptores de sulfoniuréia (SUR1, SUR2A e SUR2B) (INAGAKI *et al.*, 1995). As subunidades Kir6.0 possuem dois domínios transmembrana e formam o poro do canal. As subunidades SUR têm três domínios transmembrana adicionais e contêm dois domínios com sítio de ligação para nucleotídeo no lado citoplasmático (SEINO & MIKI, 2003). Isso permite uma regulação do canal de potássio mediada por nucleotídeos que desempenham um papel crítico no metabolismo como sensor do *status* metabólico. Apesar de todos os K_{ATP} serem constituídos de oito subunidades, quatro Kir6.0 e quatro SUR, sua precisa composição é órgão específica (ZHUO *et al.*, 2005).

A regulação da abertura dos K_{ATP} responde a diferentes compostos dependendo do tecido em que se encontram e, mais especificamente, do substrato metabólico primário deste tecido. Nas células beta pancreáticas, que são supridas basicamente por ATP, a razão ADP/ATP determina a atividade do canal. Sob condições normais, quando a quantidade de ATP é relativamente abundante, os canais encontram-se fechados. Contudo, se as células beta forem sujeitas a privação de oxigênio ou glicose, os níveis de ADP se elevam e os canais se abrem (MARKWORTH *et al.*, 2000). Nos miócitos cardíacos, onde grande parte do aporte nutricional vem de ácidos graxos de cadeia longa, os K_{ATP} permanecem estavelmente fechados quando há abundância de ácidos graxos e se abrem na ausência desse substrato (KOSTER *et al.*, 2001).

Os K_{ATP} participam de diversos processos fisiológicos como liberação de neurotransmissores (LISS *et al.*, 1999), controle da secreção de insulina e glucagon (ASHCROFT *et al.*, 1984), citoproteção na isquemia cardíaca e cerebral, reatividade vascular e manutenção do tônus do músculo liso (DAUT *et al.*, 1994). Apesar de não ter sua ação completamente elucidada no estômago, os K_{ATP} parecem estar envolvidos com a contratilidade do estômago, a regulação do fluxo sanguíneo e com a secreção de ácido gástrico (TOROUDI *et al.*, 1999). Nos últimos dez anos, estudos utilizando glibenclamida e diazóxido, respectivamente, inibidor e ativador dos K_{ATP} , têm demonstrado que a ativação desses canais tem participação na proteção gástrica contra diferentes agressores. Akar *et al.*, (1999) demonstraram que o diazóxido reduziu a lesão gástrica e a infiltração neutrofílica induzida por indometacina, enquanto o uso de glibenclamida reverteu esses achados. A ativação de canais K_{ATP} também está envolvida na proteção gástrica do sildenafil contra a lesão induzida por etanol (MEDEIROS *et al.*, 2008). Gomes *et al.* (2006) demonstraram que os canais K_{ATP} têm papel na gastroproteção do LPS contra a lesão induzida por indometacina e, Rahgozar *et al.* (2001) mostraram que o diazóxido inibiu as lesões gástricas provocadas por etanol, enquanto a glibenclamida aumentou essas lesões.

1.3. Amifostina

O WR (Walter-Reed)-2721, hoje conhecido como amifostina, foi originalmente desenvolvido durante a Guerra Fria pelo Instituto Walter Reed, pertencente à Divisão Anti-Radiação das Forças Armadas Americanas, quando se buscava uma substância com efeito protetor contra os danos causados pela radiação ionizante (YUHAS & STORER, 1969;

CAPIZZI, 1996; MCCAULEY, 1997; FOSTER-NORA & SIDEN, 1997; VALERIOTE & TOLEN, 1982). Dentre 4.400 fármacos, a amifostina ganhou destaque devido ao seu potencial citoprotetor e seu perfil de uso clínico bastante seguro (SCHUCHTER, 1996). Posteriormente, esta droga foi testada em diversos estudos envolvendo não só radioterapia, mas também quimioterapia (SCHUCHTER, 1997; MCCAULEY, 1997; VALERIOTE & TOLEN, 1982; TANNEHILL & MEHTA, 1996; LIST *et al.*, 1996). Hoje, a amifostina (Ethyol®; MedImmune Oncology, Inc. Gaithersburg, MD) é utilizada como agente citoprotetor de largo espectro em pacientes submetidos a radioterapia e quimioterapia com ciclofosfamida e cisplatina (FOSTER-NORA & SIDEN, 1997).

A amifostina é um tiofosfato orgânico conhecido quimicamente como 2-[(3-aminopropil)amino]-etilsulfanil ácido fosfônico, e sua estrutura química é a seguinte:

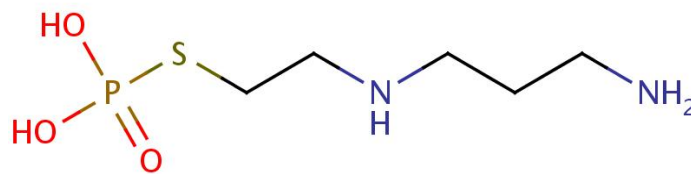


Figura 3: Estrutura química da amifostina (WR-2721).

A amifostina é uma pró-droga fosforilada, isto é, um fármaco inativo quando injetado. Nos tecidos, ela é defosforilada por ação de uma fosfatase alcalina (enzima presente nas membranas celulares) a um tiol livre WR-1065, sua forma ativa (figura 4) (VAN DER VIJGH & KORST, 1996; SHAW *et al.*, 1988; CALABRO-JONES *et al.*, 1985). Uma vez dentro das células, o WR-1065 promove sua ação protetora através de dois mecanismos principais: “varredura” de espécies reativas do oxigênio e reparo do DNA nuclear. Além disso, alguns estudos têm sugerido mecanismos adicionais que também podem ter importante papel na ação da amifostina. O WR-1065 é oxidado a um segundo metabólito ativo, um composto dissulfeto simétrico de WR-1065 (WR-33278) ou dissulfeto misto (figura 4) (CAPIZZI, 1996; VAN DER VIJGH & KORST, 1996; FLECKENSTEIN *et al.*, 1988).

A forma ativa WR-1065 parece ser o principal responsável pelas ações citoprotetoras da amifostina. Esse composto é capaz de se ligar diretamente a formas ativas de drogas quimioterapêuticas, promovendo detoxificação. Esses produtos neutralizados são

provenientes, principalmente, de agentes alquilantes e organoplatinicos, como a ciclofosfamida e a cisplatina, respectivamente (CULY & SPENCER, 2001). Outro importante fármaco antineoplásico que tem ação citotóxica diminuída pela amifostina é o paclitaxel. Foi demonstrado que a administração de amifostina antes do paclitaxel reduziu a neurotoxicidade e a lesão em fibroblastos pulmonares induzidas por este antineoplásico (DIPAOLA *et al.*, 1996).

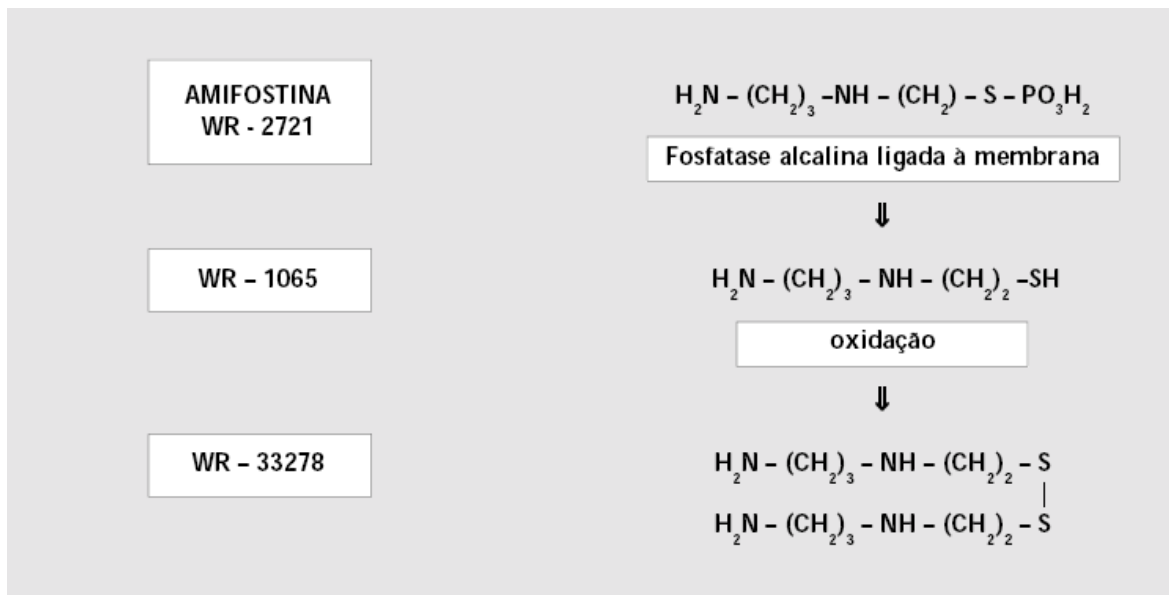


Figura 4: Amifostina: Fórmulas estruturais e ativação dos principais metabólitos. Adaptado de VAN DER VIJGH & PETERS, 1994.

Um notável mecanismo de citoproteção da amifostina é sua ação antioxidante, “varrendo radicais livres” (GRIGGS, 1998; CAPIZZI, 1996; FOSTER-NORA & SIDEN, 1997; SHAW *et al.*, 1996; TRESKES *et al.*, 1992). As células normalmente são capazes de se defender da ação de radicais através de enzimas como a superóxido dismutase e outras substâncias antioxidantes como a glutatona. Quando a formação de radicais livres excede a capacidade fisiológica celular de eliminação destes, ocorrem danos ao DNA e a diversas outras estruturas celulares. O tiol livre WR-1065 da amifostina age dentro das células se ligando e neutralizando os radicais livres formados em excesso devido à radiação ionizante, à quimioterapia ou a outro fator qualquer que induza a geração dessas moléculas instáveis (MCCAULEY, 1997; VALERIOTE & TOLEN, 1982; TANNEHILL & MEHTA, 1996; LIST *et al.*, 1996).

O WR-33278 também tem participação no mecanismo protetor da amifostina. Durante a formação deste segundo metabólito ocorre liberação de íons hidrogênio que auxiliam o reparo do DNA (VAN DER VIJGH, 1994; GRIGGS, 1998; CAPIZZI, 1996; FOSTER-NORA & SIDEN, 1997). Em outro estudo, altas concentrações de WR-33278 condensaram o DNA e limitaram potenciais alvos para ação de radicais livres (SAVOYE *et al.*, 1997). Essa atividade pode reduzir o número de “quebras” no DNA após radioterapia, reduzindo o bloqueio da divisão celular induzido pela radiação (RUBIN *et al.*, 1996). Um aumento na proliferação celular, resultado da diminuição do dano ao DNA promovido pela amifostina, pode ter importante papel na recuperação do endotélio e da mucosa irradiados (RUBIN *et al.*, 1996; KOUKOURAKIS *et al.*, 1999). Em adição, tem sido também postulado que a amifostina pode aumentar a expressão de uma variedade de proteínas envolvidas com o reparo do DNA e inibição da apoptose, tais como Bcl-2 e HIF-1 (CARMELIET *et al.*, 1998; KAJSTURA *et al.*, 1996; SHIMIZU *et al.*, 1996).

A amifostina possui uma propriedade única que a permite proteger células normais, mas não células tumorais, dos efeitos da radiação e quimioterapia (ALBERTS *et al.*, 1996; KEMP *et al.*, 1996; DUNN *et al.*, 1996; AVILÉS *et al.*, 1997). Essa seletividade se deve ao fato de que a concentração de fosfatase alcalina na membrana de células normais é 275 vezes maior que em células tumorais e, além disso, o reduzido aporte sanguíneo das células tumorais resulta em menor absorção de droga por estas células. Esses mecanismos levam a uma concentração 50-100 vezes maior de amifostina nas células normais em relação às células tumorais. Órgãos com elevada captação de amifostina incluem os rins, coração, pulmões e medula óssea. Já no sistema nervoso central, a amifostina atinge baixas concentrações devido à mínima passagem da droga pela barreira hematoencefálica (CAPIZZI, 1996; MCCAULEY, 1997; VALERIOTE & TOLEN, 1982; DORR, 1996; PAINE *et al.*, 1996).

O conhecimento das propriedades farmacocinéticas da amifostina é essencial para seu uso eficaz. Sua meia vida é bastante curta, menos de 1 minuto, e menos de 10% da droga permanece no plasma 6 minutos após sua administração intravenosa (SHAW *et al.*, 1986; FOSTER-NORA & SIDEN, 1997; SHAW *et al.*, 1988; KORST *et al.*, 1996). O rápido desaparecimento da amifostina no plasma pode ser devido a sua conversão em WR-1065 que é também rapidamente retirado do plasma pelas células (SHAW *et al.*, 1988; UTLEY *et al.*, 1984; SHAW *et al.*, 1996). O pico de concentração tecidual de WR-1065 ocorre 10-30

minutos após a injeção de amifostina (KORST *et al.*, 1996; UTLEY *et al.*, 1984). Buentzel *et al.*, (2006) realizaram um estudo no qual a amifostina foi administrada ≥ 30 minutos antes da quimio e radioterapia. Nesse estudo não houve diferença significativa na incidência de xerostomia ou mucosite oral entre os pacientes que receberam amifostina i.v. e àqueles que receberam placebo. Em contraste, estudos nos quais a amifostina foi administrada dentro dos 30 minutos que antecederam a radioterapia demonstraram promissores efeitos protetores contra a xerostomia e a mucosite oral (ANTONADOU *et al.*, 2002; BRIZEL *et al.*, 2000; VACHA *et al.*, 2003).

A amifostina é geralmente bem tolerada, contudo não isenta de efeitos adversos. Hipotensão, náuseas, vômitos, espirros, soluços, sonolência, gosto metálico durante a infusão, febre, rash cutâneo, reações anafiláticas e hipocalcemia são alguns dos seus efeitos colaterais (SCHUCHTER, 1996; BURESH *et al.*, 1998; BUKOWSKI, 1996; CAPIZZI, 1999). Os dois principais efeitos adversos do uso de amifostina que causam descontinuação do tratamento são: vômito e hipotensão. A hipotensão geralmente ocorre no final da infusão de amifostina e dura menos de 10 minutos (MCCAULEY, 1997; ALBERTS *et al.*, 1996). A hipotensão transitória acomete cerca de 60% dos pacientes tratados, sendo sintomática em 3 a 15% dos casos. Contudo, quadros severos de hipotensão são raros (MCCAULEY, 1997; ALBERTS *et al.*, 1996). Foi comprovado que pacientes desidratados, mesmo que minimamente, são mais susceptíveis a apresentar náuseas, vômitos e hipotensão. Recomenda-se, assim, hidratar e monitorar a pressão arterial de pacientes a cada 5 minutos durante o uso de amifostina, além de suspender o uso de qualquer medicação anti-hipertensiva (MCCAULEY, 1997; KEMP *et al.*, 1996; SCHUCHTER, 1996).

Durante os estudos clínicos com amifostina, foi observada a ocorrência de hipocalcemia, contudo raramente de forma significativa. No entanto, quando são requeridas múltiplas administrações de amifostina, a ocorrência deste efeito adverso se eleva. Sendo assim, é recomendado monitorar os níveis de cálcio em todos os pacientes que fazem uso de amifostina, principalmente aqueles que recebem múltiplas administrações em menos de 24 horas (SCHUCHTER, 1996). A hipocalcemia tem sido atribuída à inibição da secreção de hormônio da paratireóide (PTH) e aumento da calciúria induzidos pela amifostina (GLOVER *et al.*, 1983; WADLER *et al.*, 1993).

A incidência e a severidade dos efeitos adversos relacionados à amifostina parecem variar de acordo com a dose e a via de administração utilizada. Uma recente metanálise de estudos clínicos utilizando amifostina reportou um risco significativamente elevado para o desenvolvimento de hipotensão quando a amifostina foi administrada por via intravenosa (Sasse *et al.*, 2006). Estudos examinando a administração subcutânea de amifostina têm demonstrado uma incidência de hipotensão quase nula e uma redução na incidência de náuseas e vômitos quando comparado à administração intravenosa (ANNÉ & CURRAN, 2002; ANNÉ *et al.*, 2007). No entanto, a administração s.c. de amifostina tem sido associada a uma maior ocorrência de febre e reações cutâneas (KOUKOURAKIS *et al.*, 2000; ANNÉ *et al.*, 2007).

A administração tópica de amifostina tem sido alvo de alguns estudos no intuito de reduzir os efeitos adversos da administração sistêmica. O uso retal de amifostina, inicialmente não mostrou trazer proteção contra a radiação pélvica (MONTANA *et al.*, 1992). No entanto, estudos clínicos subseqüentes atestaram o efeito protetor da amifostina por esta via. Ben-Josef *et al.*, (2002) realizaram um estudo no qual pacientes com câncer de próstata receberam amifostina retal antes do tratamento radioterápico. Esse estudo avaliou quanto de amifostina foi absorvido no plasma e quanto foi excretado na urina. Segundo o estudo, não ocorreu absorção sistêmica da droga e a ausência de toxicidade foi atribuída a sua não absorção. Todos os pacientes completaram as sessões recomendadas sem relatos de toxicidade pela amifostina.

Muitos estudos clínicos têm sido realizados para investigar a eficácia da amifostina como agente citoprotetor contra vários agentes tóxicos em pacientes com neoplasias de diferentes origens e tipos (CAPIZZI & OSTER, 1995; SCHILLER *et al.*, 1996; WAGNER *et al.*, 1998). A maior experiência com amifostina, até então, está relacionada à proteção contra os derivados da platina. Esses compostos são primariamente excretados pelos rins, apresentando vários mecanismos de toxicidade. A insuficiência renal dose dependente e dose cumulativa é o maior fator limitante do uso da platina. A lesão renal é usualmente permanente, limitando outros tratamentos (VOGELZANG *et al.*, 1985). A amifostina demonstrou reduzir a incidência não só da nefrotoxicidade como também da neurotoxicidade e mielosupressão causada por compostos derivados da platina (WADLER *et al.*, 1996; GLOVER *et al.*, 1986). Após estudos pré-clínicos e clínicos indicarem que a amifostina diminuía a severidade e duração da mielosupressão induzida por ciclofosfamida (GLOVER *et*

al., 1986; GLOVER *et al.*, 1987), um estudo fase III foi conduzido a fim de determinar se há proteção medular da amifostina contra o uso clínico combinado de cisplatina e ciclofosfamida (KEMP *et al.*, 1996). Os pacientes que utilizaram amifostina apresentaram redução significativa na incidência de neutropenia, febre, infecções, dias de internação, dias de antibioticoterapia e de transfusões de plaquetas e hemácias, demonstrando que a amifostina possui também uma importante atividade mieloprotetora.

A amifostina também tem sido largamente estudada e utilizada como citoprotetor contra radiação. A xerostomia e a mucosite oral são complicações da radioterapia direcionada a cânceres de cabeça e pescoço. A permanente fibrose das glândulas salivares causa um aumento na incidência de cáries, infecções bucais e osteonecrose, além de produzir significativo desconforto, pois prejudica o ato de falar e deglutir dos pacientes acometidos. Resultados de numerosos estudos randomizados demonstraram que a amifostina protege contra a toxicidade da radiação em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e, atualmente, a prevenção da xerostomia induzida por radiação é uma das principais indicações deste medicamento (SASSE *et al.*, 2006). Alguns estudos têm procurado avaliar o efeito da amifostina contra a esofagite e pneumonite induzidas por radiação em pacientes com câncer de pulmão. Contudo, os resultados de um grande estudo multicêntrico até o presente momento não mostraram uma redução na esofagite com o tratamento com amifostina (MOVSAS *et al.*, 2005).

A ação da amifostina no trato gastrointestinal também tem sido motivo de numerosos estudos. A proctite e a mucosite intestinal são conseqüências comuns do tratamento radioterápico direcionado ao abdome e à pélvis. Estudos clínicos têm demonstrado que o pré-tratamento com amifostina antes da radioterapia ou quimioterapia pode reduzir a incidência e severidade da toxicidade gastrointestinal provocada por estas terapias (KOUKOURAKIS *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2006). Ademais, esses estudos demonstraram que várias vias de administração de amifostina (i.v., s.c., e retal) são efetivas na redução da toxicidade gastrointestinal induzida por radio e quimioterapia em pacientes com cânceres pélvicos. Kouloulis *et al.*, (2005), comparando a via s.c. e retal, mostraram que o uso retal de amifostina foi mais efetivo na redução da toxicidade retal induzida por radiação, enquanto a via s.c. foi mais efetiva em reduzir a toxicidade renal.

Mota *et al.*, (2007) utilizaram amifostina i.p. e s.c. em animais submetidos à lesão gástrica por indometacina. Seus resultados indicaram que a amifostina tem ação protetora no tecido gástrico e os autores concluíram que essa proteção ocorreu devido a uma redução do *stress* oxidativo, através da elevação nos níveis gástricos de grupos sulfidrílicos não-protéicos e diminuição da aderência leucocitária regional.

A amifostina é considerada um fármaco citoprotetor de largo espectro. Portanto, a pesquisa dos seus benefícios nos diversos órgãos e contra diferentes agentes agressores deve ser estimulada e realizada. Até o momento, existem poucos trabalhos na literatura avaliando o papel dos grupos sulfidrílicos não-protéicos e dos nervos sensoriais aferentes na lesão gástrica induzida por etanol e nenhum estudo avaliando o efeito da amifostina nesse processo. O melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na lesão e defesa da mucosa gástrica certamente pode contribuir para o desenvolvimento de profilaxia e tratamento direcionados contra lesão gástrica induzida pelo etanol.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

- Avaliar o efeito da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.

2.2. Específicos:

- Avaliar o efeito da amifostina, administrada por via oral (tópica) ou subcutânea, na lesão gástrica induzida por etanol absoluto em ratos, através de estudos macroscópicos, histológicos e dosagem de hemoglobina.
- Investigar o papel dos grupos sulfidrílicos não-protéicos nesse processo.
- Avaliar a participação de neurônios sensoriais aferentes no efeito gastroprotetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol.
- Estudar o papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP, da ciclooxigenase-2 e da NO sintase no efeito da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol, através de estudos macroscópicos, histológicos e dosagem de hemoglobina.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Os animais utilizados neste trabalho foram ratos Wistar, do sexo masculino, com peso variando entre 200 e 260 g. Os animais eram provenientes do biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e foram mantidos no biotério setorial do departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da mesma universidade. Os animais foram acondicionados em caixas de plástico medindo 49x34x16 cm (CxLxA), em temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, num ciclo de 12/12 h claro/escuro. Dezoito a vinte e quatro horas antes dos experimentos, os animais foram privados de alimentação, permanecendo sempre com acesso livre a água. Os protocolos dos experimentos estão de acordo com os padrões de uso de animais experimentais e foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

3.2. Aparelhos e instrumentos laboratoriais

- Alicate pra deslocamento cervical
- Balança Analítica Ohaus AS2600
- Balança Analítica Marte A1200
- 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 Cybershot W5
- 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
- Micrótomo Olympus
- Ponteiras para pipetas automáticas Sigma
- Seringas (B-D Plastipak)
- Sonicador
- Tubos de ensaio

3.3. Drogas utilizadas

- Etyol® (Amifostina) (Schering-Plough), diluído em solução salina
- Etanol Absoluto (VETEC)
- Capsaicina (Fluka), diluído em solução de etanol absoluto, polisorbato 80 (Tween® 80) e PBS (tampão fosfato-salino).
- Terbutalina (Sigma-Aldrich) diluído em solução salina
- Teofilina (Fluka) diluído em solução salina
- Éter etílico (Dinâmica - Reagentes Analíticos)
- Glibenclamida (Sigma- Aldrich), diluída em solução de NaOH 0,01 N com 4% de glicose
- N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) (Sigma- Aldrich), diluído em solução salina
- Celebra® (celecoxibe) (Pfizer), diluído em dimetil sulfóxido (DSMO)

3.4. Corantes

- Eosina (Merck)
- Hematoxilina (Reagen)

3.5. Soluções

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

- Formol 10%
 - Formalina ----- 40 ml
 - Água destilada ----- 360 ml

- Ácido tricloroacético (TCA) 100%

- Dimetil sulfóxido (DMSO) 100%

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

- Solução de NaOH 0,01 N
 - NaOH ----- 4 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 0,02 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

- Álcool 70%

Etanol absoluto ----- 700 ml
 Água destilada ----- 300 ml

3.6. Efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol em ratos

Os animais receberam tratamento com amifostina, v.o. ou s.c., em doses de 22,5, 45, 90 ou 180 mg/kg, ou salina. Após 30 minutos, os animais receberam por gavagem etanol absoluto na dose de 5 ml/kg. Nos estudos tempo-resposta, essa indução ocorreu 6 ou 24 horas após o tratamento com amifostina. Após 1 hora da administração de etanol, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, foi feita uma laparotomia permitindo a extração do estômago. Este então foi aberto através de sua grande curvatura e estirado sobre uma superfície plana com auxílio de alfinetes (KO & CHO, 1998). Imagens digitais foram captadas sempre com um referencial métrico para posterior análise macroscópica através do software ImageJ. Amostras do estômago foram coletadas e congeladas a -80° C para dosagem de glutathione e hemoglobina. Outro fragmento foi retirado e colocado em formol 10%, seguido por álcool 70%, para análise microscópica.

3.7. Papel dos neurônios aferentes no efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol em ratos

A fim de estudar o papel dos neurônios aferentes no efeito protetor da amifostina na lesão gástrica, doses neurotóxicas de capsaicina (25, 50 e 50 mg/kg) foram administradas por via subcutânea com intervalo de 12 horas entre as administrações, totalizando 125 mg/kg. A capsaicina foi dissolvida em uma solução de etanol absoluto, polisorbato 80 (Tween® 80) e PBS (tampão fosfato-salino) na proporção de 1:1:8. Antes da administração de capsaicina, os animais receberam terbutalina 0,2 mg/kg i.p., teofilina 20 mg/kg i.m. e leve sedação com éter

etílico. Após 10 a 14 dias, gotejamos uma solução de capsaicina 0,1 mg/mL no olho do animal. Isso confirmaria se os que receberam previamente a capsaicina foram realmente desensibilizados. O gotejar dessa solução de capsaicina no olho normalmente causa certa irritação levando o animal a coçar os olhos. Naqueles desensibilizados essa reação deve estar ausente.

Os animais controle, que não receberam capsaicina, receberam etanol absoluto por gavagem 30 minutos após o tratamento com salina, amifostina 90 mg/kg v.o. ou s.c. Aqueles que receberam previamente capsaicina foram tratados com amifostina 90 mg/kg v.o. ou s.c. 30 minutos antes da indução da lesão com etanol absoluto. O sacrifício foi realizado por deslocamento cervical 1 hora após a administração de etanol. Em seguida foi feita uma laparotomia para retirada dos estômagos. Estes foram abertos através de suas grandes curvaturas e estirados em uma superfície plana para captação de imagens digitais. Essas imagens serviram para o estudo macroscópico feito com o software ImageJ. Duas amostras da mucosa foram retiradas e congeladas a -80° C para análise de glutathione e hemoglobina. Outra amostra foi colocada em formol a 10% e posteriormente em álcool 70% para o estudo histológico.

3.8. Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP, do óxido nítrico e da ciclooxigenase-2 no efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol em ratos

Um estudo de modulação farmacológica foi feito utilizando glibenclamida (bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP), L-NAME (inibidor não específico da NOS - óxido nítrico sintase) e celecoxibe (inibidor seletivo da ciclooxigenase-2). 30 minutos antes da administração de amifostina, os animais receberam pré-tratamento com salina, glibenclamida 10 mg/kg v.o., L-NAME 10 mg/kg i.p. ou celecoxibe 10 mg/kg v.o. A amifostina foi administrada, na dose 90 mg/kg por v.o. ou s.c. Decorridos 30 minutos da administração de amifostina, a indução de lesão gástrica foi feita com etanol absoluto 5 ml/kg por gavagem. O sacrifício foi realizado por deslocamento cervical 1 hora após a administração de etanol. Em seguida, foi feita uma laparotomia permitindo a extração do estômago. Este então foi aberto através de sua grande curvatura e estirado sobre uma superfície plana com auxílio de alfinetes. Imagens digitais foram captadas sempre com um referencial métrico para posterior análise macroscópica através do software ImageJ. Amostras do estômago foram coletadas e congeladas a -80° C para dosagem de glutathione e

hemoglobina. Outro fragmento foi retirado e colocado em formol 10%, seguido por álcool 70%, para análise microscópica.

3.9. Avaliação histológica da mucosa dos animais

Amostras da mucosa de cada estômago foram retiradas e fixadas numa solução de formol a 10%, onde permaneceram por 24 horas. Após isto, as amostras foram transferidas para uma solução de álcool a 70%. Em seguida, o material biológico foi seccionado e embebido em parafina. Os corte de 5 micrômetros foram então corados com hematoxilina-eosina para estudo à microscopia óptica. O critério para avaliação histológica foi o de Laine & Weinstein (1988), que atribui escores aos parâmetros edema (0-4), hemorragia (0-4), perda de células epiteliais (0-3) e infiltrado inflamatório (0-3), totalizando um máximo de 14 escores. A análise histológica foi feita por um experiente histopatologista (GACB) através de estudo cego.

3.10. Análise dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica dos animais

O método de Sedlak, J. & Lindsay, R.H. (1968) foi utilizado para análise de glutathiona nas amostras. Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos uma amostra de 50 a 100 mg da mucosa gástrica dos animais foi homogeneizada em 1 ml de EDTA 0.02 M para cada 100 mg de tecido. Aliquotas de 400 µL do homogeneizado foram misturadas a 320 µL de água destilada e a 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4° C. A um total de 400 µL do sobrenadante foi adicionado 800 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 µL de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M. A mistura foi agitada por 3 minutos e a absorbância foi lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em µg de NP-SH/g de tecido.

3.11. Quantificação dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais

Para determinação da hemoglobina, cuja presença é indicadora de hemorragia, foi utilizado um teste colorimétrico para cianohematoglobina. Esse método baseia-se na oxidação do ferro II da molécula de hemoglobina pelo ferricianeto de potássio formando a metahemoglobina que por sua vez é convertida em cianohematoglobina após reação com

cianeto de potássio, proporcionando uma coloração avermelhada proporcional à concentração de hemoglobina 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 de cada animal 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 dosagem feita em leitora de ELISA com a absorvância de 540 nm. Os resultados foram expressos em μg de Hb/100 mg de tecido.

3.12. Análise estatística

Os dados estão expressos como média \pm EPM (variáveis com distribuição normal) ou como mediana \pm mínimo e máximo (variáveis sem distribuição normal). A análise estatística foi feita usando o teste de análise de variância ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls quando apropriado. Os escores histológicos foram avaliados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn. Significância estatística foi observada quando $p < 0,05$. O número de animais utilizados em cada grupo estudado (n) variou de 5 a 7. Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o software Prism versão 4 da GraphPad Software.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol: curva dose-resposta

Nas figuras 5, 6 e 7 podemos observar que os animais submetidos ao etanol absoluto apresentaram, após uma hora, extensas áreas ulceradas em suas mucosas gástricas, enquanto aqueles submetidos a apenas salina não apresentaram lesões. Também podemos observar que os animais que, 30 minutos antes da administração de etanol, receberam amifostina, tanto via oral (figura 6) como subcutânea (figura 5 e 7), tiveram lesões significativamente menores (doses de 45, 90 e 180 mg/kg v.o. e 90 e 180 mg/kg s.c.) quando comparados ao grupo etanol. Essa redução no índice de lesão gástrica se deu de forma dose-dependente.

4.1.1. Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina

Observar-se na tabela 1 que o uso da amifostina 90 e 180 mg/kg v.o. reduziu significativamente ($p < 0,05$) a hemorragia, o edema e a perda de células epiteliais causados pelo uso de etanol. Na tabela 2, observa-se que a amifostina 90 mg/kg s.c. reduziu de forma significativa a perda de células epiteliais e a hemorragia. Também observamos que amifostina 180 mg/kg s.c. reduziu o edema e a perda de células epiteliais induzidos pelo etanol. Não se observou diferença na infiltração de células inflamatórias em nenhum dos grupos experimentais.

As figuras 8 e 9 apresentam os valores referentes ao somatório dos parâmetros, hemorragia (0-4 escores), edema (0-3 escores), perda de células epiteliais (0-3 escores) e infiltrado inflamatório (0-4 escores), totalizando um máximo de 14 escores. Verifica-se na figura 8 que a amifostina v.o. nas doses de 45, 90 e 180 mg/kg diminui de forma significativa os efeitos do etanol na mucosa gástrica sobre a somatória dos parâmetros avaliados. Uma diminuição também significativa pode ser observada na figura 9 com o uso da amifostina s.c. nas doses de 90 e 180 mg/kg, quando comparado com os animais tratados com salina + etanol.

4.1.2. Análise dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina

A determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos na mucosa gástrica dos animais mostrou que a administração de etanol reduziu significativamente o nível gástrico de glutathiona quando comparado ao grupo controle salina. Na figura 10, podemos observar que a administração prévia de amifostina v.o. nas doses de 45, 90 e 180 mg/kg previne essa redução de forma significativa. Efeito semelhante pode ser observado na figura 11 com o uso da amifostina s.c. nas doses de 90 e 180 mg/kg.

4.1.3. Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina

A administração de etanol absoluto elevou de forma significativa os níveis de hemoglobina na mucosa gástrica dos animais, quando comparados ao grupo controle salina. A administração de amifostina v.o. (figura 12) nas doses 45, 90 e 180 mg/kg e amifostina s.c. (figura 13) nas doses 90 e 180 mg/kg reduziu significativamente essa lesão hemorrágica induzida por etanol, corroborando os achados da análise macroscópica.

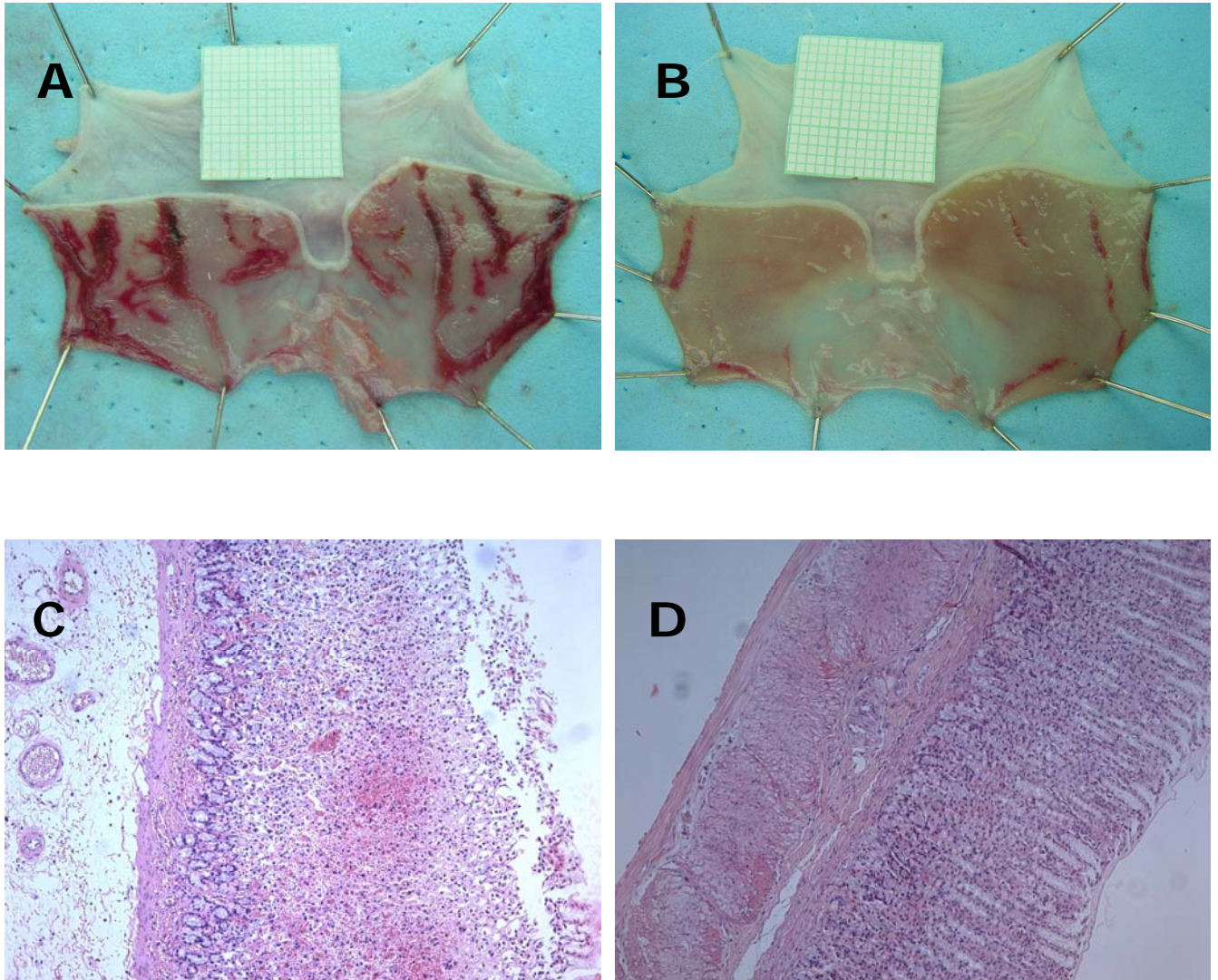


Figura 5: Efeito macroscópico e microscópico do uso de amifostina na lesão gástrica induzida por etanol. Fotos A e C: salina e etanol 5 ml/kg v.o. Fotos B e D: amifostina s.c. 90 mg/kg e etanol 5 ml/kg.

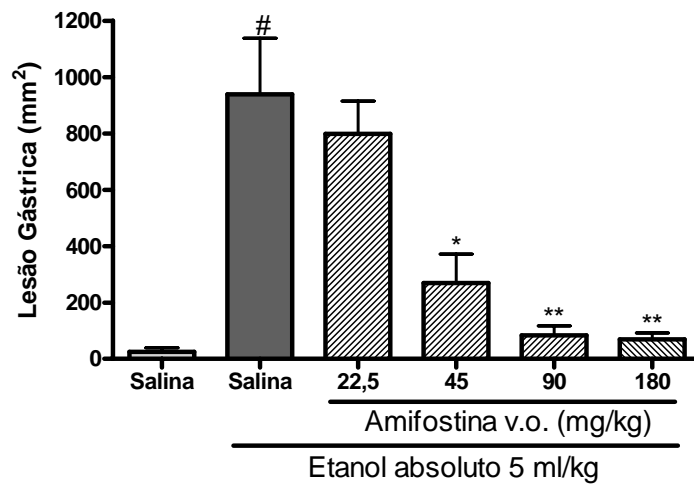


Figura 6: Efeito protetor da amifostina (v.o.) na lesão gástrica induzida por etanol. Os animais receberam salina ou amifostina v.o. nas doses de 22,5, 45, 90 e 180 mg/kg. 30 minutos após, os animais receberam, por gavagem, etanol absoluto na dose de 5 ml/kg. Após uma hora, o índice de lesão gástrica foi medido. A administração de amifostina v.o. nas doses 45, 90 e 180 mg/kg reduziu significativamente o índice de lesão gástrica induzida por etanol. Os resultados são expressos por média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,01$, quando comparado ao grupo salina + salina. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

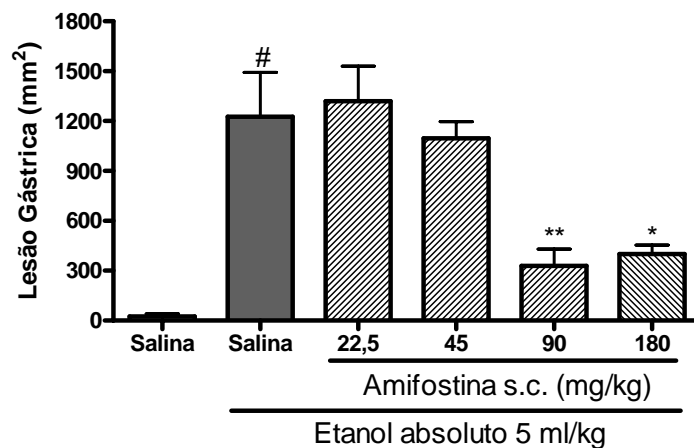


Figura 7: Efeito protetor da amifostina (s.c.) na lesão gástrica induzida por etanol. Os animais receberam salina ou amifostina s.c. nas doses de 22,5, 45, 90 e 180 mg/kg. 30 minutos após, os animais receberam, por gavagem, etanol absoluto na dose de 5 ml/kg. Após uma hora, o índice de lesão gástrica foi medido. A administração de amifostina s.c. nas doses 90 e 180 mg/kg reduziu significativamente o índice de lesão gástrica induzida por etanol. Os resultados são expressos por média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,01$, quando comparado ao grupo salina + salina. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Tabela 1: Avaliação microscópica: perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia em estômago de ratos tratados com amifostina v.o.

Tratamentos	Perda de células (3 escores)	Infiltrado inflamatório (3 escores)	Edema (4 escores)	Hemorragia (4 escores)
Salina	0	0	0	0
Salina + Etanol	3 (2-3)#	0	3 (3-4)#	3 (3-4)#
Amf 22,5 mg /kg + Etanol	2 (1-2)	0	3 (2-4)	2 (2-4)
Amf 45 mg /kg + Etanol	1 (1-3)	0	2 (1-2)	1 (1-3)
Amf 90 mg /kg + Etanol	1 (0-1)*	0	1 (0-2)*	1 (0-2)*
Amf 180 mg /kg + Etanol	1 (0-2)*	0	1 (0-2)*	1 (0-2)*

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente. n=5-7 (*) p<0,05 vs Salina + Etanol; (#) p<0,05 vs Salina. Teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 2: Avaliação microscópica: perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia em estômago de ratos tratados com amifostina s.c.

Tratamentos	Perda de células (3 escores)	Infiltrado inflamatório (3 escores)	Edema (4 escores)	Hemorragia (4 escores)
Salina	0 (0-1)	0	0	0
Salina + Etanol	2 (2-3)#	0	3 (2-4)#	4 (3-4)#
Amf 22,5 mg /kg + Etanol	2 (1-3)	0	2 (1-3)	3 (3-4)
Amf 45 mg /kg + Etanol	1 (0-1)	0	1 (1-3)	2 (0-2)
Amf 90 mg /kg + Etanol	0 (0-1)*	0	1 (0-1)	1 (0-1)*
Amf 180 mg /kg + Etanol	0 (0-1)*	0	0 (0-1)*	1 (0-2)

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente. n=5-7 (*) p<0,05 vs Salina + Etanol; (#) p<0,05 vs Salina. Teste de Kruskal-Wallis.

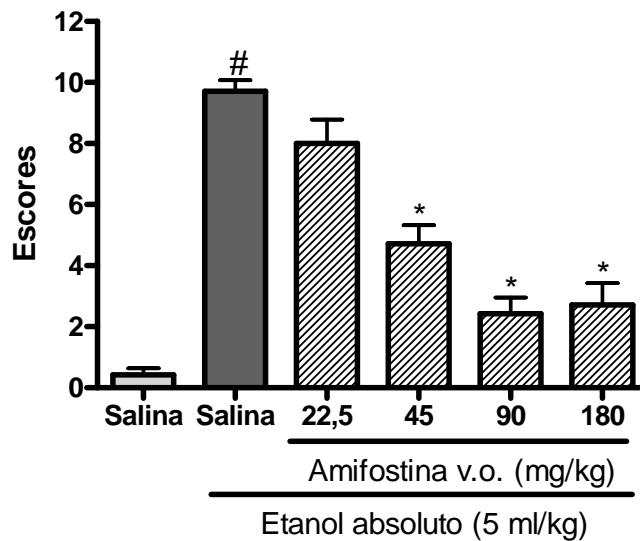


Figura 8: Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina v.o. Os animais receberam salina + salina, salina + etanol, amifostina v.o. (22,5, 45, 90 ou 180 mg/kg) + etanol. Amostras dos estômagos foram retiradas para análise microscópica, onde foram avaliados: perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia. A administração de amifostina nas doses de 45, 90 e 180 mg/kg reduziu o efeito lesivo do etanol de forma significativa. Os resultados estão expressos por média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,01$, quando comparado ao grupo salina + salina; (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. Kruskal-Wallis/Dunn.

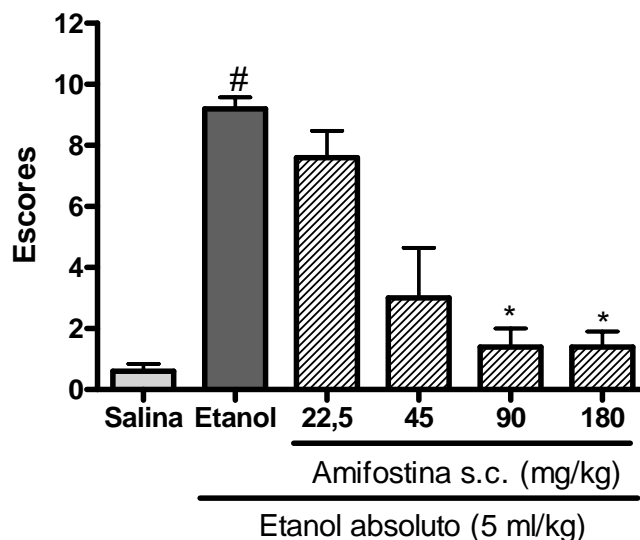


Figura 9: Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina s.c. Os animais receberam salina e salina, salina e etanol, amifostina s.c. (22,5, 45, 90 e 180 mg/kg) e etanol. Amostras dos estômagos foram retiradas para análise microscópica, onde foram avaliados: perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia. A administração de amifostina nas doses de 90 e 180 mg/kg reduziu o efeito lesivo do etanol de forma significativa. Os resultados estão expressos por média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,01$, quando comparado ao grupo salina + salina; (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. Kruskal-Wallis/Dunn.

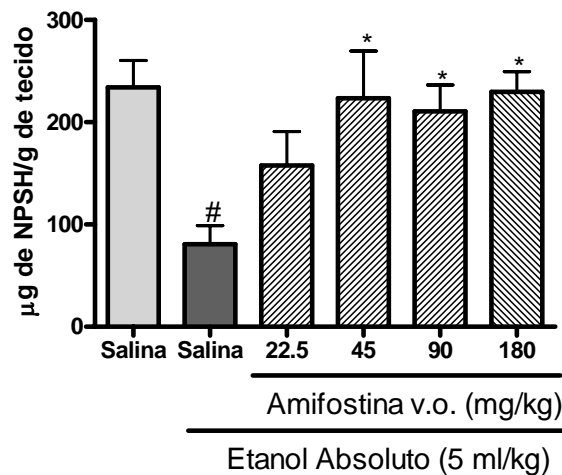


Figura 10: Análise dos níveis de glutatona (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina v.o. Os animais receberam amifostina v.o. nas doses 22,5, 45, 90 e 180 mg/kg ou salina. Após 30 minutos receberam, por gavagem, etanol 5 ml/kg ou salina. A administração de etanol absoluto diminuiu de forma significativa o nível de glutatona na mucosa gástrica quando comparado ao grupo controle salina. A administração da amifostina v.o. nas doses de 45, 90 e 180 mg/kg preveniu esse efeito. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle salina. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

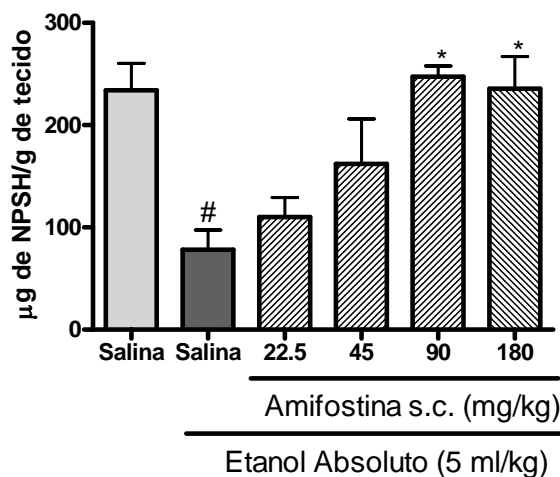


Figura 11: Análise dos níveis de glutatona (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina s.c. Os animais receberam amifostina s.c. nas doses 22,5, 45, 90 e 180 mg/kg ou salina. Após 30 minutos receberam, por gavagem, etanol 5 ml/kg ou salina. A administração de etanol absoluto diminuiu de forma significativa o nível de glutatona na mucosa gástrica quando comparado ao grupo controle salina. A administração da amifostina s.c. nas doses de 90 e 180 mg/kg preveniu esse efeito. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle salina. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

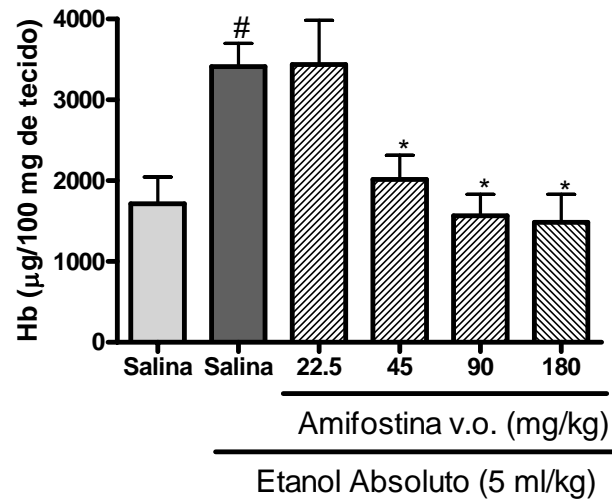


Figura 12: Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina v.o. Os animais receberam amifostina v.o. nas doses 22,5, 45, 90 e 180 mg/kg ou salina. Após 30 minutos receberam, por gavagem, etanol 5 ml/kg ou salina. O etanol elevou de forma significativa os níveis de hemoglobina na mucosa gástrica quando comparado ao grupo salina. A administração de amifostina v.o. nas doses 45, 90 e 180 mg/kg reverteu essa lesão hemorrágica de forma significativa. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle salina. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

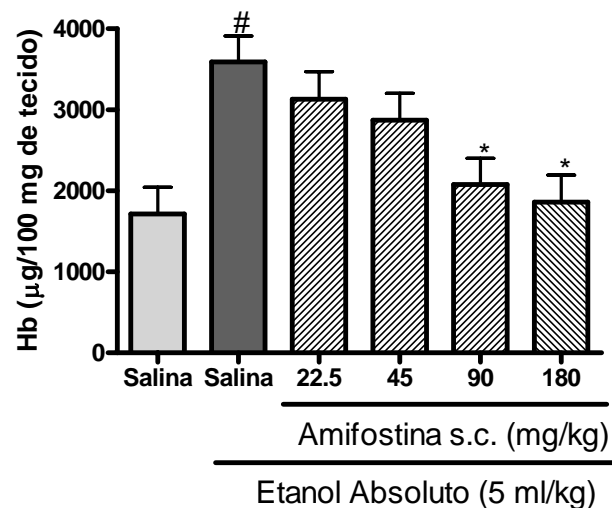


Figura 13: Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina s.c. Os animais receberam amifostina s.c. nas doses 22,5, 45, 90 e 180 mg/kg ou salina. Após 30 minutos receberam, por gavagem, etanol 5 ml/kg ou salina. O etanol elevou de forma significativa os níveis de hemoglobina na mucosa gástrica quando comparado ao grupo salina. A administração de amifostina s.c. nas doses 90 e 180 mg/kg reverteu essa lesão hemorrágica de forma significativa. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle salina. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

4.2. Efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol: estudo tempo-resposta

As figura 14 e 15 mostram a análise macroscópica de animais que receberam etanol absoluto 5 ml/kg e pré-tratamento com salina, amifostina v.o. (90 mg/kg) 6 ou 24 horas antes, amifostina s.c. (90 mg/kg) 6 ou 24 horas antes. O grupo que recebeu etanol e pré-tratamento com salina mostrou lesões hemorrágicas significativas quando comparado ao grupo salina. A administração de amifostina, tanto por via oral 6 ou 24 horas antes, como por via subcutânea 6 horas ou 24 horas antes, preveniu o dano hemorrágico induzido pelo etanol.

4.2.1. Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina

A tabela 3 mostra os valores dos escores histológicos dos grupos controles e dos grupos que foram pré-tratados com amifostina v.o. e s.c., 6 e 24 horas antes da administração de etanol absoluto. Houve redução significativa nos parâmetros perda de células epiteliais, edema e hemorragia. Não houve diferença entre os grupos quanto ao infiltrado inflamatório.

A figura 16 mostra o efeito do pré-tratamento com amifostina sobre o somatório dos parâmetros avaliados. Os grupos que receberam amifostina (v.o. ou s.c., 6 ou 24 horas antes) + etanol apresentaram somatórios significativamente menores quando comparados aqueles que receberam salina + etanol.

4.2.2. Análise dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina

A administração de etanol reduziu significativamente os níveis de glutathiona na mucosa gástrica dos ratos uma hora após sua administração por gavagem. Na figura 15, observamos que o pré-tratamento com amifostina 90 mg/kg, tanto v.o. quanto s.c., seja 6 ou 24 horas antes do etanol, elevou os níveis dos grupos sulfidrílicos de forma significativa comparado ao grupo etanol.

4.2.3. Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina

A quantidade de hemoglobina encontrada na mucosa dos animais que receberam salina + etanol foi significativamente maior comparada àqueles que receberam apenas salina. Na figura 16, observamos que a administração de amifostina 90 mg/kg, v.o. ou s.c., 6 ou 24 horas antes do etanol, foi capaz de reduzir de forma significativa a lesão hemorrágica induzida por esta substância.

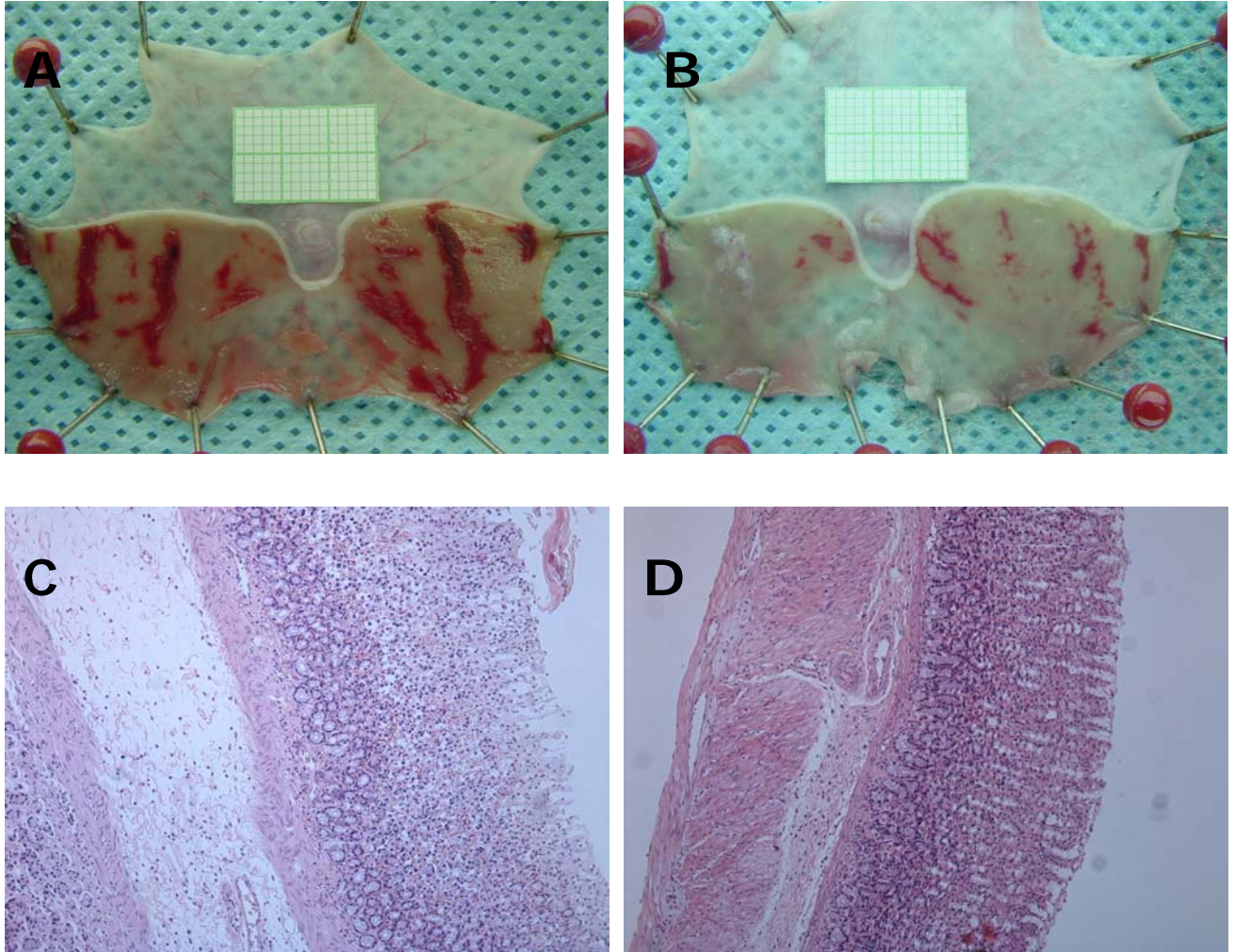


Figura 14: Efeito macroscópico e microscópico do uso de amifostina na lesão gástrica induzida por etanol. A amifostina 90 mg/kg, s.c. e v.o., 6 e 24 horas antes, reverteu o efeito lesivo do etanol. Fotos A e C: salina e etanol 5 ml/kg v.o. Fotos B e D: amifostina v.o. 90 mg/kg 24h antes e etanol 5 ml/kg v.o.

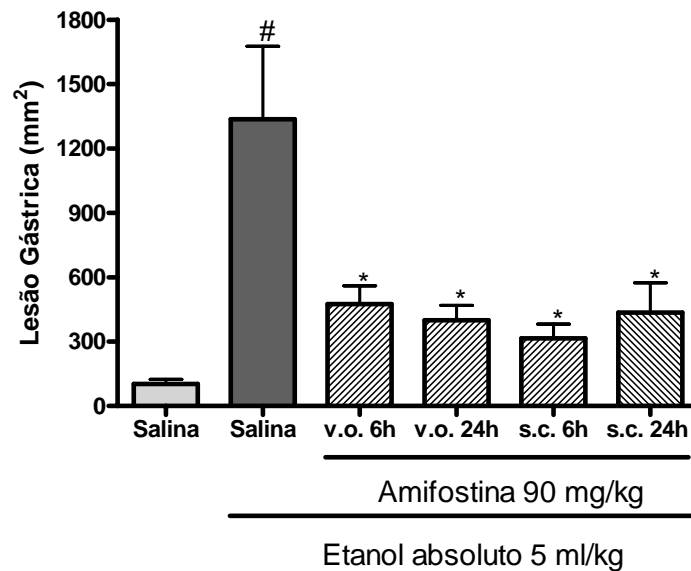


Figura 15: Efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol: estudo tempo-resposta. Os animais receberam etanol absoluto por gavagem e pré-tratamento com salina ou amifostina 90 mg/kg, v.o. ou s.c., 6 ou 24 horas antes. A administração de etanol causou lesões hemorrágicas significativas quando comparadas ao grupo salina. A administração de amifostina 90 mg/kg, v.o. e s.c., 6 e 24 horas antes, reduziu significativamente o efeito lesivo do etanol. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle salina. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Tabela 3: Avaliação microscópica: perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia em estômago de ratos tratados com amifostina 90mg/kg, v.o. e s.c., 6 e 24 horas.

Tratamentos	Perda de células (3 escores)	Infiltrado inflamatório (3 escores)	Edema (4 escores)	Hemorragia (4 escores)
Salina	0 (0-1)	0	0 (0-1)	0
Salina + Etanol	3 (2-3)#	0	3 (2-4)#	4 (3-4)#
Amf 90 mg /kg (v.o. 6h) + Etanol	0 (0-2)*	0	1 (0-1)*	0 (0-1)*
Amf 90 mg /kg (v.o. 24h) + Etanol	1 (0-1)*	0	0 (0-1)*	0 (0-1)*
Amf 90 mg /kg (s.c. 6h) + Etanol	0 (0-3)*	0	1 (0-2)*	0 (0-1)*
Amf 90 mg /kg (s.c. 24h) + Etanol	0 (0-1)*	0	1 (0-1)*	1 (0-1)*

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente. n=5-7 (*) p<0,05 vs Salina + Etanol; (#) p<0,05 vs Salina. Teste de Kruskal-Wallis.

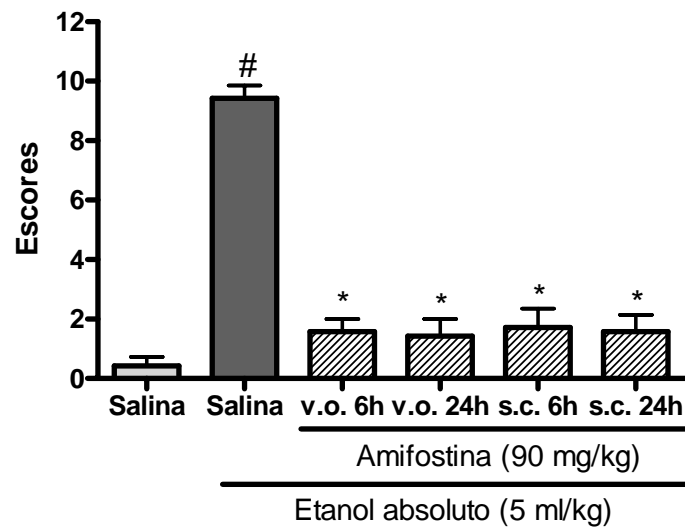


Figura 16: Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina, v.o. ou s.c., 6 ou 24 horas antes. Os animais receberam etanol absoluto por gavagem e pré-tratamento com salina ou amifostina 90 mg/kg, v.o. ou s.c., 6 ou 24 horas antes. Amostras dos estômagos foram retiradas para análise microscópica, onde foram avaliados: perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia. A administração de amifostina 90 mg/kg, v.o. e s.c., 6 e 24 horas antes, reduziu significativamente o efeito lesivo do etanol. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,01$, quando comparado ao grupo controle salina. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

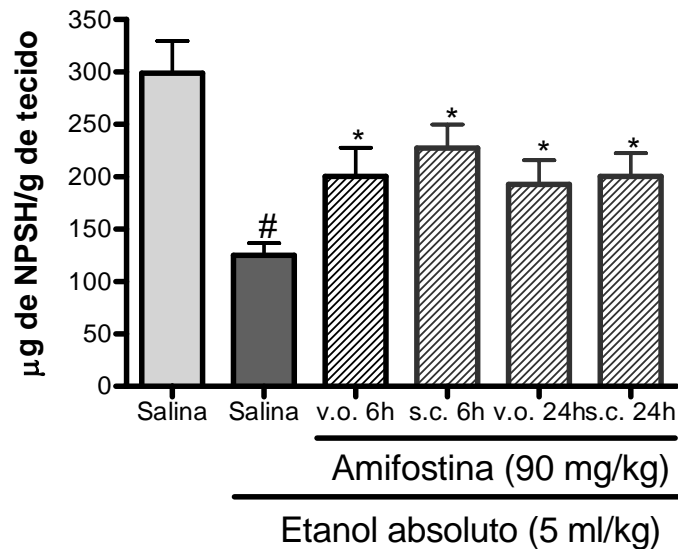


Figura 17: Análise dos níveis de Glutathiona (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina. Os animais receberam salina + salina, salina + etanol, amifostina 90 mg/kg, v.o. ou s.c., 6 ou 24 horas antes do etanol. A determinação dos grupos sulfidrílicos mostrou que os animais que receberam salina + etanol tiveram uma redução significativa no nível desses grupos quando comparado ao grupo salina + salina. Foi observado também que os animais pré-tratados com amifostina, v.o. e s.c., 6 e 24 horas, mostraram elevados níveis de grupos sulfidrílicos. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + salina. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

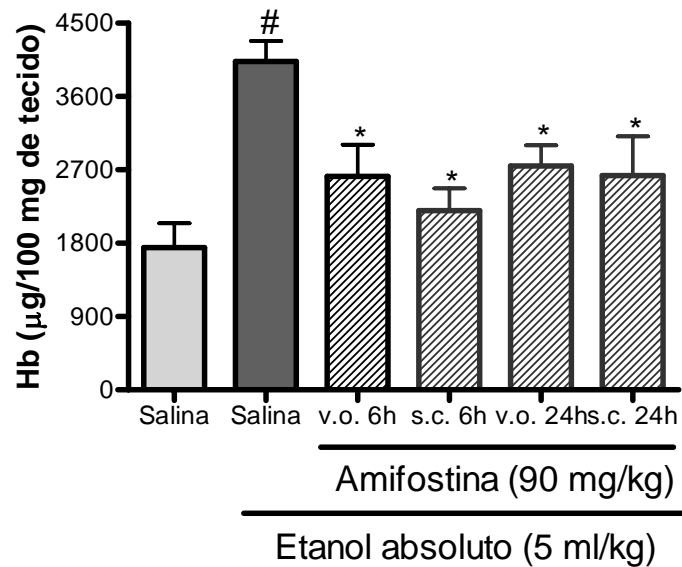


Figura 18: Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com salina ou amifostina. Os animais receberam salina + salina, salina + etanol, amifostina 90 mg/kg, v.o. ou s.c., 6 ou 24 horas antes do etanol. Os animais que receberam salina + etanol tiveram níveis significativamente maiores de hemoglobina na mucosa gástrica quando comparados ao grupo salina. A administração de amifostina 90 mg/kg, v.o. e s.c., 6 e 24 horas antes do etanol, preveniu esse efeito hemorrágico induzido pelo etanol. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + salina. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

4.3. Papel dos neurônios de via aferente no efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol em ratos

Para estudar a importância da via aferente neuronal no efeito gastroprotetor da amifostina, realizou-se o pré-tratamento com doses neurotóxicas de capsaicina, sendo observado que a ablação dos neurônios aferentes pela capsaicina reverteu de forma significativa a proteção da amifostina contra a lesão gástrica induzida pelo etanol (figura 20). Na figura 19, pode-se observar que o dano hemorrágico macroscópico causado por etanol é prevenido pelo uso da amifostina 90 mg/kg v.o. e s.c., mas essa proteção é revertida quando os animais são pré-tratados com capsaicina.

4.3.1. Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com capsaicina e/ou amifostina

Os valores de cada parâmetro, perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia estão expostos na tabela 4. A amifostina 90 mg/kg tanto v.o. como s.c. reduziu significativamente o edema, a perda de células epiteliais e a hemorragia induzidos pelo etanol. Na tabela 4, observamos que a depleção dos neurônios aferentes pela capsaicina 125 mg/kg s.c. reverteu essa proteção. Não houve diferença entre os grupos com relação ao infiltrado inflamatório.

Na figura 21, que corresponde ao somatório dos escores histológicos da análise microscópica, observa-se que a depleção dos neurônios aferentes pela capsaicina reverteu de forma significativa o efeito protetor da amifostina na mucosa gástrica de ratos submetidos ao etanol.

4.3.2. Análise dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com capsaicina e/ou amifostina

A figura 22 demonstra que o efeito protetor da amifostina, elevando os níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos na mucosa gástrica, é revertido pelo pré-tratamento com capsaicina, sugerindo que neurônios de via aferente podem ter alguma influência sobre esse efeito.

4.3.3. Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com capsaicina e/ou amifostina

A figura 23 demonstra que o uso de doses neurotóxicas de capsaicina nos ratos reverteu a proteção gástrica promovida pela amifostina contra hemorragia induzida pelo etanol. Os níveis de hemoglobina na mucosa gástrica dos animais tratados com capsaicina, previamente ao uso de amifostina e etanol, foram significativamente maiores quando comparados aos animais que receberam salina + amifostina + etanol.

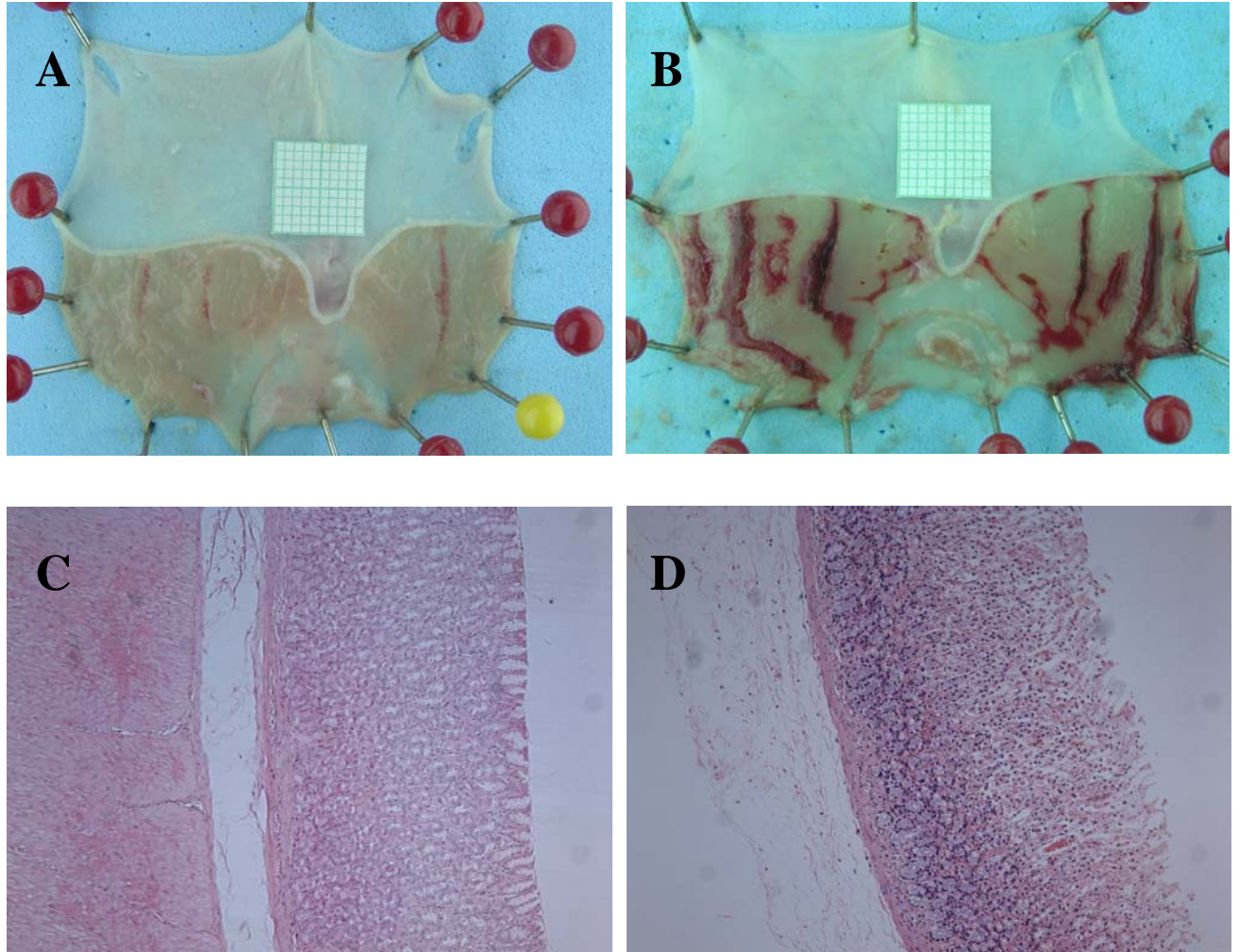


Figura 19: Efeito da depleção de neurônios aferentes pela capsaicina sobre o efeito gastroprotetor da amifostina na lesão gástrica induzida pelo etanol. A depleção de neurônios aferentes pela administração de doses neurotóxicas de capsaicina reverteu a proteção gástrica da amifostina contra o efeito lesivo do etanol. Fotos A e C: salina s.c. + amifostina v.o. (90 mg/kg) + etanol v.o. (5 ml/kg). Fotos B e D: capsaicina s.c. (125 mg/kg) + amifostina v.o. (90 mg/kg) + etanol v.o. (5 ml/kg).

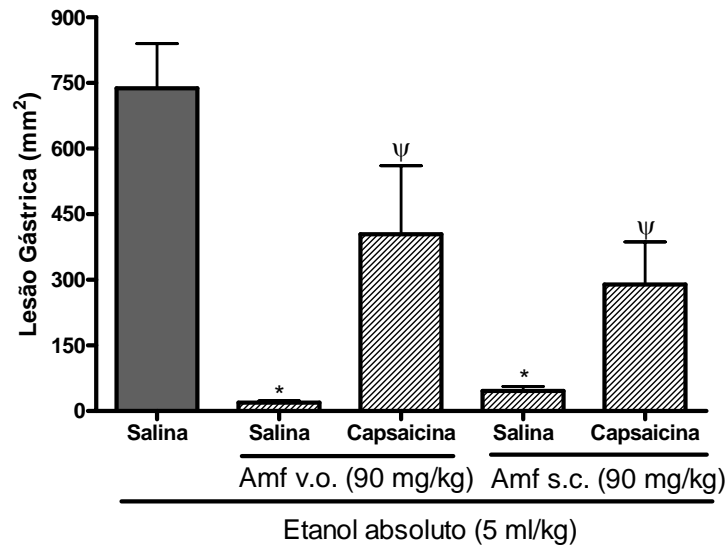


Figura 20: Efeito da depleção de neurônios aferentes pela capsaicina sobre o efeito gastroprotetor da amifostina na lesão gástrica induzida pelo etanol. Os animais foram tratados com capsaicina 125 mg/kg s.c. ou salina. Após 10 dias, receberam amifostina (Amf) 90 mg/kg v.o. ou s.c. e 30 minutos após receberam etanol 5 ml/kg v.o. A administração de amifostina 90 mg/kg v.o. e s.c. reverteu de forma significativa as lesões ulceradas induzidas por etanol. A administração prévia de capsaicina reverteu esse efeito protetor da amifostina. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. (ψ) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + amifostina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Tabela 4: Avaliação microscópica do efeito da depleção de neurônios aferentes pela capsaicina no efeito gastroprotetor da amifostina na lesão gástrica por etanol.

Tratamentos	Perda de células (3 escores)	Infiltrado inflamatório (3 escores)	Edema (4 escores)	Hemorragia (4 escores)
Salina + Etanol	2,5 (2-3)	0	3 (2-4)	3 (2-4)
Salina + Amifostina 90mg/kg (v.o.) + Etanol	1 (0-1)*	0	0 (0-1)*	0*
Capsaicina + Amifostina 90mg/kg (v.o.) + Etanol	2 (2-3) ψ	0	3 (2-3) ψ	3 (3-4) ψ
Salina + Amifostina 90mg/kg (s.c.) + Etanol	2	0	0*	0*
Capsaicina + Amifostina 90mg/kg (s.c.) + Etanol	2,5 (2-3)	0	2 (1-3) ψ	3,5 (3-4) ψ

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente. n=5-7 (*) $p < 0,05$ vs Salina + Etanol. (ψ) $p < 0,05$ vs Salina + Amifostina + Etanol. Teste de Kruskal-Wallis.

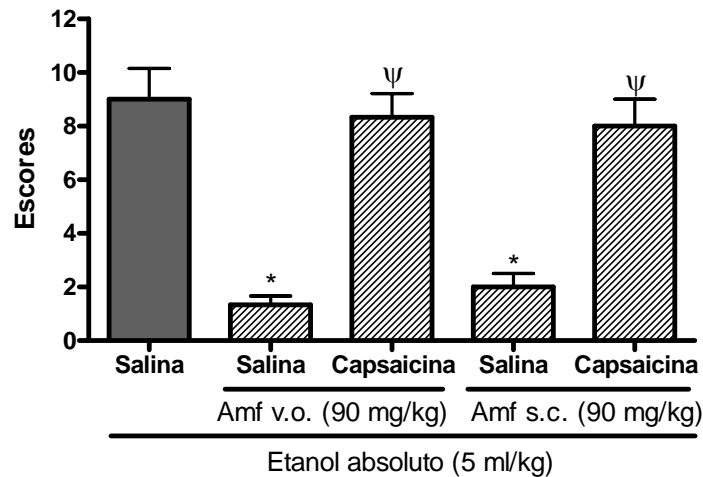


Figura 21: Avaliação histológica do efeito da depleção de neurônios aferentes pela capsaicina sobre o efeito gastroprotetor da amifostina na lesão gástrica por etanol. Os animais foram tratados com capsaicina 125 mg/kg s.c. ou salina. Após 10 dias, receberam amifostina (Amf) 90 mg/kg, v.o. ou s.c., e 30 minutos após receberam etanol 5 ml/kg v.o. Uma amostra do estômago foi retirada para análise microscópica, onde foram avaliados: perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia. A atividade histológica foi determinada por escores numa escala de 0 a 14. Sob análise histológica, a administração de doses neurotóxicas de capsaicina reverteu a proteção gástrica da amifostina contra a lesão induzida pelo etanol. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM ($n=5-7$). (*) $p<0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. (ψ) $p<0,05$, quando comparado ao grupo salina + amifostina + etanol. Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

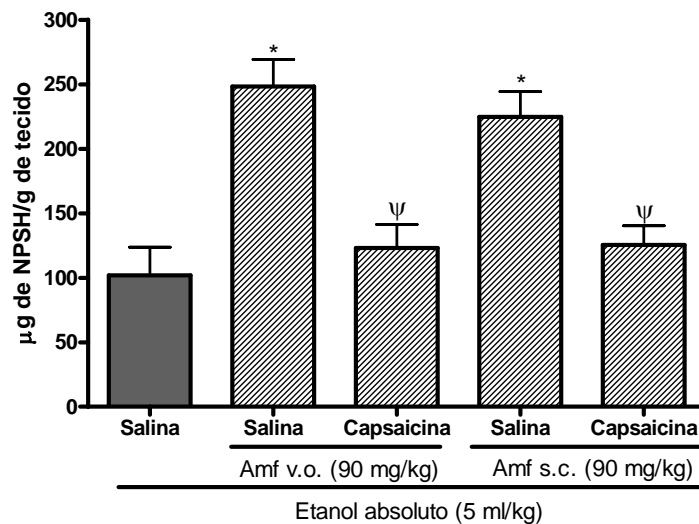


Figura 22: Análise dos níveis de Glutationa (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com doses neurotóxicas de capsaicina e amifostina. Os animais foram tratados com capsaicina 125 mg/kg s.c. ou salina. Após 10 dias, receberam amifostina (Amf) 90 mg/kg, v.o. ou s.c., e 30 minutos após receberam etanol 5 ml/kg v.o. O grupo que recebeu salina e etanol apresentou um nível bastante reduzido de grupos sulfidrílicos. Grupos que receberam pré-tratamento com amifostina tiveram níveis de GSH significativamente maiores aos do grupo etanol. Foi observado também que administração de doses neurotóxicas de capsaicina reverteu esse efeito protetor da amifostina sobre os níveis de glutaciona na mucosa gástrica. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM ($n=5-7$). (*) $p<0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. (ψ) $p<0,05$, quando comparado ao grupo salina + amifostina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

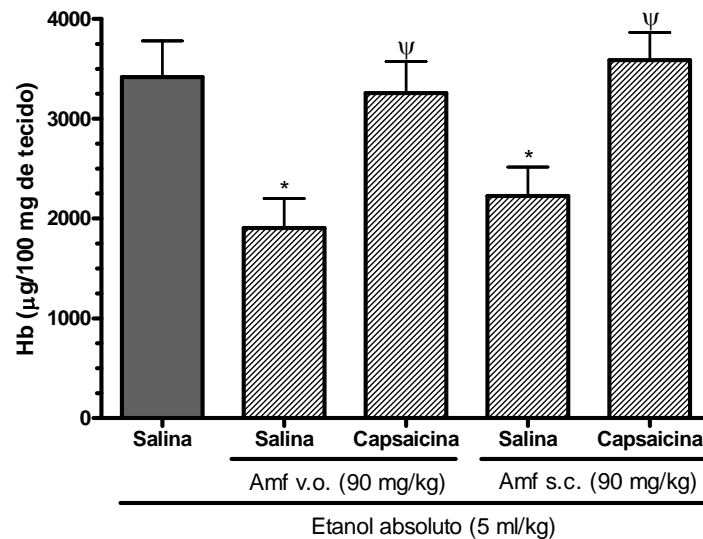


Figura 23: Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com doses neurotóxicas de capsaicina e amifostina. Os animais foram tratados com capsaicina 125 mg/kg s.c. ou salina. Após 10 dias, receberam amifostina (amf) 90 mg/kg, v.o. ou s.c., e 30 minutos após receberam etanol 5 ml/kg v.o. Os níveis de hemoglobina na mucosa gástrica dos animais tratados com doses neurotóxicas de capsaicina estavam significativamente elevados quando comparados ao dos animais que não receberam capsaicina. A administração de capsaicina em doses neurotóxicas reverteu a proteção gástrica da amifostina contra hemorragia induzida por etanol. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. (ψ) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + amifostina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

4.4. Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP, do óxido nítrico e da ciclooxigenase-2 no efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol em ratos

Para estudar um possível efeito dos canais de potássio sensíveis ao ATP, do óxido nítrico e da ciclooxigenase-2 na proteção gástrica conferida pela amifostina, foram administrados, respectivamente, glibenclamida 10 mg/kg v.o., L-NAME 10 mg/kg i.p. e celecoxibe 10 mg/kg v.o.

O grupo que recebeu salina + etanol apresentou lesões macroscópicas hemorrágicas consideráveis. Os animais que receberam amifostina 90 mg/kg, v.o. ou s.c. + etanol apresentaram lesões significativamente menores que os do grupo etanol. O pré-tratamento desses animais com glibenclamida, L-NAME ou celecoxibe não alterou, de forma significativa, o efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida pelo etanol (figuras 24, 25 e 26).

4.4.1. Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina – modulação farmacológica com glibenclamida, L-NAME e celecoxibe

Nas tabelas 5 e 6, observa-se que a amifostina 90 mg/kg, v.o. ou s.c., diminuiu significativamente a hemorragia, o edema e a perda de células epiteliais induzidos pelo etanol. Observa-se que o grupo pré-tratado com L-NAME apresentou números significativamente menores quando comparado ao grupo etanol nos parâmetros edema, hemorragia e perda de células epiteliais (tabela 5) e edema e hemorragia (tabela 6). No parâmetro hemorragia, o grupo pré-tratado com glibenclamida foi também estatisticamente diferente do grupo etanol (tabelas 5 e 6). Não houve diferença entre os grupos quanto ao infiltrado inflamatório.

As figuras 27 e 28 mostram os somatórios dos parâmetros avaliados. Todos os grupos que receberam amifostina 90 mg/kg, v.o. ou s.c., foram estatisticamente diferentes do grupo etanol.

4.4.2. Análise dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina – modulação farmacológica com glibenclamida, L-NAME e celecoxibe

As figuras 25 e 26 mostram os valores obtidos a partir da determinação dos níveis de glutathiona na mucosa gástrica dos animais uma hora após a administração de etanol. O tratamento com amifostina 90 mg/kg, v.o. e s.c., elevou os níveis de grupos sulfidrílicos de forma significativa quando comparado ao grupo salina + etanol. Esse efeito não foi alterado, de forma significativa, pelo pré-tratamento com glibenclamida 10 mg/kg v.o., celecoxibe 10 mg/kg v.o. ou L-NAME 10 mg/kg i.p.

4.3.3. Quantificação dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina – modulação farmacológica com glibenclamida, L-NAME e celecoxibe

A determinação dos níveis de hemoglobina na mucosa gástrica dos animais, exposta nas figuras 27 e 28, revelou que o uso da amifostina 90 mg/kg, v.o. ou s.c., protegeu contra o dano hemorrágico induzido pelo etanol absoluto na mucosa gástrica de ratos. Essa proteção não foi revertida pelo pré-tratamento com glibenclamida (um bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP), L-NAME (um inibidor não específico da óxido nítrico sintase) ou celecoxibe (inibidor seletivo de ciclooxigenase-2).

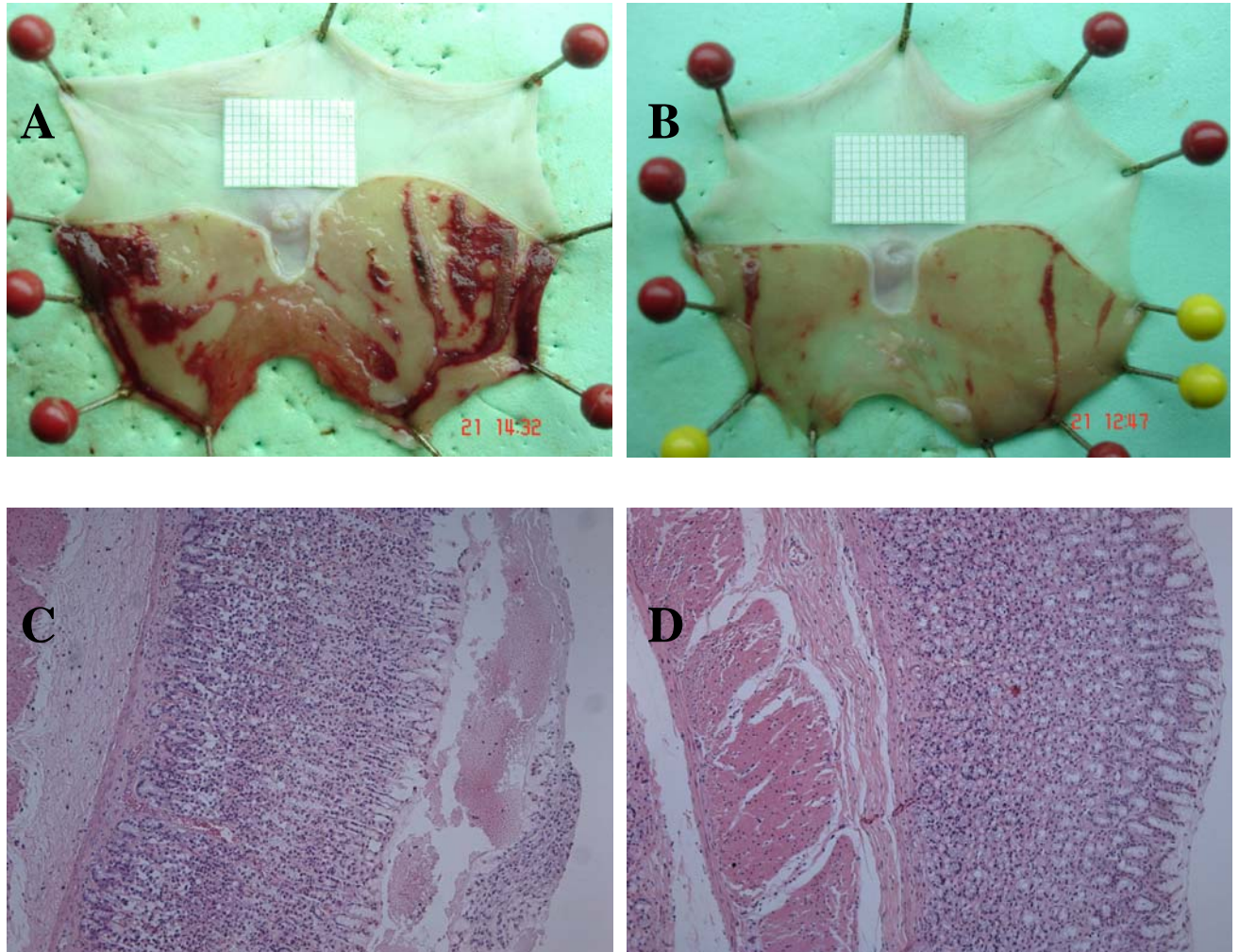


Figura 24: Efeito macroscópico e microscópico do uso de glibenclamida, celecoxibe e L-NAME na proteção promovida pela amifostina contra a lesão gástrica induzida por etanol. A glibenclamida (10 mg/kg v.o.), o celecoxibe (10 mg/kg v.o.) e o L-NAME (10 mg/kg i.p.) não influenciaram significativamente o efeito protetor da amifostina 90 mg/kg v.o. ou s.c. na lesão gástrica induzida por etanol 5 ml/kg v.o. Fotos A e C: salina + etanol; Fotos B e D: L-NAME + amifostina + etanol.

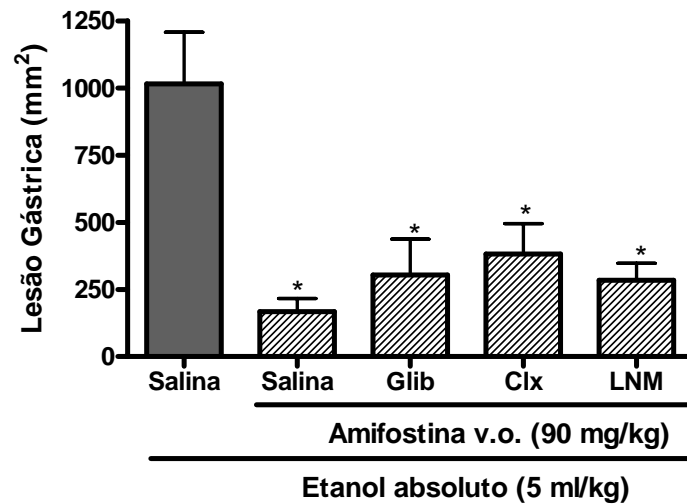


Figura 25: Avaliação macroscópica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg v.o. – Modulação farmacológica. Os animais receberam L-NAME (LNM) 10 mg/kg i.p., glibenclamida (Glib) 10 mg/kg v.o. ou celecoxibe (Clx) 10 mg/kg v.o. Trinta minutos após, amifostina 90 mg/kg v.o. foi administrada. A lesão gástrica foi induzida pelo etanol absoluto 5 ml/kg trinta minutos após. A amifostina reduziu de forma significativa as lesões gástricas produzidas pelo etanol. Esse efeito não foi alterado de forma significativa pelo pré-tratamento com glibenclamida, celecoxibe ou L-NAME. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

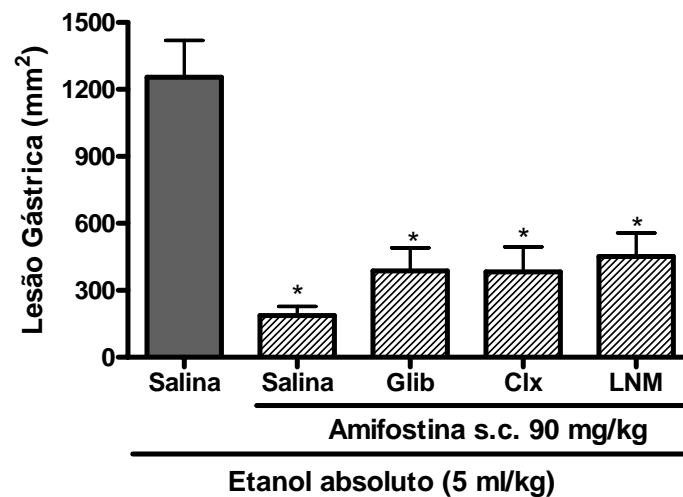


Figura 26: Avaliação macroscópica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg s.c. – Modulação farmacológica. Os animais receberam L-NAME (LNM) 10 mg/kg i.p., glibenclamida (Glib) 10 mg/kg v.o. ou celecoxibe (Clx) 10 mg/kg v.o. Trinta minutos após, amifostina 90 mg/kg s.c. foi administrada. A lesão gástrica foi induzida pelo etanol absoluto 5 ml/kg trinta minutos após. A amifostina reduziu de forma significativa as lesões gástricas produzidas pelo etanol. Esse efeito não foi alterado de forma significativa pelo pré-tratamento com glibenclamida, celecoxibe ou L-NAME. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Tabela 5: Avaliação microscópica: perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia em estômago de ratos tratados com amifostina v.o. – Modulação farmacológica

Tratamentos	Perda de células (3 escores)	Infiltrado inflamatório (3 escores)	Edema (4 escores)	Hemorragia (4 escores)
Salina + Etanol	3 (2-3)	0	3 (3-4)	4
Salina + Amf + Etanol	0,5 (0-1)*	0	1 (0-1)*	0 (0-1)*
Glib + Amf + Etanol	1,5 (1-2)	0	1 (1-2)	0,5 (0-1)*
Clx + Amf + Etanol	1 (0-3)	0	1,5 (1-2)	1,5 (1-3)
LNM + Amf + Etanol	0*	0	1 (0-3)*	1 (0-3)*

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente. n=5-7 (*) p<0,05 vs Salina + Etanol. Teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 6: Avaliação microscópica: perda de células epiteliais, infiltrado inflamatório, edema e hemorragia em estômago de ratos tratados com amifostina s.c. – Modulação farmacológica

Tratamentos	Perda de células (3 escores)	Infiltrado inflamatório (3 escores)	Edema (4 escores)	Hemorragia (4 escores)
Salina + Etanol	2 (2-3)	0	4 (3-4)	3 (3-4)
Salina + Amf + Etanol	0,5 (0-1)*	0	1 (0-2)*	0 (0-1)*
Glib + Amf + Etanol	1,5 (0-2)	0	1 (1-3)	0,5 (0-2)*
Clx + Amf + Etanol	1 (0-2)	0	2 (0-3)	1 (0-3)
LNM + Amf + Etanol	1 (0-2)	0	0,5 (0-2)*	1 (0-1)*

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente. n=5-7 (*) p<0,05 vs Salina + Etanol. Teste de Kruskal-Wallis.

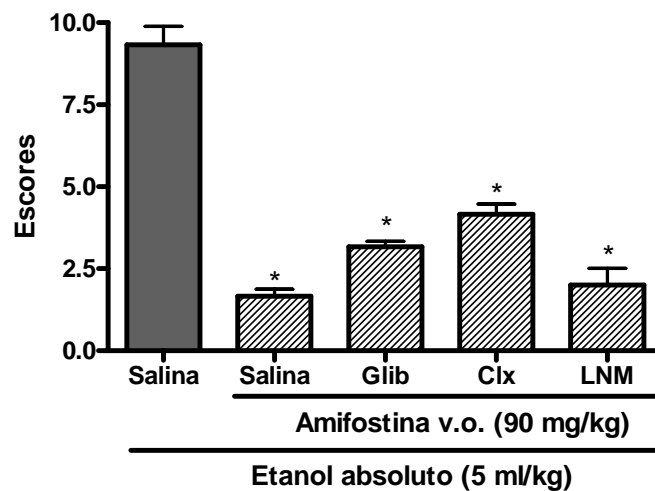


Figura 27: Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg v.o. – Modulação farmacológica. Os animais receberam L-NAME (LNM) 10 mg/kg i.p., glibenclamida (Glib) 10 mg/kg v.o. ou celecoxibe (Clx) 10 mg/kg v.o. Trinta minutos após, amifostina 90 mg/kg v.o. foi administrada. A lesão gástrica foi induzida pelo etanol absoluto 5 ml/kg trinta minutos após. A amifostina protegeu a mucosa gástrica contra o dano provocado pelo etanol e essa proteção não foi revertida pelo uso de glibenclamida, celecoxibe ou L-NAME. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

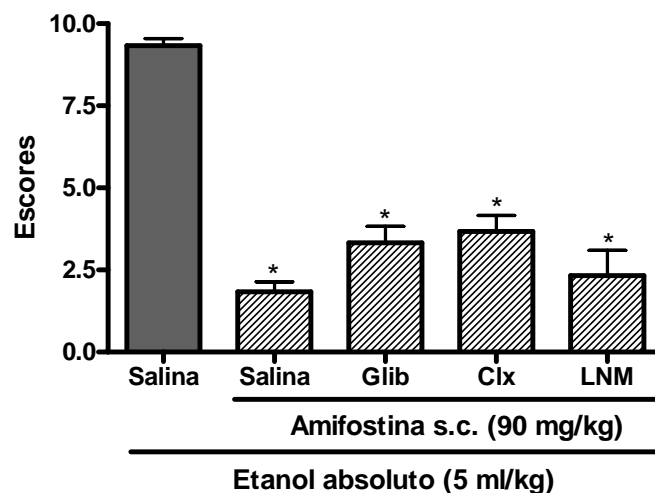


Figura 28: Avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg s.c. – Modulação farmacológica. Os animais receberam L-NAME (LNM) 10 mg/kg i.p., glibenclamida (Glib) 10 mg/kg v.o. ou celecoxibe (Clx) 10 mg/kg v.o. Trinta minutos após, amifostina 90 mg/kg s.c. foi administrada. A lesão gástrica foi induzida pelo etanol absoluto 5 ml/kg trinta minutos após. A amifostina protegeu a mucosa gástrica contra o dano provocado pelo etanol e essa proteção não foi revertida pelo uso de glibenclamida, celecoxibe ou L-NAME. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

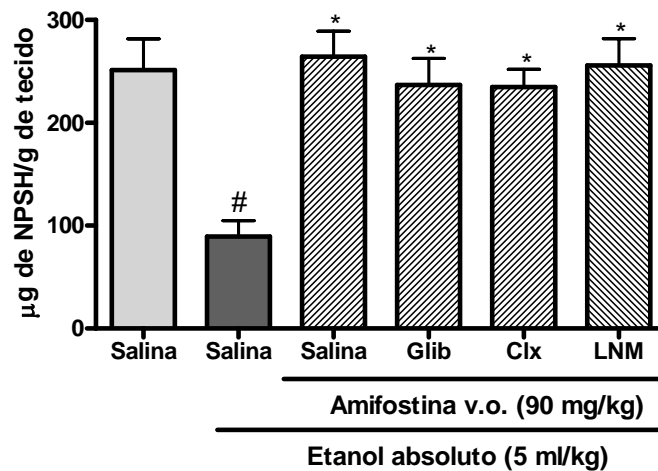


Figura 29: Análise dos níveis de glutatona (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg v.o. – Modulação farmacológica.

Os animais receberam L-NAME (LNM) 10 mg/kg i.p., glibenclamida (Glib) 10 mg/kg v.o. ou celecoxibe (Clx) 10 mg/kg v.o. Trinta minutos após, amifostina 90 mg/kg v.o. foi administrada. A lesão gástrica foi induzida pelo etanol absoluto 5 ml/kg trinta minutos após. A amifostina preveniu, de forma significativa, a redução nos níveis de grupos sulfidrílicos induzida pelo etanol. Esse efeito protetor não foi revertido pelo pré-tratamento com glibenclamida, celecoxibe ou L-NAME. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + salina. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

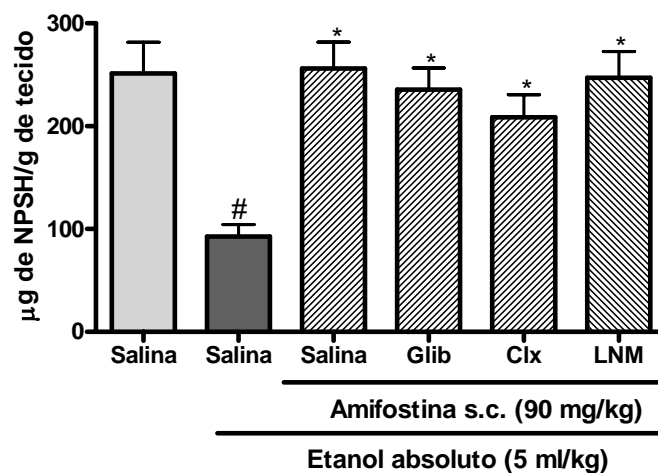


Figura 30: Análise dos níveis de glutatona (GSH) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg s.c. – Modulação farmacológica.

Os animais receberam L-NAME (LNM) 10 mg/kg i.p., glibenclamida (Glib) 10 mg/kg v.o. ou celecoxibe (Clx) 10 mg/kg v.o. Trinta minutos após, amifostina 90 mg/kg s.c. foi administrada. A lesão gástrica foi induzida pelo etanol absoluto 5 ml/kg trinta minutos após. A amifostina preveniu, de forma significativa, a redução nos níveis de grupos sulfidrílicos induzida pelo etanol. Esse efeito protetor não foi revertido pelo pré-tratamento com glibenclamida, celecoxibe ou L-NAME. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + salina. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

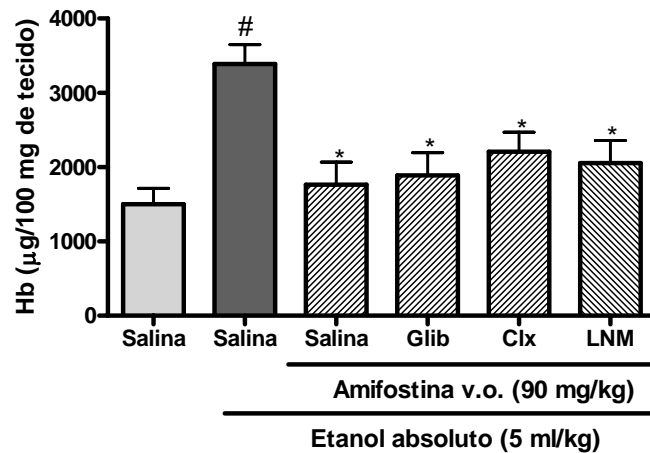


Figura 31: Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg v.o. – Modulação farmacológica. Os animais receberam L-NAME (LNM) 10 mg/kg i.p., glibenclamida (Glib) 10 mg/kg v.o. ou celecoxibe (Clx) 10 mg/kg v.o. Trinta minutos após, amifostina 90 mg/kg v.o. foi administrada. A lesão gástrica foi induzida pelo etanol absoluto 5 ml/kg trinta minutos após. A hemorragia provocada pelo etanol foi prevenida pelo uso de amifostina 90 mg/kg v.o. O pré-tratamento com glibenclamida, celecoxibe ou L-NAME não alterou esse efeito protetor da amifostina. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + salina. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

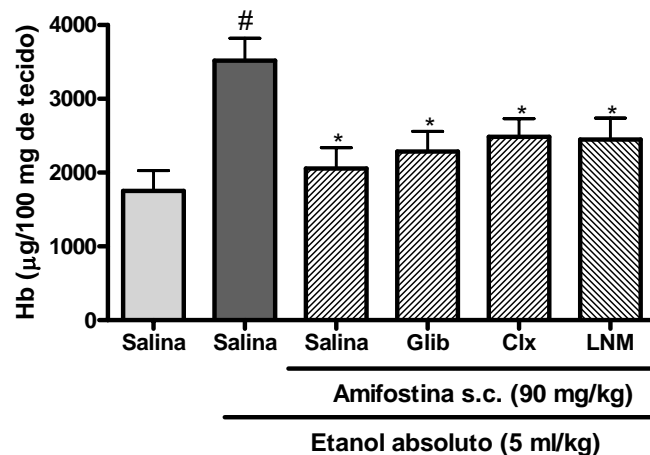


Figura 32: Análise dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais submetidos ao etanol tratados com amifostina 90 mg/kg s.c. – Modulação farmacológica. Os animais receberam L-NAME (LNM) 10 mg/kg i.p., glibenclamida (Glib) 10 mg/kg v.o. ou celecoxibe (Clx) 10 mg/kg v.o. Trinta minutos após, amifostina 90 mg/kg s.c. foi administrada. A lesão gástrica foi induzida pelo etanol absoluto 5 ml/kg trinta minutos após. A hemorragia provocada pelo etanol foi prevenida pelo uso de amifostina 90 mg/kg s.c. O pré-tratamento com glibenclamida, celecoxibe ou L-NAME não alterou esse efeito protetor da amifostina. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=5-7). (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + salina. (*) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo salina + etanol. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A gastrite aguda é um termo abrangente que cobre um largo espectro de entidades que induzem alterações inflamatórias na mucosa gástrica. Nos Estados Unidos, ela é responsável por aproximadamente 2 milhões de visitas ao consultório médico a cada ano (WEHBI *et al.*, 2006). A gastrite aguda possui um número de causas, incluindo o uso de fármacos antiinflamatórios não-esteroidais, etanol, isquemia, infecções bacterianas (*Helicobacter pylori*), virais (citomegalovírus) e fúngicas (histoplasma), *stress* agudo (choque), radiação e refluxo biliar (substância alcalina) (FAUCI *et al.*, 2008). O mecanismo comum de injúria é o desequilíbrio entre fatores agressivos (como ácido clorídrico, pepsina, proteases e radicais livres) e protetores (como óxido nítrico, prostaglandinas, muco, grupos sulfidrílicos não-protéicos, bicarbonato e fluxo sanguíneo) que mantêm a integridade da mucosa gástrica (GLAVIN & SZABO, 1992).

O modelo de lesão gástrica induzida por etanol já é bastante conhecido na literatura. A lesão induzida pelo etanol se deve a diversos mecanismos. Samonina *et al.* (2004) descreveram que o etanol induz distúrbios na microcirculação, liberação de endotelina, degranulação de mastócitos, inibição de prostaglandinas e diminuição da produção de muco. Oates e Hakkinen (1988) mostraram que o contato com o etanol provoca solubilização e conseqüente inativação do muco protetor, aumento da secreção ácida e alteração da rede vascular local, por rompimento dos vasos sanguíneos que irrigam a mucosa gástrica. Fisiopatologicamente, a lesão gástrica por etanol é mediada ou modulada por diversos fatores tais como a ciclooxigenase, lipoxigenase, citocinas, tromboxanos e radicais livres derivados do oxigênio (SAIKA *et al.*, 2000; TARNAWSKI *et al.*, 1998). Ainda no estômago, o etanol causa depleção dos grupos sulfidrílicos não-protéicos, necessários para a estabilização das membranas celulares e para a eliminação de espécies reativas de oxigênios (SZABO *et al.*, 1981).

Indiscutivelmente, uma terapia eficaz para a gastropatia alcoólica poderia ser padronizada investigando os mecanismos subjacentes que contribuem para a lesão da mucosa gástrica (LEE *et al.*, 2005). Compreender os mecanismos preferencialmente envolvidos na gastropatia alcoólica poderia ser um alvo final para a prevenção e tratamento desta patologia. Tendo em vista a importância da busca de fármacos que atuem na proteção gástrica contra o etanol, nosso trabalho objetivou estudar o efeito da amifostina, droga detentora de grupos

sulfidrila com atividade antioxidante, em modelo experimental clássico de lesão gástrica induzida por etanol em ratos.

A administração de etanol absoluto neste trabalho induziu uma considerável lesão gástrica hemorrágica. Lacy (1988) mostrou que a administração de etanol em altas concentrações causou graves lesões na mucosa gástrica, envolvendo extensas hemorragias e destruição tecidual. Nosso estudo histológico mostrou que o etanol causou hemorragia, edema e destruição epitelial. Estes achados estão de acordo com outros trabalhos que mostraram a atividade lesiva do etanol na mucosa gástrica através de ação direta provocando hemorragia subepitelial e indireta induzindo apoptose, redução do fluxo sanguíneo gástrico e produção de radicais livres (SZABO *et al.*, 1985; LEE *et al.*, 2005). A ingestão excessiva de etanol pode resultar em gastrite, caracterizada por edema de mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (GUSLANDI, 1987). Lieber (1997) mostrou que a administração de etanol induziu uma resposta inflamatória com a infiltração de leucócitos na mucosa gástrica. Neste estudo, porém, não foi observada infiltração de células inflamatórias, provavelmente devido ao curto espaço de tempo para o desenvolvimento da lesão (1 hora).

A amifostina é uma droga citoprotetora utilizada como agente adjuvante no tratamento de cânceres, combatendo efeitos adversos pós-radioterapia e pós-quimioterapia (LINKS & LEWIS, 1999). Nossos resultados demonstraram que a amifostina tem efeito protetor, dose dependente, na lesão gástrica induzida por etanol. Essa gastroproteção foi observada macroscopicamente, através de medidas da área lesionada na mucosa gástrica, e microscopicamente, pela observação histológica da redução do edema, hemorragia e destruição epitelial provocados pelo etanol. Dosagens de hemoglobina em fragmentos de estômago confirmaram a proteção contra hemorragia quando a amifostina foi utilizada previamente ao etanol. Utilizando um modelo de lesão gástrica induzida por indometacina, Mota *et al.* (2007) mostraram que a amifostina possui papel gastroprotetor e atribuíram essa proteção à diminuição da aderência leucocitária a capilares do TGI e ao aumento de grupos sulfidrílicos não-protéicos na mucosa gástrica.

Estudos têm demonstrado que as lesões induzidas pelo etanol são provocadas pelo dano direto às células da mucosa gástrica e pela produção de espécies reativas de oxigênio, conhecidas como radicais livres. Compostos antioxidantes podem desempenhar papel importante na lesão induzida por etanol ao neutralizar os radicais livres tóxicos e, dessa

forma, produzir efeito gastroprotetor (MATSUDA *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2004). A glutathiona (GSH), tripeptídeo linear composto por ácido glutâmico, glicina e cisteína, é um antioxidante hidrossolúvel reconhecido como o mais importante componente endógeno do pool dos NP-SH em nosso organismo (PARK *et al.*, 2000; GONZALES *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004). O GSH encontra-se onipresente nas células e atua como inativador de radicais livres, bem como substrato da glutathiona peroxidase, metabolizando H₂O₂ e outros hidroperóxidos no citosol e nas mitocôndrias (REED & FARISS, 1984). Miller *et al.* (1985) e Mizui *et al.* (1987) mostraram que o GSH está presente em altas concentrações no estômago, quando comparado com outros órgãos, sugerindo seu papel gastroprotetor como um composto antioxidante endógeno. O etanol depleta os níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos contidos no tecido gástrico, e a restauração destes grupos parece ser importante na gastroproteção (TRIER *et al.*, 1987; SZABO *et al.*, 1981).

Neste trabalho, avaliou-se a participação dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) no efeito gastroprotetor da amifostina no modelo de lesão gástrica aguda induzida por etanol. Observou-se que o etanol promoveu considerável depleção dos grupos sulfidrílicos não-protéicos na mucosa gástrica, provavelmente pela formação de radicais livres e consumo do GSH, o que está de acordo com a literatura. A administração de amifostina antes do estímulo lesivo com etanol foi efetiva em manter níveis elevados de NP-SH no estômago. Esses resultados sugerem que a gastroproteção da amifostina se deve, pelo menos em parte, às suas propriedades antioxidantes. A amifostina possui grupos sulfidrílica em sua estrutura química e promove citoproteção pela inativação de radicais livres e pelo reparo do DNA através de doação de átomo de hidrogênio (POLLA *et al.*, 1990). Assim, o efeito protetor da amifostina neste trabalho pode ter ocorrido devido a um menor consumo de GSH conseqüente à inativação de radicais livres, ou por um aumento na síntese *de novo* de GSH. Trabalhos na literatura corroboram esta hipótese. Szabo *et al.* (1981) e Trier *et al.* (1987) demonstraram que compostos sulfidrílicos, como o dimercaprol e a cisteamina, possuem atividade citoprotetora no tecido gástrico. Foi demonstrado que o GSH inibe o dano gástrico induzido por etanol, através da inativação de espécies reativas de oxigênio e produtos de peroxidação lipídica (SZABO *et al.*, 1992). Mota *et al.* (2007) concluíram que o aumento nos grupos sulfidrílicos não-protéicos é um dos responsáveis pelo efeito protetor da amifostina na gastropatia induzida por indometacina. Assim, sugerimos que um dos mecanismos responsáveis pela ação gastroprotetora da amifostina na lesão induzida por etanol seja a manutenção de níveis elevados de glutathiona na mucosa gástrica.

O FDA (*Food and Drug Administration*), órgão regulamentador de fármacos e substâncias utilizadas nos Estados Unidos, aprovou o uso de amifostina como citoprotetor para efeitos adversos causados por radio e quimioterapia, após estudos randomizados terem confirmado sua eficácia e custo benefício (KEMP *et al.*, 1996; BRIZEL *et al.*, 2000). Atualmente, a única via de administração aprovada para uso na prática médica é a intravenosa (i.v.). Os benefícios significantes obtidos com a administração i.v. de amifostina, contudo, são acompanhados por efeitos indesejáveis como hipotensão clínica reversível, náuseas, vômitos, eritema multiforme e síndrome de Stevens-Johnson, além de outras reações cutâneas em considerável número de pacientes (SCHUCHTER, 1996). Esses efeitos adversos, apesar de raramente graves, produzem muito desconforto aos pacientes, e a sua redução permitiria um maior aproveitamento dos benefícios do uso clínico de amifostina. A amifostina tem sido testada em pacientes com diversos tipos de tumores através de diferentes meios de administração (FRANCE *et al.*, 1986; DELANEY *et al.*, 1994; HALBERG *et al.*, 1991). Um estudo cohort foi realizado administrando amifostina subcutânea (s.c.) em um grupo de pacientes sob tratamento quimioterápico (KOUKOURAKIS *et al.*, 2003). Segundo resultados deste trabalho, a incidência de hipotensão foi praticamente nula com a administração s.c., enquanto náuseas e vômitos ocorreram de forma bastante reduzida quando comparados à administração i.v.

Nossos resultados mostraram que a administração de amifostina por via subcutânea (s.c.) tem efeito gastroprotetor na lesão induzida pelo etanol. A eficácia da ação da amifostina administrada por via s.c. tem sido alvo de alguns estudos na literatura. Foi demonstrado que a administração subcutânea de amifostina produziu níveis teciduais semelhantes à via intravenosa (BACHY *et al.*, 2004; CASSATT *et al.*, 2003; BONNER & SHAW 2002). A amifostina s.c. protegeu a mucosa oral contra as agressões da radioterapia de forma equivalente a sua administração i.v. (CASSATT *et al.*, 2003).

A redução da ocorrência de hipotensão, náuseas e vômitos pelo uso de amifostina s.c. é, por certo, um fato importante no aumento da tolerabilidade desta droga entre os pacientes. Contudo, apesar de bem tolerada, a administração de amifostina s.c. ainda causou náuseas, vômitos e reações de febre e rash cutâneo (KOULOULIAS *et al.*, 2005; BARDET *et al.*, 2002). Koukourakis *et al.* (2003) evidenciaram um aumento na incidência de rash febril

com o uso desta via. Esse aumento na incidência de reações cutâneas após uso de amifostina subcutânea foi também observado no estudo de Anne e Curran (2002).

Para estudar uma possível atuação tópica, foi administrado, por gavagem (v.o.), amifostina em animais submetidos à lesão gástrica por etanol. Nossos resultados mostraram que o efeito gastroprotetor da amifostina v.o. foi semelhante ao efeito da administração sistêmica (s.c.). A amifostina possui absorção praticamente nula no trato gastrointestinal. Simone *et al.* (2008) estudaram a incidência de efeitos adversos com o uso retal de amifostina em pacientes submetidos à radiação devido a câncer de próstata. Segundo seus resultados, a amifostina foi bem tolerada e nenhum dos pacientes reportou efeitos locais ou sistêmicos, exceto 1 paciente que relatou gosto metálico após a administração da droga. Estudos farmacocinéticos foram realizados em pacientes que receberam amifostina retal, e metabólitos ativos ou inativos da droga não foram encontrados na circulação sistêmica (BEN-JOSEF *et al.*, 2002). Isso pode ser uma propriedade interessante, pois o efeito benéfico da amifostina poderia ser alcançado localmente sem a necessidade de uma absorção sistêmica, evitando assim efeitos adversos.

A amifostina possui meia-vida curta, menos de 10% da droga permanece no plasma após 6 minutos de infusão intravenosa. Os protocolos que regem seu uso, até o presente momento, recomendam que sua administração seja feita 30 minutos antes da quimio ou radioterapia (SHAW *et al.*, 1996). Os trabalhos na literatura têm utilizado, até então, esse intervalo de tempo entre a administração da amifostina e o fator agressor, e têm obtido bons resultados. Mota *et al.* (2007) administraram amifostina por via s.c. e i.p. 30 minutos antes da indução de lesão gástrica com indometacina em ratos. Koukourakis *et al.* (2003) administraram diferentes regimes quimioterápicos em humanos, sempre 20 minutos após administração de amifostina s.c. Simone *et al.* (2008) administraram amifostina em humanos, por via retal, 30 a 45 minutos antes do tratamento radioterápico para câncer de próstata.

Em nossos experimentos, a amifostina foi administrada 30 minutos antes da indução de lesão gástrica por etanol. Porém, para estudarmos também um possível efeito duradouro de gastroproteção, administramos amifostina, por via oral e subcutânea, 6 ou 24 horas antes da indução da lesão com etanol. Nossos resultados mostraram que há um efeito duradouro de proteção, pois a lesão macroscópica, histológica e a dosagem de hemoglobina estavam reduzidos nos animais que receberam amifostina 6 ou 24 horas antes do etanol. Esses

animais também apresentaram elevados níveis de GSH nos fragmentos gástricos quando comparados àqueles que receberam pré-tratamento com salina. Isso nos permite inferir que a amifostina poderia ativar de forma duradoura alguma via de defesa da mucosa gástrica, uma vez que a proteção persiste mesmo após sua excreção.

A integridade da mucosa gástrica é mantida por múltiplos mecanismos protetores incluindo fatores humorais e neuronais (FLEMSTRÖM *et al.*, 1982). Neurônios aferentes sensíveis a capsaicina desempenham papel importante nos mecanismos protetores do estômago (HOLZER, 1998). A capsaicina age sobre neurônios sensoriais estimulando receptores de membrana, em especial receptores vanilóides (TRPV1), e promove a liberação de neuropeptídeos, como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (MERCHANT *et al.*, 1994; GUNTHORPE *et al.*, 2002). Esses receptores vanilóides (TRPV1) são expressos por muitos neurônios aferentes que inervam o trato gastrointestinal de humanos e roedores (HOLZER, 2004; CHRISTIANSON *et al.*, 2006; FAUSSONE-PELLEGRINI *et al.*, 2005; HORIE *et al.*, 2005). Park *et al.* (2000) e Holzer (1998) demonstraram que a administração oral de baixas doses de capsaicina exerceu proteção contra lesões gástricas induzidas por etanol através da estimulação de nervos sensoriais aferentes no estômago. No entanto, quando utilizada em doses elevadas, a capsaicina é neurotóxica e destrói terminações neuronais de fibras C, resultando em inativação de nervos sensoriais e perda dos reflexos nos quais estes nervos estão envolvidos (SZOLCSÁNYI & BARTHÓ, 2001; EVANGELISTA, 2006).

Para avaliarmos uma possível participação de neurônios aferentes no mecanismo de gastroproteção da amifostina, utilizamos doses neurotóxicas de capsaicina em animais antes do tratamento com amifostina e indução da lesão com etanol. A administração de doses neurotóxicas de capsaicina reduziu a gastroproteção conferida pela amifostina na lesão induzida por etanol. Essa reversão foi observada no estudo macroscópico, histológico e bioquímico, pela dosagem de hemoglobina e GSH em amostras de estômago. Esses resultados evidenciam uma possível participação das fibras sensoriais no mecanismo de proteção gástrica da amifostina. É importante notar que alguns agentes gastroprotetores já foram relacionados ao estímulo desses neurônios sensoriais. Os antagonistas dos receptores H₂ de histamina são capazes de estimular neurônios sensoriais e isto parece contribuir para suas ações gastroprotetoras (FUKUSHIMA *et al.*, 2006; HARADA & OKAJIMA, 2007).

Uma das substâncias de grande importância na homeostase gástrica são as prostaglandinas. Esses compostos são sintetizados a partir do ácido araquidônico por ação de enzimas conhecidas como ciclooxigenases. No estômago, as prostaglandinas exercem papel gastroprotetor e anti-secretório (ROBERT *et al.*, 1979). Entre os mecanismos envolvidos nesta gastroproteção estão: o aumento da secreção de muco e bicarbonato (WILSON *et al.*, 1986), o aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (COLTON *et al.*, 1978), a modulação da secreção gástrica e a inibição da liberação de mediadores inflamatórios por mastócitos (BATISTA *et al.*, 2004). Até pouco tempo atrás, a produção de prostaglandinas no tecido gástrico era creditada apenas a atividade da ciclooxigenase-1 (COX-1) (HALTER *et al.*, 2001). No entanto, estudos recentes têm demonstrado um papel relevante da COX-2 na defesa da mucosa gastrointestinal. Brzozowski *et al.* (1999) e Maricic *et al.* (1999) demonstraram que inibidores seletivos da COX-2 pioraram a lesão gástrica por isquemia e reperfusão. Tegeder *et al.* (2000) mostraram a contribuição da COX-2 na síntese de prostaglandinas no estômago de ratos.

A relação entre prostaglandinas e lesão gástrica induzida por etanol também tem sido objeto de estudo na literatura. Hollander *et al.* (1984) demonstraram que a lesão gástrica induzida por etanol é inibida pela liberação de prostaglandinas endógenas na superfície da mucosa gástrica. Glavin *et al.* (1996) mostraram que a prostaglandina E2 (PGE2) possui uma ação protetora contra a lesão gástrica provocada pelo etanol. No entanto, em nosso trabalho, o uso de um inibidor seletivo para COX-2, o celecoxibe, não alterou de forma significativa o efeito protetor da amifostina, sugerindo que o mecanismo de proteção da amifostina independe da atividade da ciclooxigenase-2.

Recentemente, tem sido demonstrado que a ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) está envolvida na defesa da mucosa gástrica. Mecanismos importantes na fisiologia gástrica têm sido relacionados aos canais K_{ATP} como a regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido gástrico e contratilidade da musculatura gástrica (PESKAR *et al.*, 2002). Akar *et al.* (1999) demonstraram que o diazóxido, um ativador dos canais de potássio sensíveis ao ATP, reduziu a lesão gástrica e infiltração de neutrófilos induzidos por indometacina, além de promover relaxamento de artérias gástricas pré-contraídas por noradrenalina. O uso de glibenclamida, um inibidor de canais K_{ATP} , reverteu esses achados. Gomes *et al.* (2006) demonstraram que os canais K_{ATP} têm papel na gastroproteção do LPS contra a lesão induzida por indometacina. Rahgozar *et al.* (2001)

mostraram que a ativação dos K_{ATP} pelo diazóxido inibiu lesões gástricas provocadas por etanol, enquanto a glibenclamida aumentou essas lesões. A ativação de canais K_{ATP} também foi relacionada à proteção gástrica do sildenafil contra a lesão induzida por etanol (MEDEIROS *et al.*, 2008).

Na tentativa de determinar o papel da ativação desses canais na gastroproteção da amifostina, utilizamos a glibenclamida. Esta droga é um agente hipoglicemiante oral que estimula a secreção de insulina nas células beta pancreáticas através da inibição de canais de potássio sensíveis ao ATP (DUNNE & PETERSEN, 1991). Devido ao aumento da concentração plasmática de insulina, o uso de glibenclamida pode provocar hipoglicemia. Para evitar alterações nos níveis de glicose plasmática que pudessem interferir em nossos resultados, a glibenclamida foi administrada em solução de 0,01 N NaOH contendo 4% de glicose. Os resultados deste trabalho demonstraram que o pré-tratamento com glibenclamida não alterou de forma significativa o efeito gastroprotetor da amifostina na lesão induzida por etanol. Esse achado é semelhante, em parte, ao de Mota *et al.* (2007), o qual demonstrou que o efeito protetor da amifostina na gastropatia por indometacina não foi alterado pelo uso de glibenclamida.

Neste trabalho foi também estudado o papel do óxido nítrico (NO) no efeito protetor da amifostina na lesão gástrica induzida pelo etanol. A participação do óxido nítrico na fisiologia gastrointestinal tem sido motivo de muitos estudos nos últimos anos. O NO possui importante papel na modulação de componentes fisiológicos do trato gastrointestinal (TGI), incluindo o controle da motilidade (UEKI *et al.*, 1988), fluxo sanguíneo gástrico (WHITTLE, 2005), adesão de neutrófilos (KUBES *et al.*, 1991) e secreção de muco e bicarbonato (WALLACE & MILLER, 2000). A presença de óxido nítrico em baixas concentrações está associada aos efeitos benéficos no TGI, enquanto altas concentrações podem induzir a formação de radicais derivados do nitrogênio, que são tóxicos para diversas linhagens celulares (WALLACE & MILLER, 2000; MUSCARÁ & WALLACE, 1999).

Santos *et al.* (2005) mostraram que o sildenafil, droga estimuladora da via NO/GMP_C, protege a mucosa gástrica da lesão por indometacina. O uso de L-NAME (N^G-nitro-L-arginina-metil-éster), inibidor da óxido nítrico sintase, retardou a cicatrização da injúria gástrica aguda (KONTUREK *et al.*, 1993) e aumentou a intensidade da lesão provocada por etanol em estômago de ratos (NAHAVANDI *et al.*, 1999). Medeiros *et al.*

(2008) mostraram também uma ação protetora do sildenafil na lesão gástrica induzida por etanol. Em nossos experimentos, porém, o pré-tratamento com L-NAME não alterou, de forma significativa, a gastroproteção da amifostina contra a lesão por etanol. Este resultado é semelhante ao de Mota *et al.* (2007), o qual não observou alteração na proteção gástrica da amifostina contra a lesão por indometacina com o uso de L-NAME.

Baseado no exposto acima, acreditamos que o tratamento com amifostina, por via oral e subcutânea, é capaz de reduzir a lesão gástrica aguda induzida por etanol em ratos. Esse efeito parece ser mediado, pelo menos em parte, pelo aumento da concentração de glutathione no tecido gástrico e pela estimulação de neurônios sensoriais aferentes. Nossos resultados também sugerem que a inibição de COX-2, NOS e canais K_{ATP} não altera de forma significativa a gastroproteção da amifostina.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A amifostina demonstrou ter atividade gastroprotetora em modelo de lesão gástrica aguda induzida por etanol em ratos, tanto com o uso tópico (via oral) como com o uso sistêmico (via subcutânea).
- A propriedade antioxidante da amifostina parece estar relacionada com seu efeito gastroprotetor, uma vez que essa substância manteve os níveis gástricos de grupos sulfidrílicos não-protéicos elevados na presença de etanol.
- A presença de neurônios sensoriais aferentes parece contribuir para o efeito gastroprotetor da amifostina, já que a ablação destes pelo uso de doses neurotóxicas de capsaicina reduziu a proteção da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol.
- A ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP, a atividade da ciclooxigenase-2 e a ação da NO sintase parecem não estar relacionadas ao efeito gastroprotetor da amifostina, pois o pré-tratamento com glibenclamida, celecoxibe e L-NAME não alterou de forma significativa a proteção da amifostina na lesão gástrica induzida por etanol.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AASE, S. Disturbances in the balance between aggressive and protective factors in the gastric and duodenal mucosa. **Scand J Gastroenterol Suppl.**, v. 163, p. 17-23, 1989.

ABDEL-SALAM, O.M.; MÓZSIK, G.; SZOLCSÁNYI, J. Studies on the effect of intragastric capsaicin on gastric ulcer and on the prostacyclin-induced cytoprotection in rats. **Pharmacol Res.**, v. 32, p. 209-215, 1995.

ABDEL-SALAM, O.M.; SZOLCSÁNYI, J.; MÓZSIK, G. The indomethacin-induced gastric mucosal damage in rats. Effect of gastric acid, acid inhibition, capsaicin-type agents and prostacyclin. **J Physiol Paris.**, v. 91, p. 7-19, 1997.

ABDEL-SALAM, O.M.; SZOLCSÁNYI, J.; PÓRSZÁSZ, R.; MÓZSIK, G. Effect of capsaicin and resiniferatoxin on gastrointestinal blood flow in rats. **Eur J Pharmacol.**, v. 305, p. 127-136, 1996.

AIHARA, E.; HAYASHI, M.; SASAKI, Y.; KOBATA, A.; TAKEUCHI, K. Mechanisms underlying capsaicin-stimulated secretion in the stomach: comparison with mucosal acidification. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 315, p. 423-432, 2005.

AIHARA, E.; SASAKI, Y.; ISE, F.; KITA, K.; NOMURA, Y.; TAKEUCHI, K. Distinct mechanisms of acid-induced HCO₃⁻ secretion in normal and slightly permeable stomachs. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 291, p. 464-471, 2006.

AKAR, F.; UYDEŞ-DOĞAN, B.S.; BUHARALIOĞLU, C.K.; ABBAN, G.; HEINEMANN, A.; HOLZER, P.; VAN DE VOORDE, J. Protective effect of cromakalim and diazoxide, and proulcerogenic effect of glibenclamide on indomethacin-induced gastric injury. **Eur J Pharmacol.**, v. 374, p. 461-470, 1999.

AKIBA, Y.; NAKAMURA, M.; NAGATA, H.; KAUNITZ, J.D.; ISHII, H. Acid-sensing pathways in rat gastrointestinal mucosa. **J Gastroenterol.**, v. 37, p. 133-138, 2002.

ALBERTS, D.S.; SPEICHER, L.A.; KRUTZSCH, M.; WYMER, J.; CAPIZZI, R.L.; CONLON, J.; BARRETT, A.; AICKIN, M. WR-1065, the active metabolite of amifostine (Ethyol), does not inhibit the cytotoxic effects of a broad range of standard anticancer drugs against human ovarian and breast cancer cells. **Eur J Cancer.**, v. 32, p. S17-S20, 1996.

ANNE, P.R.; CURRAN, W.J. JR. A phase II trial of subcutaneous amifostine and radiation therapy in patients with head and neck cancer. **Semin Radiat Oncol.**, v. 12, p. 18-19, 2002.

ANNÉ, P.R.; MACHTAY, M.; ROSENTHAL, D.I.; BRIZEL, D.M.; MORRISON, W.H.; IRWIN, D.H.; CHOUGULE, P.B.; ESTOPINAL, N.C.; BERSON, A.; CURRAN, W.J. JR. A Phase II trial of subcutaneous amifostine and radiation therapy in patients with head-and-neck cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 67, p. 445-452, 2007.

ANTONADOU, D.; PEPELASSI, M.; SYNODINO, M.; PUGLISI, M.; THROUVALAS, N. Prophylactic use of amifostine to prevent radiochemotherapy-induced mucositis and xerostomia in head-and-neck cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 52, p. 739-747, 2002.

ASHCROFT, F.M.; HARRISON, D.E.; ASHCROFT, S.J. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-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 neurones. **Pflugers Arch.**, v. 412, p. 297-304, 1988.

AVILÉS, A.; DÍAZ-MAQUEO, J.C.; TALAVERA, A.; GARCÍA, E.L.; GUZMÁN, R.; NAMBO, M.J. Bone marrow protection with amifostine in the treatment of high-risk malignant lymphoma. **Eur J Cancer.**, v. 33, p. 1323-1325, 1997.

BACHY, C.M.; FAZENBAKER, C.A.; KIFLE, G.; MCCARTHY, M.P.; CASSATT, D.R. Tissue levels of WR-1065, the active metabolite of amifostine (Ethyol), are equivalent following intravenous or subcutaneous administration in cynomolgus monkeys. **Oncology.**, v. 67, p. 187-193, 2004.

BARDET, E.; MARTIN, L.; CALAIS, G.; TUCHAIS, C.; BOURHIS, J.; RHEIN, B.; FEHAM, N.; ALPHONSI, M. Preliminary data of the GORTEC 2000-02 phase III trial comparing intravenous and subcutaneous administration of amifostine for head and neck tumors treated by external radiotherapy. **Semin Oncol.**, v. 29, p. 57-60, 2002.

BATISTA, L.M.; ALMEIDA, A.B.; PIETRO, M.L.; TOMA, W.; CALVO, T.R.; VILEGAS, W.; BRITO, B.A. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. **Biol Pharm Bull.**, v. 27, p. 328-332, 2004.

BEN-JOSEF, E.; HAN, S.; TOBI, M.; SHAW, L.M.; BONNER, H.S.; VARGAS, B.J.; PROKOP, S.; STAMOS, B.; KELLY, L.; BIGGAR, S.; KAPLAN, I. A pilot study of topical intrarectal application of amifostine for prevention of late radiation rectal injury. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 53, p. 1160-1164, 2002.

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

BONNER, H.S.; SHAW, L.M. New dosing regimens for amifostine: a pilot study to compare the relative bioavailability of oral and subcutaneous administration with intravenous infusion. **J Clin Pharmacol.**, v. 42, p. 166-174, 2002.

BRIZEL, D.M.; WASSERMAN, T.H.; HENKE, M.; STRNAD, V.; RUDAT, V.; MONNIER, A.; ESCHWEGE, F.; ZHANG, J.; RUSSELL, L.; OSTER, W.; SAUER, R. Phase III randomized trial of amifostine as a radioprotector in head and neck cancer. **J Clin Oncol.**, v. 18, p. 3339-3345, 2000.

BROWN, J.F.; HANSON, P.J.; WHITTLE, B.J. Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach. **Eur J Pharmacol.**, v. 223, p. 103-104, 1992.

BROWN, L.M.; HOOVER, R.; GRIDLEY, G.; SCHOENBERG, J.B.; GREENBERG, R.S.; SILVERMAN, D.T.; SCHWARTZ, A.G.; SWANSON, G.M.; LIFF, J.M.; POTTERN, L.M. Drinking practices and risk of squamous-cell esophageal cancer among Black and White men in the United States. **Cancer Causes Control.**, vol. 8, p. 605-609, 1997.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; SLIWOWSKI, Z.; DROZDOWICZ, D.; STACHURA, J.; PAJDO, R.; HAHN, E.G. Role of prostaglandins generated by cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in healing of ischemia-reperfusion-induced gastric lesions. **Eur J Pharmacol.**, v. 385, p. 47-61, 1999.

BUCK, S.H.; BURKS, T.F. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. **Pharmacol Rev.**, v. 38, p. 179-226, 1986.

BUENTZEL, J.; MICKE, O.; ADAMIETZ, I.A.; MONNIER, A.; GLATZEL, M.; DE VRIES, A. Intravenous amifostine during chemoradiotherapy for head-and-neck cancer: a randomized placebo-controlled phase III study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 64, p. 684-691, 2006.

BUKOWSKI, R.M. Amifostine (Ethyol): dosing, administration and patient management guidelines. **Eur J Cancer.**, v. 32, p. S46-S49, 1996.

BURESH, C.M.; BAKER, K.S.; SHAFER, M. Fever and rash after amifostine therapy. **J Pediatr Hematol Oncol.**, v. 20, p. 361-362, 1998.

BUTTERWORTH, R.F. Pathophysiology of alcoholic brain damage: synergistic effects of ethanol, thiamine deficiency and alcoholic liver disease. **Metab Brain Dis.**, v. 10, p. 1-8, 1995.

CALABRO-JONES, P.M.; FAHEY, R.C.; SMOLUK, G.D.; WARD, J.F. Alkaline phosphatase promotes radioprotection and accumulation of WR-1065 in V79-171 cells incubated in medium containing WR-2721. **Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.**, v. 47, p. 23-27, 1985.

CAPIZZI, R. Amifostine: the preclinical basis for broad-spectrum selective cytoprotection of normal tissues from cytotoxic therapies. **Semin Oncol.**, v. 23, p. 2-17, 1996.

CAPIZZI, R.L. Clinical status and optimal use of amifostine. **Oncology.**, v. 13, p. 47-59, 1999.

CAPIZZI, R.L.; OSTER, W. Protection of normal tissue from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine: clinical experiences. **Eur J Cancer.**, v. 31, p. S8-S13, 1995.

CARMELIET, P.; DOR, Y.; HERBERT, J.M.; FUKUMURA, D.; BRUSSELMANS, K.; DEWERCHIN, M.; NEEMAN, M.; BONO, F.; ABRAMOVITCH, R.; MAXWELL, P.; KOCH, C.J.; RATCLIFFE, P.; MOONS, L.; JAIN, R.K.; COLLEN, D.; KESHERT, E. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. **Nature.**, v. 394, p. 485-490, 1998.

CASSATT, D.R.; FAZENBAKER, C.A.; KIFLE, G.; BACHY, C.M. Subcutaneous administration of amifostine (ethyol) is equivalent to intravenous administration in a rat mucositis model. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 57, p. 794-802, 2003.

CATERINA, M.J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A.B.; MARTIN, W.J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K.R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science.**, v. 288, p. 306-313, 2000.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature.**, v. 389, p. 816-824, 1997.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Alcohol-Attributable Deaths Report, Average for United States 2001-2005.

CHAKRAVARTHI, S.; JESSOP, C.E.; BULLEID, N.J. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. **EMBO Rep.**, v. 7, p. 271-275, 2006.

CHEN, Y.; YANG, Y.; MILLER, M.L.; SHEN, D.; SHERTZER, H.G.; STRINGER, K.F.; WANG, B.; SCHNEIDER, S.N.; NEBERT, D.W.; DALTON, T.P. Hepatocyte-specific Gclc deletion leads to rapid onset of steatosis with mitochondrial injury and liver failure. **Hepatology**, v. 45, p. 1118-1128, 2007.

CHEUNG, L.Y. Gastric mucosal blood flow: its measurement and importance in mucosal defense mechanisms. **J Surg Res.**, v. 36, p. 282-288, 1984.

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

CHRISTIANSON, J.A.; MCILWRATH, S.L.; KOERBER, H.R.; DAVIS, B.M. Transient receptor potential vanilloid 1-immunopositive neurons in the mouse are more prevalent within colon afferents compared to skin and muscle afferents. **Neuroscience**, v. 140, p. 247-257, 2006.

COLTON, D.G.; DRISKILL, D.R.; PHILLIPS, E.L.; POY, P.; DAJANI, E.Z. Effect of SC-29333, an inhibitor of gastric secretion, on canine gastric mucosal blood flow and serum gastrin levels. **Arch Int Pharmacodyn Ther.**, v. 236, p. 86-95, 1978.

CULY, C.R.; SPENCER, C.M. Amifostine: an update on its clinical status as a cytoprotectant in patients with cancer receiving chemotherapy or radiotherapy and its potential therapeutic application in myelodysplastic syndrome. **Drugs**, v. 61, p. 641-684, 2001.

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

DAVENPORT, H.W. Ethanol damage to canine oxyntic glandular mucosa. **Proc Soc Exp Biol Med.**, 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.

DAVIS, J.B.; GRAY, J.; GUNTHORPE, M.J.; HATCHER, J.P.; DAVEY, P.T.; OVEREND, P.; HARRIES, M.H.; LATCHAM, J.; CLAPHAM, C.; ATKINSON, K.; HUGHES, S.A.; RANCE, K.; GRAU, E.; HARPER, A.J.; PUGH, P.L.; ROGERS, D.C.; BINGHAM, S.; RANDALL, A.; SHEARDOWN, S.A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v. 405, p. 183-187, 2000.

DELANEY, J.P.; BONSAK, M.E.; FELEMOVICIUS, I. Radioprotection of the rat small intestine with topical WR-2721. **Cancer.**, v. 74, p. 2379-2384, 1994.

DIPAOLA, R.; RODRIGUEZ, R.; RECIO, A.; GOODIN, S.; ORLICK, M.; MOLLMAN, J. A phase I study of amifostine and paclitaxel in patients with advanced malignancies. **Proc Amer Soc Clin Oncol.**, 15: 488, abstract, 1996.

DORR, R.T. Cytoprotective agents for anthracyclines. **Semin Oncol.**, v. 23, p. 23-34, 1996.

DUNN, T.A.; SCHMOLL, H.J.; GRÜNWARD, V.; BOKEMEYER, C.; CASPER, J. Amifostine does not alter the antitumor activity of cisplatin in a pre-clinical model of testicular cancer. **Anticancer Drugs.**, v. 7, p. 795-799, 1996.

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. 1071, p. 67-82, 1991.

EVANGELISTA, S. Role of sensory neurons in restitution and healing of gastric ulcers. **Curr Pharm Des.**, v. 12, p. 2977-2984, 2006.

FAUCI, A.S.; BRAUNWALD, E.; KASPER, D.L.; HAUSER, S.L.; LONGO, D.L.; JAMESON, J.L.; LOSCALZO, J. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. McGraw-Hil Editora, 17ª edição, Parte 13, Capítulos 284 e 287, 2008.

FAUSSONE-PELLEGRINI, M.S.; TADDEI, A.; BIZZOCO, E.; LAZZERI, M.; VANNUCCHI, M.G.; BECHI, P. Distribution of the vanilloid (capsaicin) receptor type 1 in the human stomach. **Histochem Cell Biol.**, v. 124, p. 61-68, 2005.

FLECKENSTEIN, L.; SWYNNERTON, N.F.; LUDDEN, T.M.; MANGOLD, D.J. Bioavailability and newer methods of delivery of phosphorothioate radioprotectors. **Pharmacol Ther.**, v. 39, p. 203-212, 1988.

FLEMING, I.; BUSSE, R. NO: the Primary EDRF. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 31, p. 5-14, 1999.

FLEMSTRÖM, G.; HEYLINGS, J.R.; GARNER, A. Gastric and duodenal HCO₃⁻ transport in vitro: effects of hormones and local transmitters. **Am J Physiol.**, v. 242, p. 100-110, 1982.

FÖRSTERMANN, 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.

FOSTER-NORA, J.A.; SIDEN, R. Amifostine for protection from antineoplastic drug toxicity. **Am J Health Syst Pharm.**, v. 54, p. 787-800, 1997.

FRANCE, H.G. JR; JIRTLE, R.L.; MANSBACH, C.M. 2ND. Intracolonic WR 2721 protection of the rat colon from acute radiation injury. **Gastroenterology**, v. 91, p. 644-650, 1986.

FUKUSHIMA, K.; AOI, Y.; KATO, S.; TAKEUCHI, K. Gastro-protective action of lafutidine mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons without interaction with TRPV1 and involvement of endogenous prostaglandins. **World J Gastroenterol.**, v. 12, p. 3031-3037, 2006.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury. Laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **The FASEB J.**, v. 6, p. 825-831, 1992.

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.

GLOVER, D.; GLICK, J.H.; WEILER, C.; FOX, K.; GUERRY, D. WR-2721 and high-dose cisplatin: an active combination in the treatment of metastatic melanoma. **J Clin Oncol.**, v. 5, p. 574-578, 1987.

GLOVER, D.; GLICK, J.H.; WEILER, C.; FOX, K.; TURRISI, A.; KLIGERMAN, M.M. Phase I/II trials of WR-2721 and cis-platinum. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 12, p. 1509-1512, 1986.

GLOVER, D.; GLICK, J.H.; WEILER, C.; HUROWITZ, S.; KLIGERMAN, M.M. WR-2721 protects against the hematologic toxicity of cyclophosphamide: a controlled phase II trial. **J Clin Oncol.**, v. 4, p. 584-588, 1986.

GLOVER, D.; RILEY, L.; CARMICHAEL, K.; SPAR, B.; GLICK, J.; KLIGERMAN, M.M.; AGUS, Z.S.; SLATOPOLSKY, E.; ATTIE, M.; GOLDFARB, S. Hypocalcemia and inhibition of parathyroid hormone secretion after administration of WR-2721 (a radioprotective and chemoprotective agent). **N Engl J Med.**, v. 309, p. 1137-1141, 1983.

GOMES, A.S.; LIMA, L.M.; SANTOS, C.L.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H. LPS from *Escherichia coli* protects against indomethacin-induced gastropathy in rats--role of ATP-sensitive potassium channels. **Eur J Pharmacol.**, v. 547, p. 136-142, 2006.

GONZALEZ, F.G.; PORTELA, T.Y.; STIPP, E.J.; DI STASI, L.C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **J Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 41-47, 2001.

GRAY, J.L.; BUNNETT, N.W.; ORLOFF, S.L.; MULVIHILL, S.J.; DEBAS, H.T. A role for calcitonin gene-related peptide in protection against gastric ulceration. **Ann Surg.**, v. 219, p. 58-64, 1994.

GRIGGS, J.J. Reducing the toxicity of anticancer therapy: new strategies. **Leuk Res.**, v. 22, p. S27-S33, 1998.

GUNTHORPE, M.J.; BENHAM, C.D.; RANDALL, A.; DAVIS, J.B. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 23, p. 183-191, 2002.

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

HALBERG, F.E.; LARUE, S.M.; RAYNER, A.A.; BURNEL, W.M.; POWERS, B.E.; CHAN, A.S.; SCHELL, M.C.; GILLETTE, E.L.; PHILLIPS, T.L. Intraoperative radiotherapy with localized radioprotection: diminished duodenal toxicity with intraluminal WR2721. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 21, p. 1241-1246, 1991.

HALTER, F.; TARNAWSKI, A.S.; SCHMASSMANN, A.; PESKAR, B.M. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut.**, v. 49, p. 443-453, 2001.

HARADA, N.; OKAJIMA, K. Inhibition of neutrophil activation by lafutidine, an H₂-receptor antagonist, through enhancement of sensory neuron activation contributes to the reduction of stress-induced gastric mucosal injury in rats. **Dig Dis Sci.**, v. 52, p. 469-477, 2007.

HAYES, P.; MEADOWS, H.J.; GUNTHORPE, M.J.; HARRIES, M.H.; DUCKWORTH, D.M.; CAIRNS, W.; HARRISON, D.C.; CLARKE, C.E.; ELLINGTON, K.; PRINJHA, R.K.; BARTON, A.J.; MEDHURST, A.D.; SMITH, G.D.; TOPP, S.; MURDOCK, P.; SANGER, G.J.; TERRETT, J.; JENKINS, O.; BENHAM, C.D.; RANDALL, A.D.; GLOGER, I.S.; DAVIS, J.B. Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. **Pain.**, v. 88, p. 205-215, 2000.

HOLLANDER, D.; TARNAWSKI, A.; GERGELY, H.; ZIPSER, R.D. Sucralfate protection of the gastric mucosa against ethanol-induced injury: a prostaglandin-mediated process? **Scand J Gastroenterol Suppl.**, v. 101, p. 97-102, 1984.

HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol Rev.**, v. 43, p. 143-201, 1991.

HOLZER, P. Neural emergency system in the stomach. **Gastroenterology.**, v. 114, p. 823-839, 1998.

HOLZER, P. TRPV1 and the gut: from a tasty receptor for a painful vanilloid to a key player in hyperalgesia. **Eur J Pharmacol.**, v. 500, p. 231-241, 2004.

HOLZER, P.; LIPPE, I.T. Stimulation of afferent nerve endings by intragastric capsaicin protects against ethanol-induced damage of gastric mucosa. **Neuroscience.**, v. 27, p. 981-987, 1988.

HOLZER, P.; LIPPE, II.; RAYBOULD, H.E.; PABST, M.A.; LIVINGSTON, E.H.; AMANN, R.; PESKAR, B.M.; PESKAR, B.A.; TACHÉ, Y.; GUTH, P.H. Role of peptidergic sensory neurons in gastric mucosal blood flow and protection. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 632, p. 272-282, 1991.

HOLZER, P.; PABST, M.A.; LIPPE, I.T.; PESKAR, B.M.; PESKAR, B.A.; LIVINGSTON, E.H.; GUTH, P.H. Afferent nerve-mediated protection against deep mucosal damage in the rat stomach. **Gastroenterology.**, v. 98, p. 838-848, 1990.

HOLZER, P.; SAMETZ, W. Gastric mucosal protection against ulcerogenic factors in the rat mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons. **Gastroenterology.**, v. 91, p. 975-981, 1986.

HORI, H.; KAWANO, T.; ENDO, M.; YUASA, Y. Genetic polymorphisms of tobacco- and alcohol-related metabolizing enzymes and human esophageal squamous cell carcinoma susceptibility. **J Clin Gastroenterol.**, v. 25, p. 568-575, 1997.

HORIE, S.; MICHAEL, G.J.; PRIESTLEY, J.V. Co-localization of TRPV1-expressing nerve fibers with calcitonin-gene-related peptide and substance P in fundus of rat stomach. **Inflammopharmacology.**, v. 13, p. 127-137, 2005.

HUI, W.M.; CHEN, B.W.; CHO, C.H.; LUK, C.T.; LAM, S.K. Role of gastric mucosal blood flow in cytoprotection. **Digestion.**, v. 48, p. 113-120, 1991.

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

ICHIKAWA, T.; KUSAKABE, T.; GONO, Y.; SHIKAMA, N.; HIRUMA, H.; KAWAKAMI, T.; ISHIHARA, K. Nitric oxide synthase activity in rat gastric mucosa contributes to mucin synthesis elicited by calcitonin gene-related peptide. **Biomed Res.**, v. 27, p. 117-124, 2006.

INAGAKI, N.; GONOI, T.; CLEMENT, J.P. 4TH.; NAMBA, N.; INAZAWA, J.; GONZALEZ, G.; AGUILAR-BRYAN, L.; SEINO, S.; BRYAN, J. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. **Science.**, v. 270, p. 1166-1170, 1995.

INUI, T.; KINOSHITA, Y.; YAMAGUCHI, A.; YAMATANI, T.; CHIBA, T. Linkage between capsaicin-stimulated calcitonin gene-related peptide and somatostatin release in rat stomach. **Am J Physiol.**, v. 261, p. G770-G774, 1991.

ISHIHARA, K.; KUWATA, H.; OHARA, S.; OHKAWA, H.; OKABE, H.; HOTTA, K. Mucus glycoprotein and mucosal protection. **J Clin Gastroenterol.**, v. 10, p. S24-S27, 1988.

KAJSTURA, J.; CHENG, W.; REISS, K.; CLARK, W.A.; SONNENBLICK, E.H.; KRAJEWSKI, S.; REED, J.C.; OLIVETTI, G.; ANVERSA, P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. **Lab Invest.**, v. 74, p. 86-107, 1996.

KEMP, G.; ROSE, P.; LURAIN, J.; BERMAN, M.; MANETTA, A.; ROULLET, B.; HOMESLEY, H.; BELPOMME, D.; GLICK, J. Amifostine pretreatment for protection against cyclophosphamide-induced and cisplatin-induced toxicities: results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer. **J Clin Oncol.**, v. 14, p. 2101-2112, 1996.

KIM, P.K.; ZAMORA, R.; PETROSKO, P.; BILLIAR, T.R. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. **Int Immunopharmacol.**, v. 1, p. 1421-1441, 2001.

KO, J.K.; CHO, C.H. Histological study of mechanisms of adaptive cytoprotection on ethanol-induced mucosal damage in rat stomachs. **Dig Dis Sci.**, v. 43, p. 1248-1257, 1998.

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

KORST, A.E.; GALL, H.E.; VERMORKEN, J.B.; VAN DER VIJGH, W.J. Pharmacokinetics of amifostine and its metabolites in the plasma and ascites of a cancer patient. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 39, p. 162-166, 1996.

KOSTER, J.C.; KNOPP, A.; FLAGG, T.P.; MARKOVA, K.P.; SHA, Q.; ENKVETCHAKUL, D.; BETSUYAKU, T.; YAMADA, K.A.; NICHOLS, C.G. Tolerance for ATP-insensitive K(ATP) channels in transgenic mice. **Circ Res.**, v. 89, p. 1022-1029, 2001.

KOUKOURAKIS, M.I.; FLORDELLIS, C.S.; GIATROMANOLAKI, A.; KOUKOURAKI, S.; KAPSORITAKIS, A.; POTAMIANOS, S.; RETALIS, G.; SIVRIDIS, E.; SALSAA, B.; HARRIS, A.L.; MARAGOUDAKIS, M.I. Oral administration of recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor in the management of radiotherapy-induced esophagitis. **Clin Cancer Res.**, v. 5, p. 3970-3976, 1999.

KOUKOURAKIS, M.I.; KYRIAS, G.; KAKOLYRIS, S.; KOUROUSSIS, C.; FRANGIADAKI, C.; GIATROMANOLAKI, A.; RETALIS, G.; GEORGOULIAS, V. Subcutaneous administration of amifostine during fractionated radiotherapy: a randomized phase II study. **J Clin Oncol.**, v. 18, p. 2226-2233, 2000.

KOUKOURAKIS, M.I.; SIMOPOULOS, C.; MINOPOULOS, G.; PATLAKAS, G.; POLYCHRONIDIS, A.; LIMBERIS, V.; ROMANIDES, K.; PITIACOUDIS, M.; MANOLAS, C. Amifostine before chemotherapy: improved tolerance profile of the subcutaneous over the intravenous route. **Clin Cancer Res.**, v. 9, p. 3288-3293, 2003.

KOULOULIAS, V.E.; KOUVARIS, J.R.; PISSAKAS, G.; MALLAS, E.; ANTYPAS, C.; KOKAKIS, J.D.; MATSOPOULOS, G.; MICHPOULOS, S.; MYSTAKIDOU, K.; VLAHOS, L.J. Phase II multicenter randomized study of amifostine for prevention of acute radiation rectal toxicity: topical intrarectal versus subcutaneous application. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 62, p. 486-493, 2005.

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

KUO, P.C.; SCHROEDER, R.A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Ann Surg.**, v. 221, p. 220-235, 1995.

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.

KWOK, Y.N.; MCINTOSH, C.H. Release of substance P-like immunoreactivity from the vascularly perfused rat stomach. **Eur J Pharmacol.**, v. 180, p. 201-207, 1990.

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

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

LEE, J.S.; OH, T.Y.; KIM, Y.K.; BAIK, J.H.; SO, S.; HAHM, 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, S.O. Studies on the influence of diets and lipotropic substances upon the various organs and metabolic changes in rabbits on long-term feeding with red pepper. II. Histopathological changes of liver and spleen. **Korean J. Int. Med.**, v. 6, p. 383–387, 1963.

LIEBER, C.S. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. **Clin Chim Acta.**, v. 257, p. 59-84, 1997.

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.

LINKS, M.; LEWIS, C. Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 57, p. 293–308, 1999.

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

LIST, A.F.; HEATON, R.; GLINSMANN-GIBSON, B.; CAPIZZI, R.L. Amifostine protects primitive hematopoietic progenitors against chemotherapy cytotoxicity. **Semin Oncol.**, v. 23, p. 58-63, 1996.

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

MAGA, J.A. Capsicum. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.*, v. 7, p. 177-199, 1975.

MAKARA, G.B.; CSALAY, L.; FRENKL, R.; SOMFAI, Z.; SZEPESHÁZI, K. Effect of capsaicin on experimental ulcer in the rat. *Acta Med Acad Sci Hung.*, v. 21, p. 213-216, 1965.

MARICIC, N.; EHRLICH, K.; GRETZER, B.; SCHULIGOI, R.; RESPONDEK, M.; PESKAR, B.M. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors aggravate ischaemia-reperfusion injury in the rat stomach. *Br J Pharmacol.*, v. 128, p. 1659-1666, 1999.

MARKWORTH, E.; SCHWANSTECHEER, C.; SCHWANSTECHEER, M. ATP₄- mediates closure of pancreatic beta-cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites. *Diabetes.*, v. 49, p. 1413-1418, 2000.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Gastroprotections of escins Ia, Ib, IIa, and IIb on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Eur J Pharmacol.*, v. 373, p. 63-70, 1999.

MCCAULEY, D.L. Amifostine. A novel cytoprotective agent. *Cancer Pract.*, v. 5, p. 189-191, 1997.

MEDEIROS, J.V.; GADELHA, G.G.; LIMA, S.J.; GARCIA, J.A.; SOARES, P.M.; SANTOS, A.A.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H. Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. *Br J Pharmacol.*, v. 153, p. 721-727, 2008.

MERCHANT, N.B.; DEMPSEY, D.T.; GRABOWSKI, M.W.; RIZZO, M.; RITCHIE, W.P. JR. Capsaicin-induced gastric mucosal hyperemia and protection: the role of calcitonin gene-related peptide. *Surgery.*, v. 116, p. 419-425, 1994.

MILLER, T.A. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *Am J Physiol.*, v. 245, p. G601-G623, 1983.

MILLER, T.A.; LI, D.; KUO, Y.J.; SCHMIDT, K.L.; SHANBOUR, L.L. Nonprotein sulfhydryl compounds in canine gastric mucosa: effects of PGE₂ and ethanol. *Am J Physiol.*, v. 249, p. 137-144, 1985.

MINCIS, M.; CHEBLI, J.M.; KHOURI, S.T.; MINCIS, R. Ethanol and the gastrointestinal tract. *Arq Gastroenterol.*, v. 32, p. 131-139, 1995.

MIYAKE, K.; TSUKUI, T.; WADA, K.; TATSUGUCHI, A.; FUTAGAMI, S.; HIRATSUKA, T.; SHINOKI, K.; IIZUMI, T.; AKAMATSU, T.; SAKAMOTO, C.; KOBAYASHI, M. Irritant-induced cyclooxygenase-2 is involved in the defense mechanism of the gastric mucosa in mice. **J Gastroenterol.**, v. 37, p. 164-171, 2002.

MIZUI, T.; SATO, H.; HIROSE, F.; DOTEUCHI, M. Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. **Life Sci.**, v. 41, p. 755-763, 1987.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONTANA, G.S.; ANSCHER, M.S.; MANSBACH, C.M. 2ND; DALY, N.; DELANNES, M.; CARKE-PEARSON, D.; GAYDICA, E.F. Topical application of WR-2721 to prevent radiation-induced proctosigmoiditis. A phase I/II trial. **Cancer.**, v. 69, p. 2826-2830, 1992.

MOTA, J.M.; SOARES, P.M.; MENEZES, A.A.; LEMOS, H.P.; CUNHA, F.Q.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A.; DE SOUZA, M.H.. Amifostine (Wr-2721) prevents indomethacin-induced gastric damage in rats: role of non-protein sulfhydryl groups and leukocyte adherence. **Dig Dis Sci.**, v. 52, p. 119-125, 2007.

MOVSAS, B.; SCOTT, C.; LANGER, C.; WERNER-WASIK, M.; NICOLAOU, N.; KOMAKI, R.; MACHTAY, M.; SMITH, C.; AXELROD, R.; SARNA, L.; WASSERMAN, T.; BYHARDT, R. Randomized trial of amifostine in locally advanced non-small-cell lung cancer patients receiving chemotherapy and hyperfractionated radiation: radiation therapy oncology group trial 98-01. **J Clin Oncol.**, v. 23, p. 2145-2154, 2005.

MUSCARÁ, 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.

NAHAVANDI, A.; DEHPOUR, A.R.; MANI, A.R.; HOMAYOUNFAR, H.; ABDOLI, A. N(G)-nitro-L-arginine methylester is protective against ethanol-induced gastric damage in cholestatic rats. **Eur J Pharmacol.**, v. 370, p. 283-286, 1999.

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

NOZAWA, Y.; NISHIHARA, K.; YAMAMOTO, A.; NAKANO, M.; AJIOKA, H.; MATSUURA, N. Distribution and characterization of vanilloid receptors in the rat stomach. **Neurosci Lett.**, v. 309, p. 33-36, 2001.

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

OKAJIMA, K.; HARADA, N. Regulation of inflammatory responses by sensory neurons: molecular mechanism(s) and possible therapeutic applications. **Curr Med Chem.**, v. 13, p. 2241-2251, 2006.

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

PAINE, G.D.; TAYLOR, C.W.; LOPEZ, M.H.; JOHNSON, C.S.; CAPIZZI, R.L. Effects of amifostine and paclitaxel on growth of human ovarian carcinoma xenografts in the severe combined immune-deficient mouse: preliminary results. **Semin Oncol.**, v. 23, p. 35-39, 1996.

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

PARK, J.S.; CHOI, M.A.; KIM, B.S.; HAN, I.S.; KURATA, T.; YU, R. Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats. **Life Sci.**, v. 67, p. 3087-3093, 2000.

PATTERSON, L.M.; ZHENG, H.; WARD, S.M.; BERTHOUD, H.R. Vanilloid receptor (VR1) expression in vagal afferent neurons innervating the gastrointestinal tract. **Cell Tissue Res.**, v. 311, p. 277-287, 2003.

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.

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

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

POLLA, B.S.; DONATI, Y.; KONDO, M.; TOCHON-DANGUY, H.J.; BONJOUR, J.P. Protection from cellular oxidative injury and calcium intrusion by N-(2-mercaptoethyl)-1,3-propanediamine, WR 1065. **Biochem. Pharmacol.**, v. 40, p. 1469–1475, 1990.

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

RAHGOZAR, M.; PAZOKITOROUDI, H.; BAKHTIARIAN, A.; DJAHANGUIRI, B. Diazoxide, a K(ATP) opener, accelerates restitution of ethanol or indomethacin-induced gastric ulceration in rats independent of polyamines. **J Gastroenterol Hepatol.**, v. 16, p. 290-296, 2001.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Farmacology*, 6ª Edição, Elsevier, 2007.

REED, D.J.; FARISS, M.W. Glutathione depletion and susceptibility. **Pharmacol Rev.**, v. 36, p. 25S-33S, 1984.

REN, J.; YOUNG, R.L.; LASSITER, D.C.; HARTY, R.F. Calcitonin gene-related peptide mediates capsaicin-induced neuroendocrine responses in rat antrum. **Gastroenterology**, v. 104, p. 485-491, 1993.

RICHARDSON, C.T. Pathogenetic factors in peptic ulcer disease. **Am J Med.**, v. 79 p. 1-7, 1985.

ROACH, J. 9,000-Year-Old Beer Re-Created From Chinese Recipe. **National Geographic News**. Julho 18, 2005.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433-443, 1979.

ROZIN, P. Getting to like the burn of chili pepper. Biological, physiological, and cultural perspectives, in: Green B.G., Mason J.R., Kare M.R. (Eds.), **Chemical Senses Vol 2 Irritation**, Marcel Dekker, p. 231–269, 1990.

RUBIN, D.B.; DRAB, E.A.; KANG, H.J.; BAUMANN, F.E.; BLAZEK, E.R. WR-1065 and radioprotection of vascular endothelial cells. I. Cell proliferation, DNA synthesis and damage. **Radiat Res.**, v. 145, p. 210-216, 1996.

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

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.

SANTOS, C.L.; SOUZA, M.H.; GOMES, A.S.; 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. **Br J Pharmacol.**, v. 146, p. 481-486, 2005.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S. 1,8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Dig Dis Sci.**, v. 46, p. 331-337, 2001.

SASSE, A.D.; CLARK, L.G.; SASSE, E.C.; CLARK, O.A. Amifostine reduces side effects and improves complete response rate during radiotherapy: results of a meta-analysis. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 64, p. 784-791, 2006.

SAVOYE, C.; SWENBERG, C.; HUGOT, S.; SY, D.; SABATTIER, R.; CHARLIER, M.; SPOTHEIM-MAURIZOT, M. Thiol WR-1065 and disulphide WR-33278, two metabolites of the drug ethiol (WR-2721), protect DNA against fast neutron-induced strand breakage. **Int J Radiat Biol.**, v. 71, p. 193-202, 1997.

SCHILLER, J.H.; STORER, B.; BERLIN, J.; WITTENKELLER, J.; LARSON, M.; PHARO, L.; LARSON, M.; BERRY, W. Amifostine, cisplatin, and vinblastine in metastatic non-small-cell lung cancer: a report of high response rates and prolonged survival. **J Clin Oncol.**, v. 14, p. 1913-1921, 1996.

SCHUCHTER, L.M. Current role of protective agents in cancer treatment. **Oncology.**, v. 11, p. 505-516, 1997.

SCHUCHTER, L.M. Guidelines for the administration of amifostine. **Semin Oncol.**, v. 23, p. 40-43, 1996.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SEINO, S.; MIKI, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. **Prog Biophys Mol Biol.**, v. 81, p. 133-176, 2003.

SHAW, L.M.; BONNER, H.; LIEBERMAN, R. Pharmacokinetic profile of amifostine. **Semin Oncol.**, v. 23, p. 18-22, 1996.

SHAW, L.M.; GLOVER, D.; TURRISI, A.; BROWN, D.Q.; BONNER, H.S.; NORFLEET, A.L.; WEILER, C.; GLICK, J.H.; KLIGERMAN, M.M. Pharmacokinetics of WR-2721. **Pharmacol Ther.**, v. 39, p. 195-201, 1988.

SHAW, L.M.; TURRISI, A.T.; GLOVER, D.J.; BONNER, H.S.; NORFLEET, A.L.; WEILER, C.; KLIGERMAN, M.M. Human pharmacokinetics of WR-2721. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 12, p. 1501-1504, 1986.

SHIMIZU, S.; EGUCHI, Y.; KAMIKE, W.; ITOH, Y.; HASEGAWA, J.; YAMABE, K.; OTSUKI, Y.; MATSUDA, H.; TSUJIMOTO, Y. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. **Cancer Res.**, v. 56, p. 2161-2166, 1996.

SIEGMUND, S.; TEYSSEN, S.; SINGER, M.V. Alcohol-associated organ damage. Health sequelae caused by moderate alcohol drinking. **Internist (Berl)**., v. 43, p. 287-293, 2002.

SIMONE, N.L.; MÉNARD, C.; SOULE, B.P.; ALBERT, P.S.; GUION, P.; SMITH, S.; GODETTE, D.; CROUSE, N.S.; SCIUTO, L.C.; COOLEY-ZGELA, T.; CAMPHAUSEN, K.; COLEMAN, C.N.; SINGH, A.K. Intrarectal amifostine during external beam radiation therapy for prostate cancer produces significant improvements in Quality of Life measured by EPIC score. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 70, p. 90-95, 2008.

SINGH, A.K.; MÉNARD, C.; GUION, P.; SIMONE, N.L.; SMITH, S.; CROUSE, N.S.; GODETTE, D.J.; COOLEY-ZGELA, T.; SCIUTO, L.C.; COLEMAN, J.; PINTO, P.; ALBERT, P.S.; CAMPHAUSEN, K.; COLEMAN, C.N. Intrarectal amifostine suspension may protect against acute proctitis during radiation therapy for prostate cancer: a pilot study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 65, p. 1008-1013, 2006.

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. **J Surg Res.**, v. 61, p. 395-403, 1996.

SOUZA, M.H.; DE LIMA, O.M. JR.; ZAMUNER, S.R.; FIORUCCI, S.; WALLACE, J.L. Gastritis increases resistance to aspirin-induced mucosal injury via COX-2-mediated lipoxin synthesis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 285, p. G54-G61, 2003.

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

STANDEN, N.B.; QUAYLE, 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. 245, p. 177-180, 1989.

STRUZYŃSKA, L.; CHALIMONIUK, M.; SULKOWSKI, G. The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. **Toxicology**, v. 212, p. 185-194, 2005.

SZABO, S.; NAGY, L.; PLEBANI, M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. **Clin Chim Acta**, v. 206, p. 95-105, 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. 200-202, 1981.

SZOLCSÁNYI, J. Capsaicin, irritation, and desensitization: Neurophysiological basis and future perspectives, in: Green B.G., Mason J.R., Kare M.R. (Eds.), **Chemical Senses**. Vol. 2: Irritation, Marcel Dekker, New York, p. 141-169, 1990.

SZOLCSÁNYI, J.; BARTHÓ, L. Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. **J Physiol Paris**, v. 95, p. 181-188, 2001.

SZOLCSÁNYI, J.; BARTHÓ, L. Impaired defense mechanism to peptic ulcer in the capsaicin-desensitized rat, in: Mózsik Gy., Hänninen O., Jávör T. (Eds.), **Advances in Physiological Sciences**, Vol.29, Gastrointestinal Defense Mechanisms, PergamonPress & Akadémiai Kiadó, Oxford & Budapest, p. 39-51. 1981.

TACHÉ, Y.; RAYBOULD, H.; WEI, J.Y. Central and peripheral actions of calcitonin gene-related peptide on gastric secretory and motor function. **Adv Exp Med Biol**, v. 298, p. 183-198, 1991.

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. **Dig Dis Sci**, v. 39, p. 2536-2542, 1994.

TANNEHILL, S.P.; MEHTA, M.P. Amifostine and radiation therapy: past, present, and future. **Semin Oncol**, v. 23, p. 69-77. 1996.

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.

TEGEDER, I.; NEUPERT, W.; GÜHRING, H.; GEISLINGER, G. Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 292, p. 1161-1168, 2000.

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

TRESKES, M.; NIJTMANS, L.G.; FICHTINGER-SCHEPMAN, A.M.; VAN DER VIJGH, W.J. Effects of the modulating agent WR2721 and its main metabolites on the formation and stability of cisplatin-DNA adducts in vitro in comparison to the effects of thiosulphate and diethyldithiocarbamate. **Biochem Pharmacol.**, v. 43, p. 1013-1019, 1992.

TRIER, J.S.; SZABO, S.; ALLAN, C.H. Ethanol-induced damage to mucosal capillaries of rat stomach. Ultrastructural features and effects of prostaglandin F2 beta and cysteamine. **Gastroenterology**, v. 92, p. 13-22, 1987.

TUYNS, A.J.; PÉQUIGNOT, G.; ABBATUCCI, J.S. Oesophageal cancer and alcohol consumption; importance of type of beverage. **Int J Cancer.**, v. 23, p. 443-447, 1979.

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

UTLEY, J.F.; SEAVER, N.; NEWTON, G.L.; FAHEY, R.C. Pharmacokinetics of WR-1065 in mouse tissue following treatment with WR-2721. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 10, p. 1525-1528, 1984.

VACHA, P.; FEHLAUER, F.; MAHLMANN, B.; MARX, M.; HINKE, A.; SOMMER, K.; RICHTER, E.; FEYERABEND, T. Randomized phase III trial of postoperative radiochemotherapy +/- amifostine in head and neck cancer. Is there evidence for radioprotection? **Strahlenther Onkol.**, v. 179, p. 385-389, 2003.

VALERIOTE, F.; TOLEN, S. Protection and potentiation of nitrogen mustard cytotoxicity by WR-2721. **Cancer Res.**, v. 42, p. 4330-4331, 1982.

VAN DER VIJGH, W.J.; KORST, A.E. Amifostine (Ethyol): pharmacokinetic and pharmacodynamic effects in vivo. **Eur J Cancer**, v. 32, p. S26-S30, 1996.

VAN DER VIJGH, W.J.; PETERS, G.J. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine (Ethyol): preclinical aspects. **Semin Oncol.**, v. 21, p. 2-7, 1994.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Am J Med.**, v.104, p. 2S-8S, 1998.

VIRANUVATTI, V.; KALAYASIRI, C.; CHEARANI, O.; PLENGVANIT, U. Effects of capsicum solution on human gastric mucosa as observed gastroscopically. **Am J Gastroenterol.**, v. 58, p. 225-232, 1972.

VOGELZANG, N.J.; TORKELSON, J.L.; KENNEDY, B.J. Hypomagnesemia, renal dysfunction, and Raynaud's phenomenon in patients treated with cisplatin, vinblastine, and bleomycin. **Cancer**, v. 56, p. 2765-2770, 1985.

WADLER, S.; GOLDBERG, G.; FIELDS, A.; ANDERSON, P.; BEITLER, J.J.; SOOD, B.; HAYNES, H.; RUNOWICZ, C. The potential role of amifostine in conjunction with cisplatin in the treatment of locally advanced carcinoma of the cervix. **Semin Oncol.**, v. 23, p. 64-68, 1996.

WADLER, S.; HAYNES, H.; BEITLER, J.J.; GOLDBERG, G.; HOLLAND, J.F.; HOCHSTER, H.; BRUCKNER, H.; MANDELI, J.; SMITH, H.; RUNOWICZ, C. Management of hypocalcemic effects of WR2721 administered on a daily times five schedule with cisplatin and radiation therapy. The New York Gynecologic Oncology Group. **J Clin Oncol.**, v. 11, p. 1517-1522, 1993.

WAGNER, W.; PROTT, F.J.; SCHONEKAS, K.G. Amifostine: a radioprotector in locally advanced head and neck tumors. **Oncol Rep.**, v. 5, p. 1255-1257, 1998.

WALLACE, J.L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. **Gastroenterology**, v. 112, p. 1000-1016, 1997.

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

WEHBI, M.; SNYDER, R.H.; SARVER, G.; OBIDEEN, K.; YANG, V.W. Acute Gastritis. Disponível em: <<http://www.emedicine.com>>. Ago 3, 2006.

WHITTLE, B.J. Nitric oxide-modulating agents for gastrointestinal disorders. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 14, p. 1347-1358, 2005.

WILSON, D.E.; QUADROS, E.; RAJAPAKSA, T.; ADAMS, A.; NOAR, M. Effects of misoprostol on gastric acid and mucus secretion in man. **Dig Dis Sci**, v. 31, p. 126S-129S, 1986.

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

YUHAS, J.M.; STORER, J.B. Differential chemoprotection of normal and malignant tissues. **J Natl Cancer Inst**, v. 42, p. 331-335, 1969.

ZHUO, M.L.; HUANG, Y.; LIU, D.P.; LIANG, C.C. KATP channel: relation with cell metabolism and role in the cardiovascular system. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, p. 751-764, 2005.