



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

**ANTONIELLA SOUZA GOMES**

**EFEITO PROTETOR DA VIA HEMEOXIGENASE 1/ BILIVERDINA/ CO EM  
MODELOS DE LESÕES GÁSTRICAS EM CAMUNDONGOS – PAPEL DA  
GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (GCS) E DA NO SINTASE (NOS).**

**FORTALEZA – 2009**

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

**ANTONIELLA SOUZA GOMES**

**EFEITO PROTETOR DA VIA HEMEOXIGENASE 1/ BILIVERDINA/ CO EM  
MODELOS DE LESÕES GÁSTRICAS EM CAMUNDONGOS – PAPEL DA  
GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (GCS) E DA NO SINTASE (NOS).**

**FORTALEZA- 2009**

**ANTONIELLA SOUZA GOMES**

**EFEITO PROTETOR DA VIA HEMEOXIGENASE 1/ BILIVERDINA/ CO EM  
MODELOS DE LESÕES GÁSTRICAS EM CAMUNDONGOS – PAPEL DA  
GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (GCS) E DA NO SINTASE (NOS).**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

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

FORTALEZA-2009

G612e Gomes, Antonielli Souza

Efeito protetor da via hemeoxigenase 1/ biliverdina/ CO em modelos de lesões gástricas em camundongos: papel da guanilato ciclase solúvel (GCS) e da NO sintase (NOS)/ Antonielli Souza Gomes. – Fortaleza, 2009.  
200f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Fortaleza, Ceará.

1. Mucosa Gástrica 2. Heme Oxigenase-1 3. Biliverdina I. Souza, Marcellus Henrique Loiola Ponte de (orient.) II. Título.

CDD:616.33

**ANTONIELLA SOUZA GOMES**

**EFEITO PROTETOR DA VIA HEMEOXIGENASE 1/ BILIVERDINA/ CO EM  
MODELOS DE LESÕES GÁSTRICAS EM CAMUNDONGOS – PAPEL DA  
GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (GCS) E DA NO SINTASE (NOS).**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo  
Universidade de Brasília – UNB

---

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha  
Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

---

Prof. Dra. Mirna Marques Bezerra  
Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina de Sobral.

---

Prof. Dra. Gerly Anne de Castro Brito  
Universidade Federal do Ceará – UFC

No passado do poeta que escreveu versos sublimes, há quase certeza que um professor o obrigou a exercitar-se na sintaxe, que o forçou a corrigir varias vezes frases mal escritas, que ralhou com ele quando se desleixava. Na juventude daquele que escreveu uma bela sinfonia houve muito possivelmente uma professora, talvez já velhota, que lhe explicou cem vezes, pacientemente, qual era a forma correta de colocar as mãos quando se sentava ao piano. O poeta e o músico tiveram os seus nomes escritos na História, mas ninguém recorda quem foram os seus mestres. No entanto, há uma beleza imensa nesse passar despercebido, nesse ter rasgado as mãos ao trabalhar nos escuros alicerces de um mundo melhor. Uma beleza que só é apreciada pelas grandes sensibilidades, como são as daquelas pessoas que se dedicaram de corpo e alma à Educação.

Paulo Geraldo

*Dedicatória*

*Dedico este estudo à minha família, em especial, à minha filha Sabrina. Te amo!*

## **AGRADECIMENTOS**

Grande é minha lista de agradecimentos, o que me torna uma pessoa de sorte.

Primeiramente, agradeço a Deus por iluminar meu caminho, pela sua presença constante na minha vida, sem que eu precise pedir, pelo auxílio nas minhas escolhas e me confortar nas horas difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, pelos importantes ensinamentos tanto científicos quanto pessoais, pela amizade e apoio, e a competência com que orientou esta minha tese e o tempo que generosamente me dedicou (no Mestrado e no Doutorado) transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos, com paciência e confiança. Pelo incentivo a minha formação científica que são e serão sempre essenciais na minha formação pessoal e profissional, bem-haja estou-lhe muito, muito grata.

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, sobretudo, o privilégio de haver trabalhado em seu Laboratório (LAFICA) que me deu seu incentivo em momentos diversos e de forma incondicional, contribuindo para a concretização dessa Tese.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, pelo seu auxílio e sua disponibilidade ao ter cedido as drogas para realização dos experimentos iniciais que agora compõem essa Tese.



A Prof. Dra. Gerly Anne de Castro Brito pelo seu incentivo, amizade e pelo amável contributo dos seus ensinamentos e orientação nos experimentos e avaliações histológicas.

A Prof. Dra. Mariana Vale, pela agradável convivência, seu compromisso e dedicação ao LAFICA e pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. Armênio Aguiar Santos, sou imensamente grata pela sua amizade que contribuiu de forma intensa na minha formação e sua disponibilidade em ajudar.

Ao Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá, pela sua amizade e ajuda valiosa nos experimentos de PCR.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, por seus ensinamentos, colaboração e recepção em seus laboratórios.

Aos bolsistas de iniciação científica, especialmente a Samara, Joyce e Gemima, cuja participação foi importantíssima na realização dos experimentos.

Tenho muito a agradecer aos amigos do LAFICA, que me ajudaram, direta ou indiretamente, todos os dias. Não cito nomes para não ser injusta com pessoas que me auxiliaram até onde já cheguei...

Em especial, quero agradecer aos meus colegas Larisse Lucetti, Pedro Marcos, Jand Venes e André Luis, pela ajuda constante, carinho e pela certeza de que após esses anos de convivência deixamos de ser colegas para nos tornarmos amigos, obrigada!

A Maria Silvandira França Pinho (nossa querida Vandinha), pela sua amizade, disposição e dedicação ao LAFICA, sou imensamente agradecida por tanta generosidade e carinho.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, especialmente a Aurea, pela disponibilidade constante em ajudar.

A meus pais, os mais profundos agradecimentos por suas sábias lições de vida e incentivo; sempre repetindo palavras essenciais como: amor, dedicação, compreensão, alegria – infundiram-me a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

A meu esposo Marcelo e a minha filha, Sabrina, que trazem tanta luz e gosto para minha vida, um amor especial. Vocês são a lição mais profunda de dignidade e amor... Ambos souberam compreender as minhas falhas e também as minhas buscas profissionais. Amo vocês!

Ao CNPq, pelo apoio financeiro para a execução desse projeto.

A todos o meu profundo agradecimento.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o efeito protetor da via hemeoxigenase 1 (HO-1)/ biliverdina/ CO em modelos de gastropatia em camundongos e o papel da guanilato ciclase solúvel (GCs) e da NOS constitutiva neste evento. **Métodos:** Protocolo 1: Camundongos foram pré-tratados hemina (indutor da HO-1; 1,3 ou 10mg/Kg, i.p.), biliverdina (produto da HO-1; 1,3 ou 10mg/Kg, i.p.), DMDC (doador de CO; 2,5, 7,5, 12,5 ou 25  $\mu$ mol/Kg, i.p.) ou ZnPP I (inibidor da HO-1; 0,3, 1,0 ou 3,0 mg/kg, i.p.) uma hora antes da administração por gavagem de etanol 50% (hemina, biliverdina, DMDC) ou 25% (ZnPP IX). Em outro grupo, os animais foram pré-tratados com ODQ (12,5 mg/kg, v.o) ou L-NAME (3 mg/Kg, v.o), trinta minutos antes dos tratamentos citados anteriormente. Depois de 1h, os camundongos foram sacrificados e os estômagos removidos para avaliação das lesões gástricas (*Image J*). Protocolo 2: Camundongos foram pré-tratados hemina (3,0 mg/kg), biliverdina (3,0 mg/kg), DMDC (12,5  $\mu$ mol/Kg) ou ZnPP IX (3,0 mg/Kg) uma hora antes da administração de INDO 30 mg/Kg (hemina, biliverdina, DMDC) ou 10 mg/Kg (ZnPP IX). Em outro grupo os animais foram pré-tratados com ODQ (12,5 mg/kg, v.o) ou L-NAME (3 mg/Kg, v.o), trinta minutos antes dos tratamentos citados anteriormente. Três horas depois, os camundongos foram sacrificados e os estômagos removidos para avaliação das lesões gástrica, utilizando um paquímetro digital. Em todos os grupos experimentais, fragmentos da mucosa gástrica foram coletados para determinação da concentração de MDA, GSH e bilirrubina. Outra amostra de tecido foi retirada para análise microscópica e imunohistoquímica. A detecção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10, bem como a atividade de MPO foram avaliados somente na gastropatia por INDO. **Resultados:** O etanol aumentou a expressão de enzima HO-1 e dos níveis de bilirrubina no tecido gástrico. Hemina, biliverdina ou DMDC reduziram a lesão gástrica, os níveis de MDA e o consumo de GSH induzido por etanol 50%. Os parâmetros histológicos, edema, hemorragia e perda de células epiteliais, foram diminuídos na presença de hemina, biliverdina ou DMDC. ZnPP IX amplificou o efeito do etanol 25%, aumentando a lesão gástrica, os níveis de MDA e o consumo de GSH. Os parâmetros histológicos também foram amplificados após o tratamento com ZnPP IX. A concentração de bilirrubina se mostrou elevada apenas na gastroproteção induzida por hemina e biliverdina, mas não pelo DMDC. INDO aumentou a expressão da HO-1 e os níveis de bilirrubina na mucosa gástrica. Hemina, biliverdina ou DMDC reduziram a lesão gástrica, a atividade de MPO, os níveis de MDA e aumentaram a concentração de GSH na gastropatia por INDO. Os parâmetros histológicos, edema, hemorragia, perda de células epiteliais e a presença de células inflamatórias, foram inibidas pela hemina, biliverdina ou DMDC. ZnPP IX amplificou o efeito da INDO aumentando a lesão gástrica, a atividade de MPO, os níveis de MDA e o consumo de GSH. Os parâmetros histológicos também foram amplificados após o tratamento com ZnPP IX. Bilirrubina se mostrou elevada apenas na gastroproteção induzida por hemina e biliverdina, mas não pelo DMDC. Hemina, biliverdina e DMDC diminuíram as concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e aumentaram a IL-10. ODQ e L-NAME reverteram o efeito protetor do DMDC, mas não da biliverdina, na gastropatia induzida por etanol ou INDO. **Conclusão:** A via HO-1/biliverdina/CO participa do processo de defesa da mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol ou INDO. Na gastropatia por etanol, a proteção é dependente da ação antioxidante da bilirrubina e CO. Entretanto, no modelo de gastropatia por INDO, observamos uma ação antioxidante e antiinflamatória. Evidenciamos ainda que o mecanismo de ação gastroprotetor do CO, mas não da biliverdina é dependente da via CO/GMPc/NOS.

Palavras-chave: Lesão gástrica. Hemeoxigenase-1. Biliverdina. Gastroproteção.

## ABSTRACT:

**Objective:** Objective: To evaluate the protective effect of the heme-oxygenase 1 (HO-1)/biliverdin/CO pathway in models of gastropathy in mice, evaluating the role of the soluble guanylate cyclase (GCs) and of the constitutive NOS in this event. **Methods:** Protocol 1: Mice were pre-treated with hemin (HO-1 inducer; 1,3,10 mg/Kg, i.p.), biliverdin (HO-1 product; 1,3 or 10 mg/Kg., i.p.), DMDC (CO donor; 2.5, 7.5, 12.5 or 10  $\mu$ mol/Kg, i.p.) or ZnPP IX (HO-1 antagonist; 0,3, 1 or 3 mg/kg. i.p.), one hour before, gastric damage was induced by ethanol 50% (hemin, biliverdin, DMDC) or 25% (ZnPP IX). In another group, the animals were pre-treated with ODQ (12.5 mg/kg, v.o) or L-NAME (3 mg/Kg, v.o), thirty minutes before of the treatments cited previously. After 1h, the mice were sacrificed and the stomachs removed for evaluation of the gastric lesions (Image J). Protocol 2: Mice were pre-treated with hemin (3 mg/Kg, i.p.), biliverdin (3 mg/Kg., i.p.), DMDC (12,5  $\mu$ mol/Kg) or ZnPP IX (3,0 mg/kg), one hour before of the administration of INDO 30 mg/Kg (hemin, biliverdin, DMDC) or 10 mg/Kg (ZnPP IX). In another group, the animals were pre-treated with ODQ (12.5 mg/kg, v.o) or L-NAME (3 mg/Kg, v.o), thirty minutes before of the treatments cited previously. Three hours after, the mice were sacrificed and the stomachs removed for evaluation of the gastric lesions, utilizing a digital paquimetry. In all of the experimental groups, fragments of the gastric mucous were collected for determination of the concentration of MDA, GSH or bilirubin. Another samples of tissue was removed for microscopic analyzes and HO-1 expression by immunohistochemistry. The detection of the TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 and MPO activity were evaluated only in the INDO gastropathy. **Results:** Ethanol increased the expression of HO-1 and the levels of bilirubin in the gastric tissue. Hemin, biliverdin and DMDC reduced gastric damage, MDA levels and GSH consume in ethanol 50%- induced gastropathy. The histological parameters, edema, hemorrhage and loses of epithelial cells, were diminished in the presence of hemin, biliverdin or DMDC. ZnPP IX amplified the ethanol-induced gastric lesion, increased MDA formation and decreased the GSH concentration in gastric mucosa. The histological parameters also were amplified after the handling with ZnPP IX. Bilirubin concentration was elevated during the protection induced by hemin and biliverdin, but not DMDC. INDO increased the HO-1 expression and the bilirubin levels in the gastric mucosa. Hemin, biliverdin or DMDC reduced the gastric lesion, the MPO activity, and the MDA levels and increased the GSH concentration in the gastropathy INDO- induced. The histological parameters, edema, hemorrhage, loss of epithelial cells and the presence of inflammatory cells, were inhibited by hemin, biliverdin or DMDC. ZnPP IX amplified the effect of the INDO increasing the gastric lesion, the MPO activity, the MDA levels and the GSH consume. The histological parameters also were amplified after the handling with ZnPP IX. Bilirubin was shown elevated during the protection induced by hemin and biliverdin, but not DMDC. Hemin, biliverdin and DMDC diminished the TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  concentrations and increased the IL-10. ODQ and L-NAME completely abolished the DMDC protective gastric effect, but not biliverdin in the gastropathy ethanol or INDO- induced. **Conclusion:** HO-1/biliverdin/CO pathway plays a protective effect against ethanol or INDO-induced gastric damage. In the gastropathy by ethanol, the protection is dependent of the anti-oxidant action by bilirubin and CO. However, in the model of INDO gastropathy, we observe an anti-oxidant and anti-inflammatory action. The mechanism of gastro protective action of the CO, but not of the biliverdin, is dependent of the CO/ NOS/ GMPc pathway.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$  – Alfa

$\beta$  – Beta

5'-AMP – 5'-monofosfato de adenosina cíclico

AINEs – Antiinflamatórios não esteroidais

ANOVA – Análise de variância

BSA – Albumina sérica bovina

cGMP - Monofosfato cíclico de guanosina

COX – Ciclooxigenase

DAB – 3,3' diaminobenzidine-peróxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – deoxinucleotídeos

EDRF – Fator de crescimento derivado do endotélio

ELISA – Ensaio imunoenzimático

EPM – Erro padrão da média

g – Grama

GC – Guanilato ciclase

GMP – Guanosina monofosfato

GSH – Glutathiona reduzida

HTAB - Hexadeciltrimetilamônio

IL – Índice de lesão

i.p. - intraperitoneal

IL-1 – Interleucina 1

IL- 4 – Interleucina 4

IL- 6 – Interleucina 6

IL- 8 – Interleucina 8

IL- 10 – Interleucina 10.

Kg – Kilograma

KCl – Cloreto de potássio

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – Fosfato de Potássio

H. pylori – Helicobacter pylori

HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio

L-NAME – L-nitro-arginina-metil-éster

L-NIL – L-lisina-N-iminoetil

LPS – Lipopolissacarídeo

M - Molar

mg – miligrama

ml – mililitro

mm – milímetro

MPO – Mieloperoxidase

NaCl – Cloreto de potássio

NFkB – Fator nuclear kappa B

NO – Óxido nítrico

NOS - Sintase do óxido nítrico

NOSc - Sintase constitutiva do óxido nítrico

NOSi - Sintase induzida do óxido nítrico

NOSn - Sintase neuronal do óxido nítrico

ODQ – Droga inibidora seletiva da guanilato ciclase solúvel

OMS – Organização mundial de Saúde

OPD – O-fenilenediamine diidrocloreto

PAF - Fator de agregação plaquetária

PBS – Solução tamponada de fosfato

Pg - Picograma

PGE2 – Prostaglandina E2.

PGF1 $\alpha$  - Prostaglandina F1 $\alpha$ .

PGI2 – Prostaglandina I2.

PGs – Prostaglandinas

RNA – ácido ribonucléico

ROS – Espécie reativas de oxigênio

RPM – Rotações por minuto

SH-NP – Grupos sulfidrílicos não protéico

SNAP - S-nitroso-acetilpenicillamina.

SUR – Receptores da sulfoniluréia.

TGI – Trato gastrintestinal.

TNBS – 2,4,6 - trinitrobenzenosulfônico

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose Tumoral  $\alpha$ .

Tris – Hidroximetil aminometano.

$\mu$ L – microlitro.

$\mu$ m – Micromêtro

v.o. – via oral



## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Esquema representativo dos efeitos do consumo agudo e crônico de etanol no estômago. **48**
- FIGURA 2** Esquema ilustrativo dos mecanismos moleculares propostos pelo qual o etanol provoca inflamação e lesão na mucosa gástrica. **49**
- FIGURA 3** Esquema representativo dos vários componentes envolvidos na fisiopatologia da lesão gástrica por AINEs. **54**
- FIGURA 4** Degradação do heme pela enzima hemoxygenase (HO) gerando biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro. Biliverdina é rapidamente convertida em bilirrubina pela biliverdina redutase. O ferro é capturado pela ferritina. Os produtos de degradação do heme pela HO possuem várias propriedades fisiológicas. **56**
- FIGURA 5** Hemina (painel A), biliverdina (painel B) e decacarbonil dimanganês (DMDC, painel C) preveniu a lesão gástrica induzida por etanol 50%. **83**
- FIGURA 6** Avaliação histológica da administração de hemina, um indutor da via da HO-1 (painel B), biliverdina (painel C) e do decacarbonil dimanganês (DMDC, painel D) no modelo de gastropatia por etanol. **86**
- FIGURA 7** Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol. **88**

- Zinco protoporfirin IX (ZnPP IX) , um inibidor da enzima hemeoxigenase 1, aumentou significativamente a lesão induzida por etanol 25% na mucosa gástrica de camundongos. **93**
- FIGURA 8**
- Analise microscópica da administração do zinco protoporfirim IX (ZnPP IX) na gastropatia induzida por etanol 25%. **94**
- FIGURA 9**
- Papel da guanilato ciclase solúvel no efeito gastroprotetor da via HO-1/biliverdina/CO contra lesões induzidas por etanol 50% em camundongos. **100**
- FIGURA 10**
- Papel do da NO sintase no efeito protetor da via HO-1/biliverdina/CO contra lesões induzidas por etanol 50% em camundongos **103**
- FIGURA 11**
- Hemina, um indutor da via da HO-1 (painel A), biliverdina (painel B) e decacarbonil dimanganês (DMDC, painel C) preveniram a lesão gástrica induzida por indometacina (INDO). **106**
- FIGURA 12**
- Avaliação histológica da administração de hemina (painel B), biliverdina (painel C) e do decacarbonil dimanganês (DMDC, painel D) no modelo de gastropatia por indometacina (INDO). **107**
- FIGURA 13**
- Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com INDO. **102**
- FIGURA 14**

- FIGURA 15** Zinco protoporfirin IX (ZnPP IX) aumentou 117  
significativamente a lesão induzida por indometacina na  
mucosa gástrica de camundongos.
- FIGURA 16** Efeito microscópico da administração do zinco 118  
protoporfirin IX (ZnPP IX) na gastropatia induzida por  
indometacina (INDO).
- FIGURA 17** Papel da guanilato ciclase solúvel no efeito gastroprotetor 124  
da via HO-1/biliverdina/CO contra lesões induzidas por  
indometacina (INDO) em camundongos.
- FIGURA 18** Papel da NO sintase no efeito protetor da via HO- 128  
1/biliverdina/CO contra lesões induzidas por indometacina  
(INDO) em camundongos.

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 -** Avaliação microscópica pelos criterios de Laine et al. (1988) **87**  
da administração de hemina (10 mg/kg), biliverdina (10 mg/kg) ou decacarbonil dimanganês (DMDC) (12,5 µmol/kg) na lesão induzida por etanol 50%.
- TABELA 2 –** Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) e **90**  
glutathiona reduzida (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com hemina (10 mg/kg), biliverdina (10 mg/kg) ou decacarbonil dimanganês (DMDC) (12,5 µmol/kg) no curso da lesão gástricas induzidas por etanol 50%.
- TABELA 3 –** Determinação dos níveis de bilirrubina na mucosa gástrica **91**  
de camundongos pré-tratados com hemina (10 mg/Kg), biliverdina (BLV) (10 mg/kg) e decacarbonil dimanganês (DMDC) (12,5 µmol/Kg) no modelo de gastropatia induzida por etanol 50%
- TABELA 4 -** Avaliação microscópica de acordo com os critérios de Laine **95**  
et al. (1988) em camundongos pré-tratados zinco protoporfirin IX (ZnPP IX) (3 mg/Kg) nas lesões induzidas por etanol 25%.

- TABELA 5 –** Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) em camundongos pré-tratados com zinco protoporfirin IX (ZnPP IX) no curso da gastropatia induzidas por etanol 25%. **97**
- TABELA 6 –** Determinação dos níveis de bilirrubina na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com Zinco protoporfirin IX (ZnPP IX), na dose de 3 mg/Kg na gastropatia por etanol 25%. **98**
- TABELA 7 –** Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com ODQ (12,5 mg/kg), 30 minutos antes da administração de decarbonil dimanganês (DMDC) (12,5 µmol/kg) na gastropatia induzida por etanol 50%. **101**
- TABELA 8 –** Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com L-NAME (3,0 mg/kg), 30 minutos antes da administração da hemina (3,0 mg/Kg) ou decarbonil dimanganês (DMDC) (12,5 µmol/kg) na gastropatia induzida por etanol 50%. **104**
- TABELA 9 –** Avaliação microscópica pelos critérios de Laine (1988) de camundongos pré-tratados com hemina (3,0 mg/kg), biliverdina (3,0 mg/kg) ou decarbonil dimanganês

(DMDC) (12,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) no curso da lesão microscópica induzida por indometacina (INDO) (30 mg/Kg).

- TABELA 10 –** Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO), **112**  
malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com hemina (3,0 mg/kg), biliverdina (3,0 mg/kg) ou decacarbonil dimanganês (DMDC) (12,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) no curso da contra lesões gástricas induzidas por indometacina (INDO) (30 mg/Kg).
- TABELA 11 –** Determinação dos níveis de bilirrubina na mucosa gástrica **113**  
de camundongos pré-tratados com hemina (3,0 mg/Kg), biliverdina (3,0 mg/kg) ou decacarbonil dimanganês (DMDC) (12,5  $\mu\text{mol/Kg}$ ) no curso das lesões gástricas induzidas por indometacina (INDO) (30 mg/Kg).
- TABELA 12 -** Determinação da concentração das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e **115**  
IL-10 no tecido gástrico de animais tratados com salina (controle), hemina (3,0 mg/kg), biliverdina (3,0 mg/Kg) ou decacarbonil dimanganês (DMDC) (12,5  $\mu\text{mol/Kg}$ ) durante lesão gástrica induzida por indometacina (30 mg/Kg) em camundongo.
- TABELA 13 -** Avaliação microscópica pelos escores de Laine et al., (1988) **119**  
da mucosa gástrica de camundongos pré-tratados zinco protoporfirin IX (ZnPP IX) (3 mg/Kg) nas lesões induzidas

por indometacina (INDO) (10 mg/Kg).

- TABELA 14 –** Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO), malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com zinco protoporfirin IX (ZnPP IX) (3 mg/Kg) nas lesões gástricas induzidas por indometacina (INDO) (10 mg/kg). **121**
- TABELA 15 –** Determinação dos níveis de bilirrubina na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com Zinco protoporfirin IX (ZnPP IX), na dose de 3 mg/Kg na gastropatia induzidas por indometacina (10 mg/Kg). **122**
- TABELA 16 –** Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO), malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com ODQ (12,5 mg/kg), 30 minutos antes da administração de decarbonil dimanganês (DMDC) (12,5 µmol/kg) na gastropatia induzida por indometacina (INDO) (30 mg/Kg). **125**
- TABELA 17 –** Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO), malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com L-NAME (3,0 mg/kg), 30 minutos antes da administração de hemina (3,0 mg/Kg) ou decarbonil dimanganês (DMDC) (12,5 µmol/kg) na gastropatia induzida por indometacina (30 mg/Kg). **129**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>33</b>
<b>2- REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>36</b>
<b>2.1- LESÃO GÁSTRICA <i>versus</i> GASTROPROTEÇÃO</b>	<b>36</b>
<b>2.2. FATORES PROTETORES DA MUCOSA GÁSTRICA</b>	<b>37</b>
2.2.1. Prostaglandina	37
2.2.2. Muco e bicarbonato	39
2.2.3. Fluxo Sangüíneo da Mucosa gástrica	40
2.2.4. Atividade antioxidante	40
2.2.5. Reconstituição do epitélio gástrico	41
2.2.6. Óxido Nítrico	43
<b>2.3- MODELOS DE LESÃO GÁSTRICA</b>	<b>45</b>
2.3.1- ETANOL E A LESÃO GÁSTRICA	45
<b>2.3.2- LESÃO GÁSTRICA POR AINES</b>	<b>50</b>
<b>2.4. TRATAMENTOS ANTIULCEROGÊNICOS</b>	<b>54</b>
<b>2.5. HEMEOXIGENASE 1/BILIVERDINA/CO</b>	<b>55</b>
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>61</b>
3.1. Objetivos Gerais	61
3.2. Objetivos Específicos	61
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>62</b>
4.1. ANIMAIS	62
4.2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS	62
4.3. DROGAS UTILIZADAS	64
4.4. CORANTES	64



4.5 – SOLUÇÕES	64
4.6. LESÃO GÁSTRICA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS	68
4.7. LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA (INDO) EM CAMUNDONGOS	69
4.8. EFEITO PROTETOR DA VIA HO-1/BILIVERDINA/CO CONTRA A LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS	69
4.9. EFEITO PROTETOR DA VIA HO-1/BILIVERDINA/CO CONTRA A LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA EM CAMUNDONGOS	70
4.10. PAPEL DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (GMP <sub>c</sub> ) NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DO DEACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS	71
4.11. PAPEL DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (GMP <sub>c</sub> ) NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DO DEACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO) EM CAMUNDONGOS	72
4.12. PAPEL DA NO SINTASE NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DO DEACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS	73
4.13. PAPEL DA NO SINTASE NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DO DEACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO) EM CAMUNDONGOS	74

4.14. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS	75
4.15. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS	75
4.16. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BILIRRUBINA NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS	76
4.17. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MIELOPEROXIDASE (MPO) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GASTROPATIA POR INDOMETACINA (INDO)	77
4.18. DOSAGEM DE TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ E IL-10 NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS	77
4.19. ISOLAMENTO DO RNA E REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) DE FRAGMENTOS RETIRADOS DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ETANOL OU INDOMETACINA (INDO)	78
4.20. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS	80
4.21. AVALIAÇÃO POR IMUNOHISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DA ENZIMA HEMEOXIGENASE 1 (HO-1) DE FRAGMENTOS RETIRADOS DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ETANOL 50% OU INDOMETACINA (INDO)	81
4.22. ANÁLISE ESTATÍSTICA	81
<b>5 – RESULTADOS</b>	<b>83</b>
5.1 – MODELO DE GASTROPATIA INDUZIDA POR ETANOL	83
5.1.1 - EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA E DO	83

DECACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA  
INDUZIDA POR ETANOL 50%: CURVA DOSE-RESPOSTA

5.1.2 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE **83**  
CAMUNDONGOS TRATADOS COM HEMINA, BILIVERDINA OU  
DECACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NO MODELO DE LESÃO  
GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL 50%

5.1.3 - EXPRESSÃO DA ENZIMA HEMEOXIGENASE 1 (HO-1) POR **84**  
IMUNOHISTOQUÍMICA E PCR DE FRAGMENTOS RETIRADOS DA  
MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ETANOL  
50% OU SALINA

5.1.4 - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONDIALDEIDO (MDA) E **89**  
DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE  
CAMUNDONGOS PREVIAMENTE TRATADOS COM HEMINA,  
BILIVERDINA OU DECACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA  
GASTROPATIA INDUZIDA POR ETANOL 50%

5.1.5 - AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BILIRRUBINA NO TECIDO  
GÁSTRICO DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM HEMINA,  
BILIVERDINA OU DECACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA  
GASTROPATIA POR ETANOL 50%

5.1.6 - EFEITO DO ZINCO PROTOPORFIRIM IX (ZnPP IX), UM **92**  
INIBIDOR DA ENZIMA HEMEOXIGENASE 1 (HO-1), NA LESÃO  
GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL 25%- CURVA DOSE RESPOSTA

5.1.7 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE **92**  
CAMUNDONGOS TRATADOS COM ZINCO PROTOPORFIRIM IX (ZnPP

IX) NO MODELO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL 50%	
5.1.8 - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONDIÁLDEIDO (MDA) E DOS GRUPOS SUFIDRÍLICOS NÃO PROTÉICOS (GLUTATIONA – GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PREVIAMENTE TRATADOS COM ZINCO PROTOPORFIRIN IX (ZnPP IX) NA GASTROPATIA INDUZIDA POR ETANOL 25%	95
5.1.9 - AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BILIRRUBINA NO TECIDO GÁSTRICO DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM ZINCO PROTOPORFIRIM IX (ZnPP IX) NO MODELO DE GASTROPATIA POR ETANOL 25%	96
5.1.10 - PAPEL DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (GSs) NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL 50%	99
5.1.11 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MALONDIÁLDEIDO (MDA) E DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM ODQ ASSOCIADO AO DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA POR ETANOL 50%	99
5.1.12 - PAPEL DA NO SINTASE NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NO CURSO DA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL 50%	102
5.1.13 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MALONDIÁLDEIDO (MDA) E DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM	102

L-NAME ASSOCIADO À HEMINA, OU DEACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA POR ETANOL 50%	
5.2 – MODELO DE GASTROPATIA POR INDOMETACINA	<b>105</b>
5.2.1 - EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DEACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO)	<b>105</b>
5.2.2 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM HEMINA, BILIVERDINA OU DEACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NO MODELO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO)	<b>105</b>
5.2.3 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA HEMEOXIGENASE 1 (HO-1) POR IMUNOHISTOQUÍMICA NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM INDOMETACINA (INDO)	<b>109</b>
5.2.4 - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MIELOPEROXIDASE (MPO), MALONDÍALDEIDO (MDA) E GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PREVIAMENTE TRATADOS COM HEMINA, BILIVERDINA OU DEACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA INDUZIDA PELA INDOMETACINA (INDO)	<b>109</b>
5.2.5 - AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BILIRRUBINA NO TECIDO GÁSTRICO DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM HEMINA, BILIVERDINA OU DEACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA POR INDOMETACINA (INDO)	<b>110</b>
5.2.6 - DOSAGEM DE TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ E IL-10 NO TECIDO GÁSTRICO DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM HEMINA, BILIVERDINA OU	<b>114</b>

DECACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA POR INDOMETACINA (INDO)	
5.2.7 - EFEITO DO ZINCO PROTOPORFIRIM IX (ZnPP IX) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO)	116
5.2.8 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ZINCO PROTOPORFIRIM IX (ZnPP IX) NO MODELO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO)	116
5.2.9 - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MIELOPEROXIDASE (MPO), MALONDIÁLDEIDO (MDA) E DOS GRUPOS SUFIDRÍLICOS NÃO PROTÉICOS (GLUTATIONA – GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PREVIAMENTE TRATADOS COM ZINCO PROTOPORFIRIN IX (ZnPP IX) NA GASTROPATIA INDUZIDA PELA INDOMETACINA (INDO)	120
5.2.10 - AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BILIRRUBINA NO TECIDO GÁSTRICO DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM ZINCO PROTOPORFIRIM IX (ZnPP IX) NO MODELO DE GASTROPATIA POR INDOMETACINA (INDO)	120
5.2.11 - PAPEL DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (GCs) NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DECACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO) EM CAMUNDONGOS	123
5.2.12 - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MIELOPEROXIDASE (MPO), MALONDIÁLDEIDO (MDA) E DOS GRUPOS SUFIDRÍLICOS NÃO	123

PROTÉICOS (GLUTATIONA – GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM ODQ ASSOCIADO À DEACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO)

5.2.13 - PAPEL DA NO SINTASE NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DEACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO) EM CAMUNDONGOS

5.2.14 - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MIELOPEROXIDASE (MPO), MALONDIÁLDEIDO (MDA) E DOS GRUPOS SUFIDRÍLICOS NÃO PROTÉICOS (GLUTATIONA – GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM L-NAME ASSOCIADO À HEMINA, BILIVERDINA (BLV) OU DEACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO)

**6. DISCUSSÃO** **130**

**7. CONCLUSÕES** **147**

**8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** **148**

**9. ANEXOS** **173**

## 1.INTRODUÇÃO

As doenças do trato gastrintestinal, relacionadas ao consumo excessivo de etanol ou drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs), possuem um importante papel na gastroenterologia clínica, sendo o foco da farmacoterapia atual a descoberta de mecanismos de defesa da mucosa para acelerar a cicatrização/cura destas patologias (CHAMBERLAIN, 1993).

Pacientes que fazem consumo abusivo de AINEs ou etanol possuem uma maior predisposição de vir a ter lesão gástrica hemorrágica aguda (CHAMBERLAIN, 1993). O etanol possui uma toxina entérica que afeta a estrutura e função de vários elementos do trato gastrintestinal além de causar efeitos no sistema nervoso central. No estômago, o etanol aumenta a secreção gástrica de ácido, leva a um stress oxidativo com a depleção de glutathiona reduzida (GSH), influencia a atividade da musculatura e reduz o fluxo sanguíneo, aumentando os riscos de hemorragias e ulcerações (BODE & BODE, 2000; MACMATH TL, 1990; SANTOS & RAO, 2001). Já os AINEs constituem uma das classes de fármacos mais prescritas no mundo. A toxicidade gastrintestinal constitui a maior limitação para o uso dos AINEs. Através de um fenômeno de adaptação, inúmeros produtos químicos podem induzir uma proteção da mucosa gástrica a lesão por AINEs (PESKAR et al., 2002). O conhecimento da fisiopatologia da lesão gástrica por AINEs e etanol, bem como dos mecanismos envolvidos na defesa da mucosa gástrica a agressões externa, contribui para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento e profilaxia destas lesões.

A hemeoxigenase (HO) é uma enzima microssomal que cataliza a degradação do heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina e ferro (ABRAHAM et al.,1988).



HO-1, a forma induzida, é geralmente expressa em condições de stress oxidativo, isquemia e reperfusão, por citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico, endotoxinas e heme, o seu substrato (FUJITA et al., 2001; YACHIE et al., 2003). HO-2 e HO-3 são as formas constitutivas expressa na maioria dos tecidos (MCCOUBREY et al., 1997). A HO e seus produtos estão envolvidos e vários efeitos biológicos. O CO exibe algumas propriedades semelhantes ao NO, incluindo a regulação no tônus vascular, sinalização neuronal, modulação da apoptose e antinocicepção (MCCOUBREY et al., 1997; MORITA et al., 1995; MAINES, 1997; BARANANO et al., 2001) enquanto a biliverdina apresenta um importante efeito antioxidante (STOCKER et al., 2004).

Nos últimos anos, vários estudos vêm demonstrando que a HO-1, heme (seu substrato) e seus produtos CO e biliverdina, são capazes de modular o processo inflamatório. Foi demonstrado que o heme é capaz de estimular a produção de radicais livres e estimular a expressão de moléculas de adesão e a infiltração de neutrófilos para o sítio (NISHIE et al., 1996). Entretanto, pequenas concentrações de heme podem agir como antiinflamatório e citoprotetor através do aumento da expressão da HO-1 e estimulação da formação de HO-1 e seus produtos, como o CO e biliverdina, que foi demonstrado que reduzem a migração, exsudação e liberação de mediadores pró-inflamatórios e a expressão de proteínas de adesão (HAYASHI et al., 1999), sugerindo que a expressão de HO-1 possui efeito antiinflamatório. Estudos recentes demonstraram que o aumento da atividade de HO-1 protege o trato gastrointestinal de diversos tipos de injúria tecidual e melhora o processo inflamatório pela capacidade de inibir a expressão de moléculas de adesão (WANG et al., 2001). O CO e o NO é gerado a partir das enzimas HO-1 e NOS induzida respectivamente, sob circunstâncias de stress ou injúria. Dado a sobreposição nas funções biológicas do CO e do NO, é possível que algumas ações do NO estejam aumentadas pela

indução de HO-1 e conseqüente produção de CO, visto que HO-1 e os CO parecem servir como um mecanismo de feedback negativo, inibindo a atividade dos NOS (KOROLKIEWICZ et al., 2004). Tanto a NOS como HO-1 são induzidas em processos fisiopatológicos e estudos sugerem que CO pode servir tanto para regular, como também, para dar continuidade aos efeitos dos NO. Muitos dos efeitos do CO dependem da ativação da guanilato ciclase, que gera o 3', 5'-monofosfato guanosinida cíclico (GMPc) e da modulação da MAPK, que são moléculas sinalizadoras importantes presente no processo inflamatório. Os efeitos da GMP cíclico mediados pelo CO incluem a neurotransmissão, a inibição da agregação plaquetária e da proliferação celular e ações anti-apoptótica, antiinflamatória e citoprotetora (RYTER et al., 2004). Entretanto, faltam estudos avaliando um possível efeito protetor da via HO1/biliverdina/CO nos processos inflamatórios induzidos pelo diversos estímulos como, por exemplo, etanol e indometacina no estômago.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA.

### 2.1- LESÃO GÁSTRICA *versus* GASTROPROTEÇÃO.

Constantemente, a superfície da mucosa do estômago é exposta a estímulos lesivos como drogas, toxinas bacterianas, proteínas heterólogas e suco gástrico. 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 consequência final o desenvolvimento de lesões na mucosa e o aparecimento de doenças como, por exemplo, gastrite, úlcera péptica.

Inicialmente, acreditava-se que as lesões gástricas resultavam da ação do ácido clorídrico e da pepsina naturalmente presentes no estômago (WALLACE, 2001). Com a evolução dos estudos foi observado que, além dos fatores agressores endógenos (ácido, pepsina, e bile), essa patologia estava associada a outros fatores exógenos predisponentes relacionados a condições de vida tais como: estresse, fumo, álcool, uso contínuo de AINES (60 % do número de casos), ingestão de determinados alimentos, presença do agente infeccioso *Helicobacter pylori* e predisposição genética, os quais atuariam conjuntamente reduzindo a defesa da mucosa gástrica (WALLACE, 2001).

A lesão gástrica atualmente é definida como um desequilíbrio entre a ação produzida pelos agentes agressores, que compreendem aos agentes químicos que podem ser endógenos (HCl, pepsina) ou exógenos, como etanol e os AINES, e a capacidade da mucosa gástrica em resistir à agressão através dos elementos defensivos existentes, como síntese de prostaglandinas citoprotetoras, muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo e motilidade gástrica (KONTUREK et al., 1998; PESKAR & MARICIC, 1998; CALAM & BARON, 2001).

A exacerbação da secreção ácida no estômago é nociva à mucosa gástrica (WOLFE et al., 2003); entretanto, sua regulação não deve ser considerada como a principal responsável pela lesão da mucosa do estômago. Esse fato levou ao estudo e descoberta da bactéria *Helicobacter pylori*, um bacilo gram negativo que possui a capacidade de colonizar o muco produzido pela mucosa gástrica sendo considerados uma das principais causas da úlcera péptica, linfoma gástrico e adenocarcinoma gástrico. Entretanto, já foi demonstrado também que esta bactéria pode estar presente na mucosa de indivíduos sadios que podem ou não desenvolver lesões ulcerativas (SUERBAUM & MICHETTI, 2002).

Desse modo, vários mecanismos estão implicados na patogênese das lesões gástricas, agindo sinergicamente ou não na produção das lesões. Assim, o aumento da secreção ácida gástrica, pepsina, diminuição do fluxo sanguíneo, supressão de PG endógena, inibição do crescimento e proliferação celular da mucosa, alteração da motilidade gástrica, presença de agentes infecciosos e presença de radicais livres são alguns dos mecanismos envolvidos na ulcerogênese (WOLFE & SOLL, 1988; LEWIS & HANSON, 1991; HIRSCHOWITZ et al., 1995) e se constituem alvo de ação terapêutica.

## **2.2. FATORES PROTETORES DA MUCOSA GÁSTRICA.**

### **2.2.1. Prostaglandina.**

As prostaglandinas (PGs) estão envolvidas em uma série de processos fisiológicos no estômago, incluindo secreção de ácido, produção de muco e fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (ROBERT et al., 1985). Prostaglandinas endógenas são geradas a partir do ácido aracdônico. Três isoenzimas de ciclooxigenases (COX), COX-1 (Vane, 1994), COX-2 (XIE et al., 1991) e, recentemente, COX-3 (CHANDRASEKHARAN et al., 2002) têm

sido descritas como catalisadores da conversão do ácido aracônico para a prostaglandina endoperóxido H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), a reação chave para biossíntese das prostaglandinas, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$  e TX<sub>2</sub> (PELEG et al., 2002). COX-1 é expressa, de modo constitutivo, em muitos tecidos. Por outro lado, níveis de COX-2 são usualmente baixos ou não-detectados em condições basais (KARGMAN et al., 1996), mas aumentam rapidamente sobre influências de estímulos pró-inflamatórios ou mitogênicos (CATELLA-LAWSON et al., 1991). COX-3 é expressa no córtex cerebral de cães e em baixas quantidades em outros tecidos. Em humanos, a COX-3 também é expressa no córtex cerebral e no coração (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). PGs modulam o fluxo sanguíneo e a secreção de muco devido à expressão da isoforma constitutiva da COX-1. Por outro lado, a PG que tem sua produção induzida durante o processo da inflamação é derivada COX-2 (XIE et al., 1991).

Foi estabelecido que a supressão da síntese de PG no estômago, através da inibição da COX, é o componente chave para o mecanismo básico de lesões no TGI associado ao uso de AINEs (VANE et al., 1994). O efeito biológico dos produtos da COX, PGs, é mediado por receptores de membranas específicos, denominados receptores EP, que são acoplados a proteínas-G de membrana, ligadas a diferentes vias de transdução de sinal intracelular (SUGIMOTO et al., 2000).

PG exerce sua gastroproteção, por aumentar a secreção de muco e bicarbonato, manter o fluxo sanguíneo da mucosa, e aumentar a resistência de células epiteliais contra danos causados por citotoxinas (HAWKEY & RAMPTON, 1985). Um dos mecanismos pelo qual a PG pode causar diminuição da resposta inflamatória e dano na mucosa é através da modulação da atividade de imunócitos na mucosa. PGE<sub>2</sub> é um potente supressor do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) liberado por macrófagos. Entretanto, pesquisadores

demonstraram que PGE2 inibiu a liberação de fator de agregação plaquetária (PAF), histamina e TNF- $\alpha$  de células na mucosa intestinal. PGs regulam, também, a liberação de outras citocinas como IL-1 $\beta$  dos macrófagos (REMICK et al., 1986) e reduzem a liberação do leucotrieno LTB4 dos neutrófilos (HAM et al., 1983).

### 2.2.2. Muco e bicarbonato.

A mucosa gástrica produz fatores degradantes como: ácido gástrico e enzimas proteolíticas. Para manter a integridade da mucosa, um sistema de defesa efetivo é necessário. A primeira linha de defesa contra o ácido é a barreira do muco que vem sendo investigada por vários grupos de estudo (PHILLIPSON et al., 2002).

O epitélio gástrico é recoberto por uma contínua camada de muco gástrico o qual adere na superfície da mucosa. Esse muco aderido juntamente com o bicarbonato secretado pelo epitélio serve como uma barreira contra a autodigestão causada pelo ácido e pepsina (ALLEN & FLEMSTROM, 2005).

O muco é um importante fator protetor para a mucosa gástrica, o qual se apresenta de forma viscosa, elástica e aderente na forma de um gel transparente composto por 95% de água e 5% de glicoproteína, que recobre a superfície da mucosa gastrointestinal. O muco é capaz de agir como antioxidante e pode reduzir danos da mucosa promovidos por radicais livres (REPETTO et al., 2002). O muco gástrico é composto por glicoproteínas com atividade antioxidante, pois estes açúcares são potentes seqüestradores de espécies reativas de oxigênio (MOJZIS et al., 2000). A secreção do muco gástrico é controlada por vários fatores em diferentes vias. Prostaglandinas (PGE2) e secretina, as quais são inibidoras da secreção ácida, estimulam a secreção de muco (TANI et al., 1997).

Neurotransmissores, autacóides e hormônios também medeiam à secreção de muco (FORTNER & FORTNER, 1994).

### 2.2.3. Fluxo Sangüíneo da Mucosa gástrica.

Um dos papéis do fluxo sanguíneo é suprir de oxigênio, nutrientes e hormônios a mucosa gástrica, além de participar na regulação da saída do ácido, produção de muco, secreção de bicarbonato e remoção dos produtos incluindo a retrodifusão de íons hidrogênio; assim, o fluxo sanguíneo contribui substancialmente para a manutenção fisiológica da integridade da mucosa. A redução do fluxo sanguíneo está envolvida na fisiopatologia das lesões da mucosa gástrica causadas por stress, etanol e AINES (KAWANO et al., 2000). A microcirculação é importante para a defesa da mucosa e é modulada pelo sistema nervoso e por mediadores inflamatórios. Difusão de ácido ou toxina na mucosa resulta em elevação crítica do fluxo sanguíneo mediada por neurônio sensorial aferente, limitando danos e facilitando a reparação (WALLACE et al., 2001).

### 2.2.4. Atividade antioxidante.

Radicas livres derivados do oxigênio (ROS) estão envolvidas em vários eventos patológicos incluindo úlceras e inflamação gastrointestinal (YOSHIDA et al., 1995). ROS gerados pelo metabolismo do ácido aracdônico, macrófagos e neutrófilos, podem contribuir para danos causados na mucosa gástrica (ROSEN & ROGERS, 1990). Os sequestradores de ROS são utilizados para proteger a mucosa gástrica do dano oxidativo e acelerar a cicatrização de úlceras. ROS estão envolvidas nos mecanismos de reações inflamatórias ou atuam como segundos mensageiros para manter diversas funções celulares

(BLAKE et al., 1995). Assim, o equilíbrio entre a formação e a remoção das ROS no organismo deve ser regulado de forma que as reações e processos metabólicos dependentes das mesmas possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia das células (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1990). O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos, principalmente a glutathiona reduzida (GSH), ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular (GUTTERIDGE, 1992). Em condições normais, a concentração destas espécies dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que as removem, ou impedem sua formação. Estes radicais tendem a ser eliminados do organismo pelo conjunto das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSHx), glutathiona redutase (GSHR) e pela catalase (CAT) (YOSHIDA et al., 1995).

#### 2.2.5. Reconstituição do epitélio gástrico.

O estômago possui várias formas de se proteger quando exposto continuamente a altas de ácido; uma das estruturas mais importantes é o epitélio gástrico. Ele é freqüentemente renovado, sendo as células “velhas” deslocadas em direção ao lúmen. O epitélio gástrico humano renova-se completamente a cada 2-4 dias. A habilidade em permitir que as células velhas sejam repostas por células mais jovens, sem quebra significativa da barreira, é atribuída a um processo de extensão celular, ou seja, as células vizinhas gradualmente “apertam” as células envelhecidas na base (WALLACE, 1997). O termo “reconstituição” refere-se ao processo de reparo epitelial da mucosa, que envolve migração rápida de células cicatrizantes aos locais lesionados na base da membrana



desprotegida. As células gástricas estão ligadas à membrana basal da célula epitelial e este local é bastante sensível aos danos induzidos por ácido (PAIMELA et al., 1998). A cicatrização na mucosa na úlcera gástrica requer reconstituição da estrutura glandular epitelial (re-epitelização), restauração da lâmina própria incluindo uma rede microvascular na mucosa, nervos e células de tecidos conectivos (MILANI & CALABRO, 2001).

A cicatrização das úlceras é acompanhada de um aumento do fluxo sanguíneo gástrico na área da úlcera e por um significativo aumento de gastrina plasmática e citocinas próinflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Foi encontrado que a hipergastrinemia, que ocorre durante o período anterior à cicatrização da úlcera, pode ser atribuída à supressão da acidez gástrica e expressão de fatores de crescimento os quais controlam a proliferação celular e também exibem atividade antissecretora (BRZOZOWSKI et al., 2001). A mucosa gástrica situada na margem da úlcera forma a “zona de cicatrização”; as glândulas dessa região começam a dilatar e as células de revestimento dessas glândulas sofrem diferenciação; ocorre ainda ativação do fator de crescimento epidermal e a proliferação celular é assim ativada. Esse processo é iniciado após três dias da implantação da úlcera e é essencial para cicatrização (MILANI & CALABRO, 2001).

O maior estímulo para a divisão, migração, proliferação celular e re-epitelização da úlcera é dado por fatores de crescimento. Esses fatores produzidos localmente ativam proliferação e migração celular epitelial. A re-epitelização é um processo essencial porque a barreira epitelial protege continuamente a mucosa contra danos mecânicos e químicos. Esses fatores de crescimento promovem a proliferação e migração de células epiteliais para a lesão, levando à re-epitelização e maturação das glândulas. A angiogênese (formação de microvasos) facilita a remodelação do tecido por liberar oxigênio e nutrientes. Células inflamatórias são substituídas por fibroblastos e microvasos na fase final da cicatrização

(LEUNG et al., 2003). Assim a angiogênese é importante para o reparo tanto de dano agudo da mucosa quanto crônica durante a cicatrização de úlcera gastroduodenal (MALARA et al., 2005).

#### 2.2.6. Óxido Nítrico.

A descoberta do NO como um agente de sinalização celular foi um dos mais importantes acontecimentos na fisiologia humana dos anos 80-90. Até o momento, três tipos de NOS foram identificadas: duas isoformas constitutivas, sendo uma endotelial (NOS endotelial, eNOS) e uma neuronal (NOS neuronal, nNOS), que estão envolvidas na liberação de NO em condições normais, e uma NOS induzível que não é expressa constitutivamente, sendo liberada em grandes quantidades nas reações inflamatórias (MONCADA et al., 1991). Em condições fisiológicas normais, o NO liberado pelos nervos não- adrenérgicos e não-colinérgicos (NANC) ou o NO liberado do endotélio se liga a um componente heme da guanilato ciclase solúvel, ativando-a. Essa enzima induz a síntese de um mensageiro intracelular, a guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP) (MORELAND et al., 1999). Existem 2 classes de enzimas guanilato ciclasses (GC), ambas capazes de formar cGMP a partir do GTP intracelular: a primeira é chamada de guanilato ciclase particular (pGC) que são moléculas receptoras ligadas particularmente a membrana, possuindo um domínio de ligação do ligante extracelular, um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático; a segunda forma da GC é chamada de guanilato ciclase solúvel (sGC) expressa praticamente em todos os tipos celulares, sendo uma enzimas citosólica contendo um grupo heme que medeia sua ativação pelo óxido nítrico. (KRUMENACKER et al., 2004).

No estômago, o NO possui um importante papel na prevenção e reparo de injúrias no trato gastrintestinal (TGI), participando no controle da produção de muco e secreção de bicarbonato no TGI, na regulação do fluxo sanguíneo capilar da parede gastrintestinal, além de atuar como agente citoprotetor, antiinflamatório e como complemento aos efeitos protetores das prostaglandinas no estômago (MUSCARA & WALLACE, 1999). Whittle et al. também verificaram que o NO reduz efetivamente a injúria na mucosa gástrica provocada por agentes químicos, como o etanol, além de facilitar a cicatrização do tecido lesado (WHITTLE et al., 1995). Wallace também propôs que o NO seria um importante mediador na defesa da mucosa gástrica, mas paradoxalmente, em várias situações, poderia contribuir para a lesão da mucosa. A presença de NO em baixas concentrações está associada aos efeitos benéficos no TGI, enquanto o NO em altas concentrações pode induzir a formação de radicais derivados do nitrogênio, que são tóxicos para várias linhagens celulares (WALLACE & MILLER et al., 2000). O NO é responsável pela modulação de alguns componentes gerais de defesa da mucosa como o fluxo sanguíneo gástrico e secreção de muco (WALLACE & MILLER, 2000). Entretanto, foi demonstrado que o NO produzido pela ação da iNOS está envolvido na lesão gástrica induzida por indometacina (SOUZA et al., 2004) e outras desordens inflamatórias intestinais (WHITTLE et al., 1995). Assim, o desenvolvimento de drogas que aumentam a atividade da cNOS ou a liberação de NO por esta enzima pode ter um importante papel protetor na defesa da mucosa contra injúrias diversas.

## 2.3- MODELOS DE LESÃO GÁSTRICA.

Os modelos experimentais de indução de lesões gástricas agudas atuam por diferentes mecanismos ulcerogênicos e representam o primeiro passo para determinar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de determinadas substâncias (HIRUMA-LIMA et al., 2000). A atividade anti-úlcerosa de uma substância desconhecida pode ser determinada em animais experimentais frente a três modelos agudos: indução de lesões gástricas por medicamentos (ácido acetil salicílico ou indometacina), indução de lesões gástricas por estresse, ou indução de lesões gástricas por etanol. Tais modelos são os mais utilizados porque representam os agentes etiológicos mais comuns envolvidos na patologia das lesões gástricas (EMIM et al., 1994).

### 2.3.1- ETANOL E A LESÃO GÁSTRICA

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

O etanol é conhecida como uma toxina entérica necrotizante que causa injúria na mucosa gástrica, e a ingestão excessiva de etanol pode resultar em gastrite, caracterizada por edema na mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células

inflamatórias (GUSLANDI, 1987). O etanol absoluto rapidamente promove a formação de bolhas enantemáticas na mucosa gástrica, sendo devido a uma reação inflamatória aguda que provoca como característica comum, um aumento na permeabilidade vascular (SZABO et al., 1985).

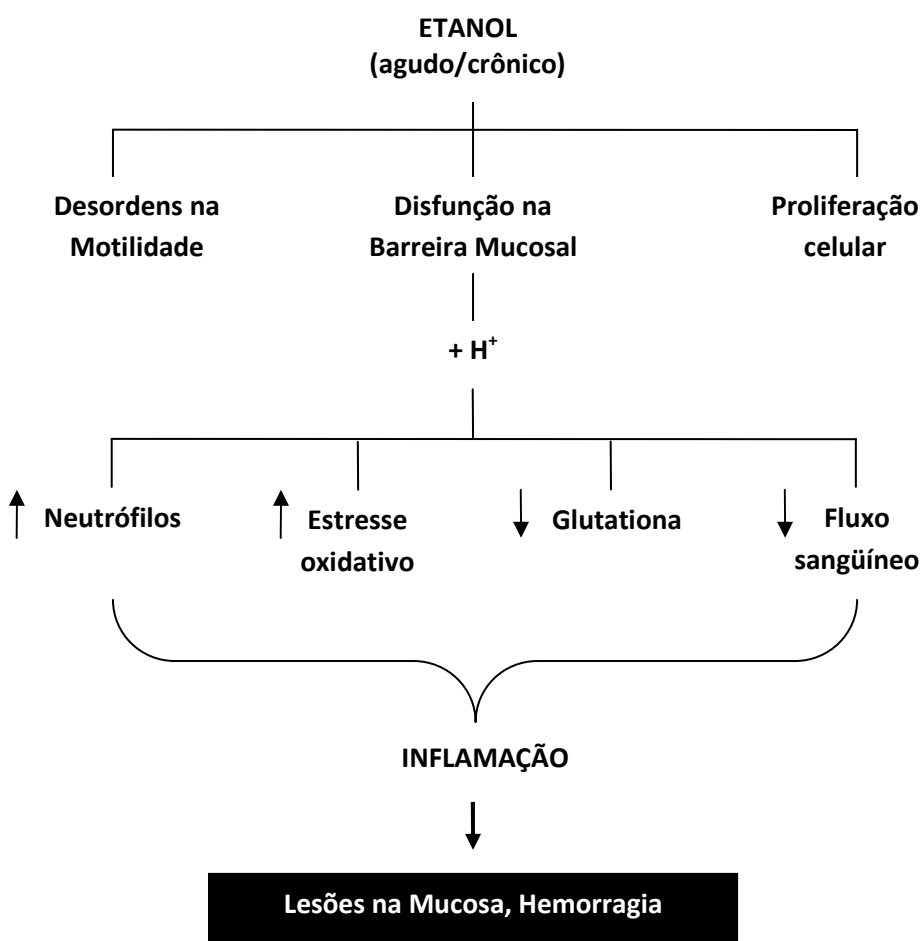
No estômago o etanol interfere na secreção de ácido gástrico, um efeito possivelmente mediado pela histamina e gastrina. A barreira da mucosa é a principal proteção da mucosa gástrica contra o ácido gástrico e o etanol em altas concentrações aumenta a permeabilidade epitelial como consequência de mudanças no potencial celular, causando re-difusão de íons  $H^+$  (DAVENPORT, 1967; DAVENPORT, 1969). No estômago, o etanol, também causa depleção dos grupos sulfidrilas, sobretudo o GSH, que são necessários para estabilização das membranas celulares, bem como na eliminação de radicais livres. Ainda no estômago, o etanol reduz o fluxo sanguíneo, provocando estase gástrica, congestão capilar e aumento da permeabilidade vascular, aumentando os riscos de hemorragias e ulcerações, associados às injúrias macroscópicas e histológicas na mucosa (BODE & BODE, 2001; MACMATH, 1990; SANTOS & RAO, 2001).

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 podem levar a formação de mais necrose na mucosa. Alguns produtos do metabolismo do ácido araquidônico têm sido implicados na patogênese da injúria gástrica causada por etanol (PESKAR et al, 1986; SAMONINA et al., 2004). Fisiopatologicamente, as lesões na mucosa provocadas pelo etanol podem ser mediadas ou moduladas, diretamente ou indiretamente, por várias moléculas celulares, tais como as ciclooxigenases (COX), lipoxigenases, diversas citocinas, citocromo P450 2E1,

tromboxanos e radicais livres derivados do oxigênio (TARNAWSKI et al, 1988; ROBERT et al, 1979). Foi verificado que o etanol em baixas concentrações (menos de 10%) causa uma adesão, dose-dependente, de neutrófilos com conseqüente dano celular no epitélio gástrico. Contudo, em altas concentrações o etanol provoca lesões na mucosa gástrica independente de neutrófilos. Este último efeito deve-se a lesões nos microvasos e diminuição do fluxo sanguíneo gástrico (KVIETYS et al, 1990; SZABO et al, 1985).

O etanol também causa depleção de muco, possivelmente por mobilizar os mucopolissacarídeos da mucosa para o lúmen, reduzindo a capacidade secretória de muco do estômago, contribuindo assim, para a formação das lesões (CHO et al., 2001; ISHIHARA et al., 1988). A liberação de muco em resposta a aplicação de agentes irritantes possui um papel importante no reparo do epitélio e no processo de restituição. Alguns autores demonstraram que o óxido nítrico e as prostaglandinas são capazes de aumentar a secreção de muco no estômago (CHO et al., 2001).

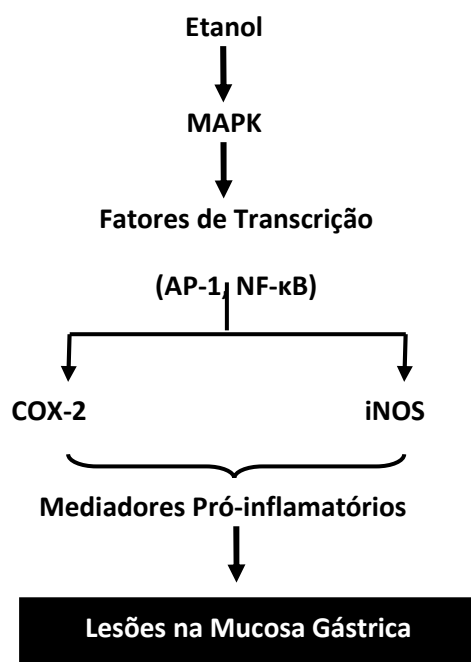
Com base nos conhecimentos produzidos, Siegmund et al. (2002) propôs um esquema para representar os efeitos agudos e crônicos do etanol na mucosa gástrica (Figura 1).



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

O etanol também atua como um agente pró-inflamatório, ativando diversos fatores de transcrição e causando indução do mRNA da COX-2 e indução da iNOS (figura 2). A COX é uma enzima chave na biosíntese das prostaglandinas. A isoforma constitutiva da COX (COX-1) é responsável pela manutenção da proteção gastrointestinal, enquanto a isoforma induzível (COX-2) é considerada um mediador dos processos inflamatórios. A COX-2 produz diversas prostaglandinas derivadas do ácido araquidônico, possuindo um papel crucial na mediação de diversas respostas patofisiológicas (LEE et al, 2005). Segundo Lee et al. o etanol promove a ativação dos dois maiores fatores de transcrição das

células eucarióticas, ou seja, do AP-1 e NF- $\kappa$ B, que induzem a formação de COX-2. Além disso, o álcool causa fosforilação da MAPK p38, que está relacionada a mudanças na transcrição de genes relacionados à inflamação (Figura 2). Outros investigadores demonstraram que ERK 1/2, Egr-1, COX-2 e caspase-3 estão envolvidas nas lesões gástricas provocadas pelo etanol, por um mecanismo dependente de TNF- $\alpha$  (WU & CEDERBAUM, 2003; KISHORE et al, 2002; SIMONYI et al, 2002; NANJI et al, 2003). Ao contrário do que se imaginava, a PGE<sub>2</sub> não protege a superfície das células mucosas da injúria provocada por etanol, mas previne das lesões necróticas. Estudos histológicos mostraram que a PGE<sub>2</sub> possui efeitos citoprotetores contra o etanol, especialmente nas células parietais (SCHMIDT & MILLER, 1988). Foi demonstrado que o álcool em baixas doses provoca citoproteção adaptativa, com participação dos componentes do sistema nervoso autônomo, reduzindo o dano macroscópico provocado por doses mais altas de etanol no estômago, mas não havendo melhora microscópica (KO & CHO, 1998).



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



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

### **2.3.2- LESÃO GÁSTRICA POR AINES.**

Os AINEs são hoje considerados como uma causa estabelecida de úlcera péptica, podendo ocorrer após administração oral ou sistêmica das drogas e com praticamente todos os antiinflamatórios (SINGH et al., 1996). Acredita-se que AINEs promovem lesão gastroduodenal por dois mecanismos independentes, ou seja, diretamente por efeito tóxico direto, em nível epitelial, sobre os mecanismos de defesa da mucosa gastroduodenal, resultando em aumento da permeabilidade celular, inibição do transporte iônico e da fosforilação oxidativa, e, sistemicamente, enfraquecendo os mecanismos de defesa através da inibição da cicloxigenase, enzima chave na síntese das prostaglandinas (WALLACE, 2000). Desta forma, os AINEs causam uma redução significativa nos teores de prostaglandinas das mucosas. Sabe-se que as prostaglandinas, especificamente a PGI<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>, protegem a mucosa gástrica através de seus efeitos estimulantes sobre a produção de muco e secreção de bicarbonato, enquanto aumentam o fluxo sangüíneo mucoso e reduzem *turnover* celular (WALLACE, 2000).

No início da década de 1990, foi estabelecida a presença de pelo menos duas isoformas da COX, denominadas COX-1 e COX-2 (XIE et al., 1991; VANE et al., 1994). Apesar de apresentarem a mesma função, pesos moleculares semelhantes e similaridade na seqüência de aminoácidos, estas isoenzimas são codificadas por genes diferentes e apresentam modelos de expressão também diferentes (HALTER et al., 2001). A COX-1, também chamada de constitutiva está presente em grande quantidade na maioria dos tecidos e de fundamental importância na proteção da mucosa gástrica, enquanto a COX-2, chamada de indutiva, aparece em quantidades baixas sob condições basais, mas sua expressão é induzida por estímulos inflamatórios como fatores de crescimento (FC), citocinas e injúria tissular (XIE et al., 1991; WALLACE, 1997).

A organização mundial da saúde classifica os AINEs seletivos para COX2 em dois grupos. O primeiro é chamado de grupo dos coxibs representados pelo rofecoxib, celecoxib entre outros (SCOTT & LAMB, 1999). O segundo grupo é formado por AINEs que demonstram serem seletivos para isoenzima indutiva. Fazem parte deste grupo a nimesulida, meloxicam e nalbumetona. Essas drogas demonstraram uma certa habilidade em não alterar a síntese de PG no estômago, reduziram a incidência de lesão sobre a mucosa do TGI e diminuíram a anemia originada por sangramento gástrico (HAWKEY, 2001).

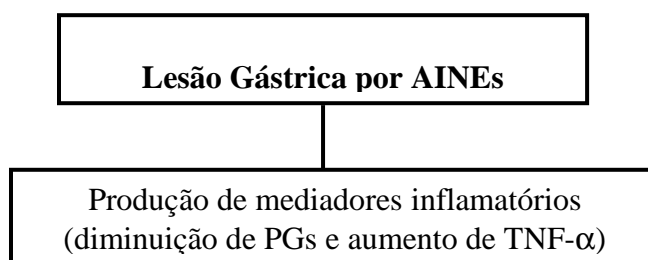
Apesar de alguns estudos demonstrarem a baixa incidência de efeitos lesivos sobre a mucosa gástrica de humanos induzidos por inibidores seletivos para COX-2, estudos realizados em ratos têm demonstrado que a COX-2 desempenha um papel importante na proteção da mucosa gástrica. Brzozowski et al. demonstraram que inibidores seletivos da COX-2 pioraram a lesão gástrica por isquemia - reperfusão (BRZOZOWSKI et al., 1999). Wallace e colaboradores mostraram que um inibidor seletivo da COX-1 (SC-560) reduziu

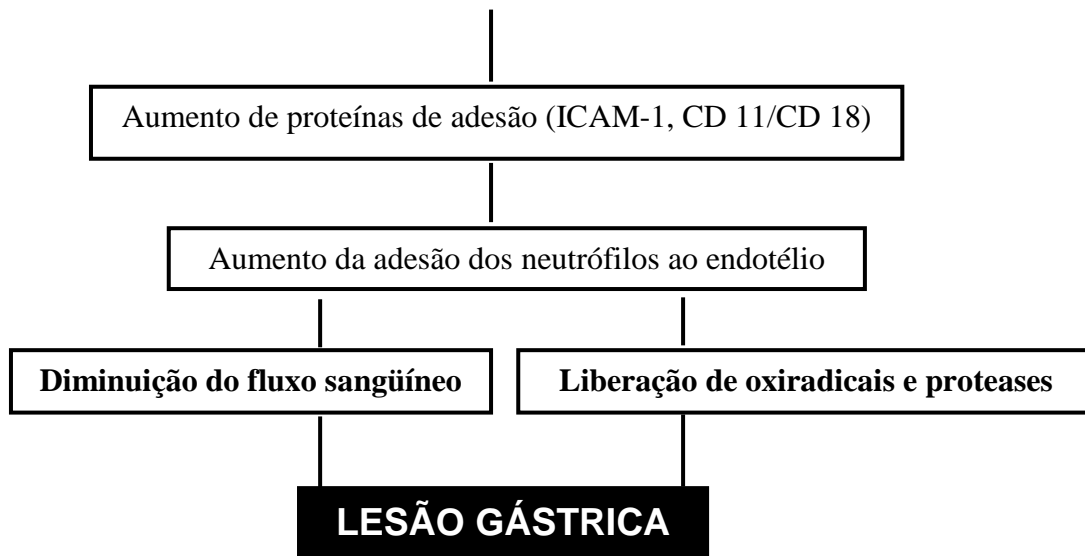
o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, sem alterar a adesão de leucócitos nas vênulas mesentéricas ou causar lesões gástricas. Por outro lado, um inibidor seletivo da COX-2 (celecoxib) causou um aumento da adesão de leucócitos nas vênulas mesentéricas, sem alterar fluxo sanguíneo na mucosa gástrica ou causar lesões gástricas. Somente com a administração concomitante de inibidores seletivos para COX-1 e COX-2 foi possível desencadear lesões gástricas (WALLACE et al., 2000). Ademais, Konturek et al. demonstraram que durante a adaptação da mucosa gástrica à aspirina ocorre um aumento da expressão de COX-2, num mecanismo compensatório (KONTUREK et al., 1998). Foi observado que camundongos *Knockout* para COX-1 desenvolve erosões gástrica por indometacina, um dos mais potentes AINEs, mostrando que outros mecanismos além da inibição da síntese de PGs, podem estar envolvidos nesse fenômeno (LANGENBACH, 1995). Recentemente, Miyake e colaboradores observaram que no curso de uma reação inflamatória gástrica ocorreu um aumento da expressão de COX-2 e uma adaptação da mucosa a lesão por etanol (MIYAKE et al., 2002). Souza e colaboradores demonstraram que o efeito protetor da gastrite por iodoacetamida em ratos foi inibido pelo uso do rofecoxib (SOUZA et al., 2003).

Há vários anos, já se conhecia a capacidade dos AINEs em reduzir o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (KITAHORA et al., 1987; GANA et al., 1986). Entretanto, o conhecimento da existência da lesão no endotélio vascular decorrente da administração dos AINEs é relativamente recente. Este tipo de lesão é semelhante à lesão gástrica observada em modelos de isquemia - reperfusão, onde neutrófilos tem um papel importante (WALLACE, 1997). Em 1993, Wallace et al. desenvolveram os primeiros trabalhos demonstrando o papel dos neutrófilos na gênese da lesão gastrintestinal por AINEs (WALLACE et al., 1993). Eles mostraram que a indometacina, um dos antiinflamatórios não esteroidais mais potentes, foi capaz de desencadear um aumento no número de neutrófilos aderidos ao endotélio e que a neutropenia induzida por metotrexate ou

pelo soro anti-neutrofílico inibiram a lesão gástrica induzida por AINEs (WALLACE et al., 1990). Em 1991, o mesmo grupo mostrou que o uso de anticorpos monoclonais contra a subunidade  $\beta$  do complexo de proteínas de adesão CD11/CD18 inibiu a lesão causado por AINEs (WALLACE et al., 1991). Assim, Morise et al. demonstraram que a expressão de proteínas de adesão endoteliais, ICAM-1 e P-selectina, estavam aumentadas no modelo de gastropatia induzida por AINEs (MORISE et al., 1998) e que camundongos deficientes para CD18 ou ICAM-1 ou P-selectina apresentaram uma lesão gástrica menor do que os animais não deficientes, demonstrando, assim, a importância da expressão destas proteínas de adesão na gênese da lesão gástrica por AINEs (MORISE et al., 1999).

Acredita-se que o TNF- $\alpha$  seja um outro mediador importante na gastropatia induzida por AINEs. Foi demonstrado que a inibição da síntese de prostaglandinas por AINEs é capaz de aumentar a produção de TNF- $\alpha$  (UTSUNOMIYA et al., 1994; MARTICH et al., 1991; GONCALVES DE MORAES et al., 1996). Santucci et al. demonstraram que drogas responsáveis pela diminuição da produção de TNF- $\alpha$  protegem a mucosa gástrica e previnem a infiltração de neutrófilos induzidas pela administração de indometacina, e substâncias que aumentam a produção de TNF- $\alpha$  provocam o aumento tanto da lesão gástrica quanto da infiltração de neutrófilos induzidos pela indometacina (SANTUCCI et al., 1995). Recentemente, Souza et al. demonstraram em um modelo de lesão gástrica por indometacina em camundongos, que o tratamento com fucoidina reduziu a lesão gástrica e a infiltração de neutrófilos induzidos por indometacina (SOUZA et al., 2004). Com base nos conhecimentos produzidos, Wallace, propôs um esquema para representar os eventos envolvidos na fisiopatologia da lesão gástrica induzida por AINEs (Figura 3).





**FIGURA 3** – Esquema representativo dos vários componentes envolvidos na fisiopatologia da lesão gástrica por AINEs (WALLACE, 1997).

#### 2.4. TRATAMENTOS ANTIULCEROGÊNICOS.

As soluções terapêuticas, durante séculos, foram sempre a de neutralizar o conteúdo gástrico de ácido clorídrico utilizando antiácidos, dieta alimentar ou cirurgia. Tal panorama só foi modificado no início dos anos 70 onde os receptores de histamina H<sub>2</sub> foram definidos através da utilização de antagonistas seletivos como a cimetidina e ranitidina (BLACK et al., 1972; BHATNAGAR & SISODIA, 2006). Algum tempo depois, foram desenvolvidas drogas citoprotetoras, como o misoprostol, um análogo da PGE<sub>1</sub>, e extensas revisões sobre elas têm sido feitas. A prostaglandina no estômago inibe a secreção ácida, enquanto estimula a secreção de muco e bicarbonato (HAWKEY, 2001). Outras drogas gastroprotetoras foram introduzidas como os inibidores da bomba protônica ou H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase, responsável pela secreção ácida gástrica. A substância padrão foi o omeprazol, que é capaz de inibir a secreção ácida por inativação da bomba através da formação de

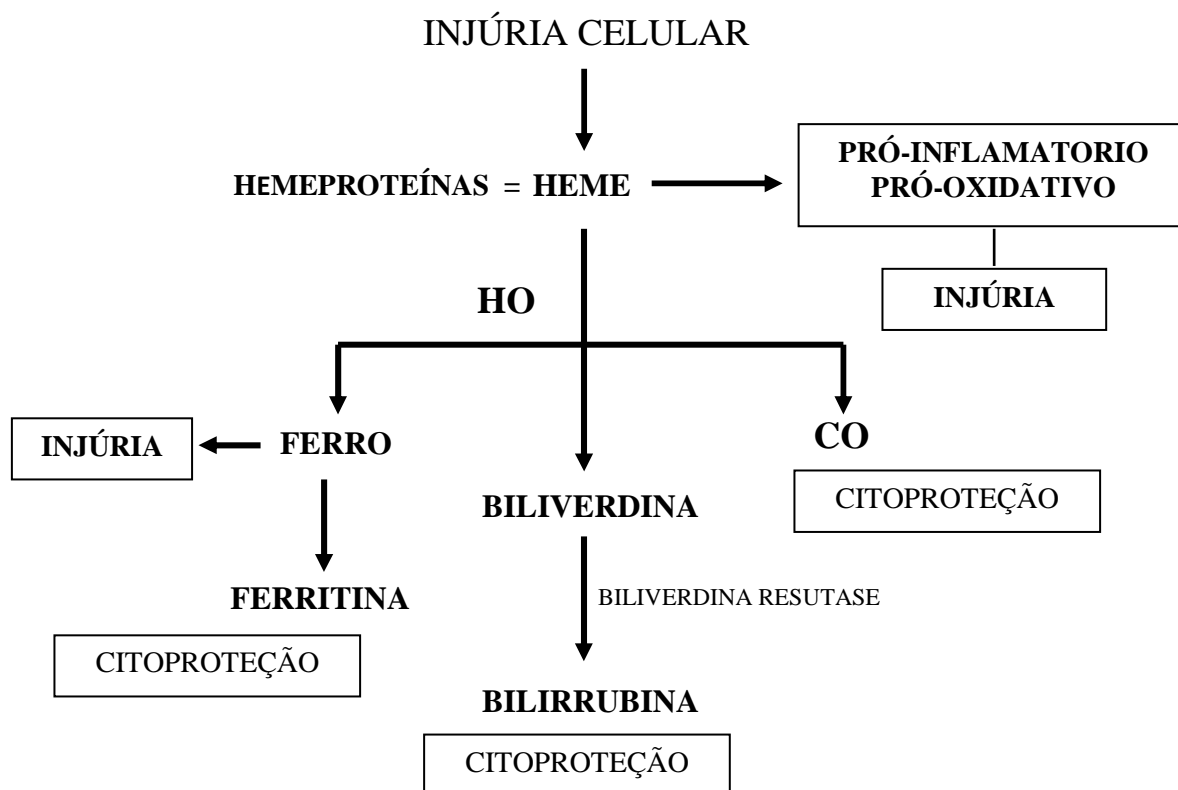
ligações dissulfeto entre as moléculas reagentes do omeprazol com a enzima (OLBE et al., 2003).

Assim, o tratamento atual das dispepsias se limitou ao uso individual ou em associações de antiácidos, anti-histamínicos H<sub>2</sub>, citoprotetores, inibidores da bomba protônica e tratamento da bactéria *Helicobacter pylori*. Sendo necessário um período de 2 a 4 semanas para se observar a melhora das lesões. Logo, ainda não existe uma droga 100% efetiva para o tratamento das lesões gastroduodenais (ALPER, 1993). No Brasil, existem centenas de milhares de casos envolvendo esse tipo de morbidade, o que significa um problema de saúde pública importante e nos leva a crer que estudar substâncias com potencial atividade antiulcerogênica é vital.

## **2.5. HEMEOXIGENASE 1/BILIVERDINA/CO**

A heme oxigenase (HO) é uma enzima microsossomal que cataliza a degradação do heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina e ferro (ABRAHAM et al,1988). A heme oxigenase 1 (HO-1), é a forma induzida da HO. É geralmente expressa em condições de stress oxidativo, isquemia e reperfusão por citocinas pro-inflamatórias, óxido nítrico (NO), endotoxinas e heme, o seu substrato (BAKKEN et al., 1972; CAMHI et al., 1995; DOI K et al., 1999; FUJITA et al., 2001; YACHIE et al., 2003). A heme oxigenase 2 (HO-2) e a heme oxigenase 3 (HO-3) são as formas constitutivas expressa na maioria dos tecidos (MCCOUBREY et al., 1997). A HO e seus produtos estão envolvidos e vários efeitos biológicos. Foi demonstrado que o heme é capaz de estimular a produção de radicais livres, a expressão de moléculas de adesão e a infiltração de neutrófilos para o sítio lesado (SHONO et al., 1996). Entretanto, pequenas concentrações, o heme pode possuir efeitos

antiinflamatórios e citoprotetores através do aumento da expressão da HO-1 e estimulação da formação de HO-1 e seus produtos, como o CO e biliverdina (BELCHER et al., 2006) (Figura 4).



**FIGURA 4** – Degradação do heme pela enzima hemoxigenase (HO) gerando biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro. Biliverdina é rapidamente convertida em bilirrubina pela biliverdina redutase. O ferro é capturado pela ferritina. Os produtos de degradação do heme pela HO possuem várias propriedades fisiológicas (WAGENER et al., 2003).

A biliverdina é capaz de reduzir a migração de neutrófilos, exsudação e liberação de mediadores pró-inflamatórios e a expressão de proteínas de adesão (VICENTE et al., 2003; HAYASHI et al., 1999), sugerindo que a expressão de HO-1 possui efeito antiinflamatório.

O monóxido de carbono (CO), gás similar, contudo muito mais estável quimicamente, ocorre na natureza como um produto da oxidação ou da combustão de materiais orgânicos. O CO presente nos tecidos é um produto da degradação do heme a biliverdina pela enzima heme oxigenase (HO) (RYTER et al., 2004).

O CO foi implicado também como um neurotransmissor no sistema nervoso central. Muitos, mas não todos os efeitos fisiológicos do CO no sistema vascular e neural são ligados claramente à produção de 3', 5'-monofosfato de guanosinida cíclico (GMPc). A ativação da guanilato ciclase por CO é relativamente mais fraca do que a ativação mediada pelo NO, o regulador clássico da guanilato ciclase (RYTER et al., 2004). Dado a diferença em potencial do NO e do CO em eliciar uma resposta direta da guanilato ciclase solúvel, diversas hipóteses surgiram. Primeira hipótese, o CO pode agir como um regulador principal do guanilato ciclase solúvel sob as circunstâncias onde produção de NO é baixa ou ausente; segunda hipótese, o CO pode agir como um antagonista competidor para a ativação da guanilato ciclase solúvel em situações onde NO é o regulador dominante; terceira hipótese, o CO pode, em alguns casos, ativar indiretamente o guanilato ciclase solúvel deslocando NO do seu sítio de ligação e quarta hipótese, o CO pode causar uma ativação atrasada do guanilato ciclase solúvel através da ativação da expressão dos iNOS e da geração secundária do NO. Assim, a ação do CO como um agonista ou um antagonista da guanilato ciclase solúvel dependem aparentemente do modelo experimental e da biodisponibilidade do NO no processo biológico avaliado (RYTER et al., 2007).

Tanto a enzima NOSi como HO-1 são induzidas em processos fisiopatológicos e estudos sugerem que CO pode servir tanto para regular, como também, para dar continuidade aos efeitos dos NO. Uma outra característica importante, do ponto de vista do



efeito vasodilatador do NO é que ao inibir a produção de NO, via aumento da degradação do heme pela HO-1, as propriedades vasodilatadoras se mantêm por meio da produção de CO. O CO exibe algumas propriedades semelhantes ao NO, incluindo a regulação no tônus vascular, sinalização neuronal, modulação da apoptose e anti-nocicepção (MCCOUBREY et al., 1997; MORITA et al., 1995; MAINES, 1997; BARANANO et al., 2001; STEINER et al., 2001).

Tem sido proposto que a atividade de HO pode ser sob algumas circunstâncias modulada pela produção de NO. A inibição química da atividade de HO pelo zinco protoporfirin-IX (ZnPP IX) em músculo isolado (WANG et al, 1997) e em macrófagos resultou em uma aumento na produção de NO, sugerindo que HO pode exercer um efeito inibitório na produção de NO. Esta observação é suportada pelo fato de que a indução de HO-1 nos macrófagos suprime a geração NO (WANG et al, 1997). A enzima NOS é um hemoproteína, é razoável postular que o CO gerado pela atividade da HO poderia se ligar à enzima NOS causando sua inativação. Demonstrou-se que o CO é de fato capaz de se ligar a NOS (CHRISTODOULIDES et al, 1995), e que quando administrado exogenamente inibe a atividade da NOS. A inibição da NOS pela HO poderia ser importante na vista do fato que NO é um radical livre, e pode reagir de forma inespecífica com muitos componentes celulares, causando os efeitos patológicos (VERMA et al, 1994). A exposição dos hepatócitos ao tratamento exógeno do CO resultou em uma indução rápida da expressão dos iNOS seguida por uma indução da expressão HO-1. Usando uma série de ferramentas farmacológicas e genéticas, Zuckerbraun et al. descreveram uma resposta adaptável cíclica onde o CO estimula a produção de NO via iNOS nos hepatócitos, aumentando a atividade da HO-1 e produção aumentada de CO. A remoção do NO, via inibição da enzima iNOS, resultou em uma perda da proteção que poderia ser revertida se

HO-1 fosse ativada por um estímulo alternativo (ZUCKERBRAUN et al, 2006). No contraste, em diversos modelos de transplantes, a exposição ao CO impede a rejeição e injúria causada por isquemia/reperfusão conjuntamente com a inibição da expressão dos iNOS (RYTER et al, 2004).

A função fisiológica do monóxido de carbono (CO) se transformou em um assunto da pesquisa importante nos últimos anos e estudos recentes sobre o trato gastrintestinal estiveram na frente destas investigações. No trato gastrintestinal foi demonstrado que a via da HO1/biliverdina/CO é capaz de proteger a mucosa colônica em modelos de doença inflamatória intestinal. O CO é um regulador importante da motilidade gastrintestinal e da resposta à injúria tecidual. A Heme oxigenase 1 (HO-1) e a heme oxigenase 2 (HO-2) são regulados por mecanismos diferentes, refletindo papéis fisiológicos e patológicos diferentes. HO-1 é expresso em níveis muito baixos no trato gastrintestinal, a menos que induzido por uma doença, por injúria e/ou inflamação. O CO gerado pela HO-2 é importante para inibir os efeitos fisiológicos mediados pelo NO produzido pela NOS constitutiva. Já o CO gerado a partir da enzima HO-1, é induzido sob circunstâncias do stress ou injúria. O NO parece aumentar a expressão HO-1 induzindo a transcrição e estabilizando o mRNA de HO (HARTSFIELD et al, 1997).

Nos últimos anos, vários estudos vêm demonstrando que a HO-1, e seu substrato, heme e seus produtos CO e biliverdina, são capazes de modular o processo inflamatório. O aumento da atividade de HO-1 protege o trato gastrintestinal de diversos tipos de injúria tecidual e melhora o processo inflamatório pela capacidade de reduzir a migração de neutrófilos, exsudação e liberação de mediadores pró-inflamatórios e a expressão de proteínas de adesão (VICENTE et al, 2003; HAYASHI et al, 1999), sugerindo que a expressão de HO-1 possui efeito antiinflamatório. Por outro lado, a inibição de HO-1

aumenta a expressão das moléculas da adesão e a liberação de mediadores pró-inflamatórios (BELCHER et al, 2006).

O CO reduz respostas inflamatórias em diversos modelos de estresse oxidativo de maneiras similares àquelas causadas pela inibição da HO-1 (OTTERBEIN et al, 2003). Também, o CO liberado por moléculas como carbonil, suprime significativamente a resposta inflamatória eliciada por LPS em macrófagos. Como o NO, o CO inibe a transcrição de genes pró-inflamatórios, e aumenta as citocinas antiinflamatórias (BELCHER et al, 2006). A inalação de CO ou injeções de i.p. de biliverdina diminuíram significativamente a ativação de NF-kB nos pulmões de animais. Belcher et al. relataram que o aumento na expressão HO-1 inibe a ativação de NF-k $\beta$  e promove uma diminuição da expressão da molécula da adesão, inibindo a adesão de leucócitos a parede dos vasos e dessa forma inibindo a migração dos leucócitos para o local de lesão. Entretanto, faltam estudos avaliando uma possível participação do NO e do CO na modulação farmacológica via HO-1 em processos inflamatórios induzidos por estímulos inflamatórios como, etanol e indometacina no estômago. No presente estudo, pretendemos estudar as hipóteses de que via hemeoxigenase-1/ biliverdina/ CO no estômago pode aumentar a defesa da mucosa gástrica contra os danos causados pelo álcool ou por AINEs, pois as ações bioquímicas e farmacológicas dessa via no estômago ainda são pouco conhecidas.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. Objetivos Gerais:**

- Avaliar a efeito protetor da via hemeoxigenase 1/ biliverdina/ CO em modelos de gastropatia em camundongos, avaliando o papel da guanilato ciclase solúvel e da NOS constitutiva neste evento.

### **3.2. Objetivos Específicos:**

- Avaliar o tratamento com hemina (indutor de HO-1), biliverdina (produto da HO-1), decacarbonil dimanganês (doador de CO, DMDC) ou zinco protoporfirim IX (inibidor da HO-1, ZnPP IX) na lesão gástrica macroscópica e microscópica, aumento de malondialdeído (MDA) e bilirrubina, e redução de glutathione reduzida (GSH) na mucosa gástrica induzida por etanol .
- Avaliar o efeito do tratamento com hemina, biliverdina, DMDC ou ZnPP IX na lesão gástrica macroscópica e microscópica, aumento do MDA, mieloperoxidase (MPO) e bilirrubina, e redução de GSH na mucosa gástrica induzida por indometacina, bem como estudar o envolvimento de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 neste evento.
- Determinar por imunohistoquímica ou PCR, a expressão da enzima HO-1 no modelo de gastropatia induzida por etanol ou indometacina.
- Estudar a participação da guanilato ciclase solúvel (GMPC), e da óxido nítrico sintase constitutiva (NOS) no efeito protetor da via hemeoxigenase 1/ biliverdina/ CO em modelos de gastropatia por etanol e indometacina.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS.**

#### **4.1. ANIMAIS.**

No presente trabalho, foram usados camundongos swiss, machos, pesando entre 20 e 30 g. Os animais foram colocados em caixas, num ambiente com temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  num ciclo de 12h luz/12h escuro. Os animais foram privados de alimento por 18-24h antes dos experimentos, mas tiveram acesso livre a água. Os grupos experimentais foram constituídos de 5-7 animais por grupo. Os camundongos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – UFC e pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC. Os protocolos experimentais estão de acordo com os padrões de uso de animais experimentais e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa animal da Faculdade de Medicina de Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### **4.2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS.**

- Material cirúrgico como pinças e tesouras
- Balança Analítica Ohaus AS2600
- Balança Analítica Marte AI200
- Béquers
- Centrífuga para Eppendorf Centrifuge 5804R
- Cânula para gavagem
- Computador e programa para planimetria
- Cuba para eletroforese
- Espectrofotômetro Spectronic 20 genesys
- Freezer -20 e -70 graus
- Geladeira Consul

- Homogeinizador de tecidos
- Leitora de ELISA Biotec ELx 800
- Máquina fotográfica digital (Sony Cybershoot, 7,2 mpx)
- Material descartável para acondicionamento de material coletado como: eppendorfs e tubos de Falcon
- Material cirúrgico
- Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N
- Microscópio Leica acoplado a computador
- Micrótomo Olympus
- Paquímetro digital Mitotoyo
- Placas para leitora de ELISA – 96 poços
- Pipetas Gilson automáticas de 1000, 200, 20, 10, 5, 1  $\mu\text{L}$
- Pipeta multicanal – 12 poços
- Ponteiras para pipetas automáticas Sigma
- Seringas (B-D Plastipak)
- Vidraria: pipetas manuais e tubo de ensaio
- Vortex Maxi Mix II Thermolyne tipe 37600 mixer
- Termociclador
- Tubos de polipropileno para centrifuga (15 e 50mL)

#### **4.3. DROGAS UTILIZADAS.**

- Anticorpo para HO-1 (Santa Cruz)

- Biliverdina (Porphyrin Products) diluída em 1 mM NaOH
- Decacarbonil dimanganês (DMDC) diluído em DMSO 1,5%
- Etanol absoluto (VETEC)
- Hemina (Sigma) diluída em 1 mM NaOH
- Indometacina (Sigma) diluído em tampão Tris-HCL, pH 8,0.
- N (G)-nitro-L- arginine methyl ester (L-NAME) (Sigma ) diluído em solução salina
- ODQ (1H-[1,2,4]-oxtdiazol[4,3-a] quinoxalina-1) (Sigma) diluído em solução salina mais DMSO 1,5%.
- Zinco protoporfirim IX (ZnPP IX) diluído em 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

#### 4.4. CORANTES.

- Eosina (Merck)
- Hematoxilina (Reagen)

#### 4.5 – SOLUÇÕES.

- Solução salina:

Cloreto de sódio a 0,9% estéril.

- Tampão Tris:

Hidroximetil aminometano ( Tris) ----- 6,1g.

Água destilada ----- 500 .

O pH do tampão foi acertado para 8,0.

- Formol 10%:

Formol absoluto ----- 10 ml.

Água destilada ----- 90 ml.

- Ácido Tricloacético (TCA) 100%

- Dimetil sulfóxido (DMSO)100%

- Tampão fosfato de potássio:

Solução A ----- 988 ml.

Solução B ----- 12 ml.

Solução A:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Synth) ----- 6,8 g.

Água destilada ----- 1 L.

Solução B:

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Synth) ----- 8,7 g.

Água destilada ----- 1 L.



- Tampão hidróxido de sódio (NaOH) 1 mM

Hidróxido de sódio (NaOH) ----- 4 mg.

Água destilada ----- 100 ml.

O pH do tampão foi acertado para 9,2.

- Tampão Carbonato de Sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 50 mM

Carbonato de Sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ----- 0,53 g.

Água destilada ----- 100 ml.

- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)

HTAB (Sigma) ----- 5 g.

Tampão fosfato de potássio ----- 1 L.

- Peróxido de hidrogênio 0,1%

Peróxido de hidrogênio 30% (Vetec) ----- 1 mL.

Água destilada ----- 29 mL.

- Solução de o-dianisidina (DDI)

- O-dianisidina (Sigma) -----16,7 mg.
- Tampão fosfato de potássio -----10 mL.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -----50 µL.
- Água destilada ----- 90 mL.
- EDTA 0,2 M
- EDTA -----1,737 g.
- Água destilada ----- 23,3 mL.
- EDTA 0,02 M
- Solução de EDTA 0,2 M ----- 10 mL.
- Água destilada ----- 100 mL.
- Tris 0,4 M pH 8,9
- Tris ----- 4,84 g.
- EDTA 0,2 M ----- 10 mL.
- Água destilada ----- 100 mL.
- DTNB 0,01 M

DTNB ----- 13,2 mg.

Metanol ----- 3,33 mL.

#### **4.6. LESÃO GÁSTRICA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS.**

Os camundongos foram tratados, por gavagem, com etanol (0,5ml/Kg), nas concentrações de 25 ou 50%. O grupo controle recebeu apenas solução salina. Após 1 hora, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram removidos e abertos ao longo da grande curvatura (KO & CHO , 1998). Os estômagos foram então estirados e fotografados com câmera digital para posterior análise das alterações macroscópicas com uso de um programa de planimetria computadorizada (*Image J*). A seguir, amostras do estômago foram retiradas, pesadas e congeladas a -70 graus para posterior dosagem de malondialdeído (MDA), glutationa reduzida (GSH) e bilirrubina. Para avaliar a expressão da enzima hemeoxigenase 1 (HO-1), um fragmento da mucosa foi utilizado para a realização de PCR. Outra amostra de tecido foi retirada e colocada em formol a 10% e após 24 horas em álcool etílico 70% para análise microscópicas, seguindo critérios já estabelecidos por Laine et al. (1988). Este mesmo material foi utilizado para avaliar a imunomarcação da enzima HO-1, através da técnica de imunohistoquímica.

#### **4.7. LESÃO GÁSTRICA POR INDOMETACINA (INDO) EM CAMUNDONGOS.**

Camundongos foram tratados, por via oral, com INDO diluída em tampão Tris-HCl, pH 8,0, na dose de 10 ou 30 mg/Kg. O grupo controle recebeu apenas o veículo (Tris-HCl). Três horas após a administração de INDO, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram retirados rapidamente e abertos pela grande curvatura. A avaliação das lesões da mucosa gástrica foi realizada depois do órgão ser estirado. A mensuração das erosões lineares foi realizada utilizando-se um paquímetro digital e uma lupa com aumento de cerca de 3X. O índice de lesão (I.L.) foi considerado como a somatória das extensões de todas as erosões encontradas na mucosa do órgão (SANTUCCI et al., 1994). A seguir, amostras do estômago foram retiradas, pesadas e congeladas a -70 graus para dosagem mieloperoxidase (MPO), malondialdeído (MDA), glutathiona reduzida (GSH) e bilirrubina. A detecção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 em fragmentos da mucosa gástrica dos camundongos foram determinadas por ELISA, usando o Kit DuoSet (R&D Systems). Outra amostra de tecido foi retirada e colocada em formol a 10% e após 24 horas em álcool etílico 70% para análise microscópicas, seguindo critérios já estabelecidos por Laine et al. (1988). Este mesmo material foi utilizado para avaliar a imunomarcação da enzima HO-1, através da técnica de imunohistoquímica.

#### **4.8. EFEITO PROTETOR DA VIA HO-1/BILIVERDINA/CO CONTRA A LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS.**

Para o estudo do efeito protetor da via HO-1/biliverdina/CO, os camundongos foram tratados, pela via intraperitoneal, com salina ou hemina (indutor da HO-1; 1,0, 3,0 ou 10 mg/kg), biliverdina (produto da HO-1; 1,0, 3,0 ou 10 mg/kg) ou DMDC (doador de CP; 2,5, 7,5, 12,5 ou 25  $\mu$ mol/Kg). Após 30 min, a lesão gástrica foi induzida pela administração de etanol 50% (0,5 ml/Kg), por gavagem. O grupo controle recebeu somente

solução salina. Outro grupo de camundongos foi tratado com zinco protoporfirin IX (ZnPP IX, inibidor da HO-1), nas doses de 0,3, 1,0 ou 3,0 mg/Kg, por via intraperitoneal. Trinta minutos depois, etanol na concentração de 25% (0,5 ml/Kg) foi administrado por via oral. Foi optado por utilizar uma dose sub-máxima do etanol para possibilitar a avaliação de um efeito amplificador da lesão por etanol pelo tratamento com ZnPP IX. Uma hora após a adição do etanol, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura para avaliação das lesões gástricas, de acordo com a metodologia descrita na seção anterior utilizando um programa de planimetria computadorizada (*Image J*). A seguir, amostras do estômago foram retiradas, pesadas e congeladas a -70 graus para posterior dosagem de malondialdeído (MDA), glutathiona reduzida (GSH) e bilirrubina. Outra amostra de tecido foi retirada e colocada em formol a 10% e após 24 horas em álcool 70% para análise microscópicas, seguindo critérios já estabelecidos por Laine et al. (1988).

#### **4.9. EFEITO PROTETOR DA VIA HO-1/BILIVERDINA/CO CONTRA A LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA EM CAMUNDONGOS.**

Para o estudo do efeito protetor da via HO-1/biliverdina/CO, os camundongos foram tratados, pela via intraperitoneal, com salina ou hemina (3,0 mg/kg), biliverdina (3,0 mg/kg) ou DMDC (12,5  $\mu$ mol/Kg). O grupo controle recebeu somente solução salina. Após 30 min, a lesão gástrica foi induzida pela administração de INDO, por gavagem, na dose de 30 mg/Kg. Outro grupo de camundongos foi tratado com zinco protoporfirin IX (ZnPP IX), nas doses de 3,0 mg/Kg, por via intraperitoneal. O grupo controle recebeu somente solução salina. Trinta minutos depois, INDO foi administrado por gavagem, na dose de 10mg/Kg. Foi optado por utilizar uma dose sub-máxima da INDO para possibilitar

a avaliação de um efeito amplificador da lesão por INDO pelo tratamento com ZnPP IX. Três horas após a administração de INDO, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura para avaliação das lesões gástricas, de acordo com a metodologia descrita na seção anterior utilizando um paquímetro digital e uma lupa com aumento de cerca de 3X. O índice de lesão (I.L.) foi considerado como a somatória das extensões de todas as erosões encontradas na mucosa do órgão (SANTUCCI et al., 1994). A seguir, amostras do estômago foram retiradas, pesadas e congeladas a -70 graus para dosagem mieloperoxidase (MPO), malondialdeído (MDA), glutathiona reduzida (GSH) e bilirrubina. A detecção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 em fragmentos da mucosa gástrica dos camundongos foram determinadas por ELISA, usando o Kit DuoSet (R&D Systems). Outra amostra de tecido foi retirada e colocada em formol a 10% e após 24 horas em álcool 70% para análise microscópicas, seguindo critérios já estabelecidos por Laine et al. (1988).

#### **4.10. PAPEL DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (GMPc) NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DO DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS.**

Para avaliação do papel da guanilato ciclase solúvel (GMPc) no efeito protetor da via HO-1/biliverdina/CO, os animais foram tratados com ODQ (um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel) na dose de 12,5 mg/Kg, ou salina por gavagem. Trinta minutos depois da administração do ODQ, os camundongos foram tratados com hemina (3,0 mg/kg), biliverdina (3,0 mg/kg) ou DMDC (12,5  $\mu$ mol/Kg), por via intraperitoneal. Após 1 hora da administração de ODQ, etanol (0,5 ml/Kg), na concentração de 50%, foi

administrado por gavagem, para induzir a lesão gástrica. Os grupos controles receberam apenas a solução salina ou etanol 50%. Uma hora após a adição do etanol, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura para avaliação das lesões gástricas, de acordo com a metodologia descrita na seção anterior utilizando um programa de planimetria computadorizada (*Image J*). A seguir, amostras do estômago foram retiradas pesadas e congelada a -70 graus para posterior dosagem de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH).

#### **4.11. PAPEL DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (GMPc) NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DO DECARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO) EM CAMUNDONGOS.**

Para avaliação da guanilato ciclase solúvel (GMPc) no efeito protetor da via HO-1/biliverdina/CO, os animais foram tratados com ODQ (um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel) na dose de 12,5 mg/Kg, ou salina por gavagem. Trinta minutos depois da administração do ODQ, os camundongos foram tratados com hemina (3,0 mg/kg), biliverdina (3,0 mg/kg) ou DMDC (12,5  $\mu$ mol/Kg), por via intraperitoneal. Os grupos controles receberam apenas a solução salina ou INDO ou hemina, biliverdina e DMDC associado a INDO. Após 30 min, a lesão gástrica foi induzida pela administração de INDO, por gavagem, na dose de 30 mg/Kg. Três horas após a administração de INDO, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura para avaliação das lesões gástricas, de acordo com a metodologia descrita na seção anterior utilizando um

paquímetro digital e uma lupa com aumento de cerca de 3X. O índice de lesão (I.L.) foi considerado como a somatória das extensões de todas as erosões encontradas na mucosa do órgão (SANTUCCI et al., 1994). A seguir, amostras do estômago foram retiradas, pesadas e congeladas a -70 graus para dosagem mieloperoxidase (MPO), malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH).

#### **4.12. PAPEL DA NO SINTASE NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DO DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS.**

L-NAME, um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), foi utilizado para verificar a participação do óxido nítrico (NO) no efeito protetor da hemina, biliverdina ou DMDC. L-NAME, na dose de 3,0 mg/Kg, ou salina foram administrados por intraperitoneal, trinta minutos antes da administração de hemina (3,0 mg/kg), biliverdina (3,0 mg/kg) ou DMDC (12,5 µmol/Kg), por via intraperitoneal. Após 1 hora da administração de L-NAME, etanol 50% (0,5 ml/Kg) foi administrado por gavagem, para induzir a lesão gástrica. Os grupos controles receberam apenas a solução salina ou etanol 50%. Uma hora após a adição do etanol, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura para avaliação das lesões gástricas, de acordo com a metodologia descrita na seção anterior utilizando um programa de planimetria computadorizada (*Image J*). A seguir, amostras do estômago foram retiradas, pesadas e congeladas a -70 graus para posterior dosagem de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH).



#### **4.13. PAPEL DA NO SINTASE NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DO DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO) EM CAMUNDONGOS.**

Para determinar o envolvimento da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na gastroproteção induzida pela hemina, biliverdina ou DMDC, os animais foram pré-tratados com L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, na dose de 3,0 mg/Kg. L-NAME foi administrado por intraperitoneal, trinta minutos antes da administração de hemina (3,0 mg/kg), biliverdina (3,0 mg/kg) ou DMDC (12,5 µmol/Kg), por via intraperitoneal. Após 1 hora da administração de L-NAME, INDO (30 mg/Kg) foi administrado por gavagem, para induzir a lesão gástrica. Os grupos controles receberam apenas a solução salina ou INDO ou hemina, biliverdina e DMDC associado a INDO. Três horas após a administração de INDO, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura para avaliação das lesões gástricas, de acordo com a metodologia descrita na seção anterior utilizando um paquímetro digital e uma lupa com aumento de cerca de 3X. O índice de lesão (I.L.) foi considerado como a somatória das extensões de todas as erosões encontradas na mucosa do órgão (SANTUCCI et al., 1994). A seguir, amostras do estômago foram retiradas, pesadas e congeladas a -70 graus para dosagem mieloperoxidase (MPO), malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH).

#### **4.14. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS.**

Os níveis de malondialdeído na mucosa gástrica foram determinados pelo método de Uchiyama e Mihara (1978). Fragmentos da mucosa gástrica de camundongos submetidos aos tratamentos citados anteriormente foram homogeneizados com KCl gelado 1.15% para obtenção de um homogenato à 10% . Meio mililitro (0,5ml) do homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrífuga de 10 ml, contendo 3 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1%) e 1 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0,6%). Posteriormente, os tubos foram aquecidos, por um período de 45 minutos, em um banho de água fervendo e a mistura reacional foi, então, resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 4 ml de n-butanol. Após a adição de n-butanol, as amostras foram agitadas por 40 segundos em um misturador "vortex", e depois centrifugados a 1200 *xg*, por um período de 10 minutos. O sobrenadante foi mensurado a uma absorvância de 520 e 535 nm, em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmol/g de tecido gástrico.

#### **4.15. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS.**

A dosagem de GSH foi realizada através determinação dos grupos sulfidrílicos não protéicos (glutationa), de acordo com a metodologia descrita por Sedlak & Lindsay (SEDLAK & LINDSAY, 1968), das amostras de tecidos gástricos de camundongos submetidos aos tratamentos anteriores citado. A determinação do GSH baseia-se na reação do DTNB, com o tiol livre originando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. Inicialmente, 50-100 mg da mucosa gástrica foi homogeneizado em EDTA 0,02 M (1 ml/100 g de tecido)

gelado. A uma alíquota de 400 µl do homogenato foi adicionado 320 µl de água destilada, e 80 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 50%. Em seguida o material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, seguido de agitação e filtração. Depois de centrifugado, 400 µl do sobrenadantes foram misturados a 800 µl de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e, por fim, foi adicionado 20 µl de DTNB (5,5'-dithio-bis -2- ácido nitrobenzóico) a 0,01M. O material foi então agitado durante 3 minutos e a absorbância foi determinada a 412 nm, em espectrofotômetro. A concentração de GSH/g de tecido foi determinada a partir de uma curva padrão de glutathiona reduzida, processada de maneira semelhante. Os resultados foram expressos em µg de GSH/g de tecido.

#### **4.16. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BILIRRUBINA NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS.**

A concentração de bilirrubina na mucosa gástrica foi medida de acordo com o protocolo descrito por Foresti et al. (2003), com algumas modificações. Inicialmente, 100 mg do tecido gástrico foi homogeneizado em 1 ml de salina. A uma alíquota de 500 µl do homogenato foram adicionadas 250 mg de BaCl<sub>2</sub> e misturado vigorosamente. Depois, 0,75 ml de benzeno foram adicionados às amostras e imediatamente misturado em um vortex. A fase benzênica contendo a bilirrubina extraída foi separada da fase aquosa por centrifugação a 13000 g por 30 minutos. Uma curva para bilirrubina padrão foi obtida utilizando bilirrubina comercial (Labtest, Brasil). A concentração de bilirrubina nas amostras de tecido gástrico foi mensurada por espectrofotômetro e calculadas pela diferença das absorbâncias, entre 450 e 600 nm. A concentração de bilirrubina foi expressa como mg/dL.

#### **4.17. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MIELOPEROXIDASE (MPO) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À GASTROPATIA POR INDOMETACINA (INDO).**

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrintestinal. Para tanto, 50 mg do tecido gástrico retirados dos grupos de camundongos submetidos à gastropatia por INDO, foram pesados e colocados em 1 ml de tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio, pH 6,0. Depois foram homogeneizados em um macerador Politron para obtenção do homogenato. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 4500 rpm por 12 minutos a 4° C, e o sobrenadante foi colhido. A atividade da MPO por mg de tecido foi aferida através da técnica descrita por Bradley et al. (BRADLEY et al., 1982), utilizando peróxido de hidrogênio a 1% como substrato para a MPO. A unidade da atividade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1  $\mu$ mol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio é degradado ocorre à produção do ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidine em um composto de cor marrom. Os resultados foram expressos como Unidade (U) de MPO/mg de tecido.

#### **4.18. DOSAGEM DE TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ E IL-10 NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS.**

Uma amostra do tecido gástrico de camundongos submetidos aos tratamentos anteriores citados foi utilizada para a determinação das citocinas presentes, através da

dosagem de TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10. O tecido coletado foi homogeneizado em tampão para citocinas como descrito por Safieh-Garabedian et al. (1995). A detecção das citocinas IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-10 foram determinadas por ELISA, usando o Kit DuoSet (R&D Systems). Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 18h a 4°C com 100  $\mu$ l por poço de anticorpo de captura para IL-1, TNF- $\alpha$  ou IL-10. Posteriormente, as placas foram lavadas, três vezes, com 300  $\mu$ l de tampão de lavagem e bloqueadas com 100  $\mu$ l, por poço, de BSA 1%. Após bloqueio das placas com BSA 1% por 1 hora, 100  $\mu$ l das amostras já homogeneizadas e da citocina padrão para TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou IL-10 foram adicionadas, em duplicata, a cada poço e incubadas por 2 horas a 4 °C. As placas foram, então, lavadas três vezes com 300  $\mu$ l de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-1, TNF- $\alpha$  ou IL-10. Após o período de incubação a 4 °C por 2 horas, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 300  $\mu$ l de tampão de lavagem e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos com 100  $\mu$ l de estreptavidina diluída de 1:200. As placas foram lavadas novamente por mais três vezes com 300  $\mu$ l de tampão de lavagem e, depois, 100  $\mu$ L da solução substrato para revelação (Kit DuoSet, R&D Systems Catalog – DY999) foi adicionado. As placas foram incubadas durante 20 minutos, no escuro à temperatura ambiente. A Reação enzimática foi parada com a solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a absorvância medida à 450nm. Os resultados foram expressos em pg/mL.

#### **4.19. ISOLAMENTO DO RNA E REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) DE FRAGMENTOS RETIRADOS DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ETANOL OU INDOMETACINA (INDO).**

O RNA total da mucosa gástrica dos animais tratados com etanol foi isolado utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. As

amostras em questão foram trituradas e homogeneizadas com 1mL do reagente Trizol para cada 50-100 mg de tecido e, em seguida, centrifugado. O sobrenadante foi coletado e adicionado 0,2 ml de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol utilizado, realizando assim a fase de separação. Essa mistura foi novamente centrifugada e o sobrenadante coletado. Iniciou-se, a seguir, a fase de precipitação e lavagem, usando álcool isopropílico e etanol (75%), respectivamente. Cada um destes procedimentos foi seguido por centrifugação da amostra. O procedimento de lavagem foi executado duas vezes. Finalmente, o precipitado foi resuspenso em água autoclavada. A quantidade e qualidade do RNA total isolado foram avaliadas por espectrofotômetro, baseado na razão das absorbâncias a 260 e 280 nm. Para analisarmos o nível de expressão gênica de proteínas que estão sendo efetivamente expressas foi sintetizado um DNA complementar (cDNA). Este cDNA foi produzido a partir do RNAm, através de uma reação catalizada por uma enzima denominada transcriptase reversa. Para produzirmos cDNA a partir do RNA total foi utilizado o kit de transcriptase reversa ThermoScript™ Reverse Transcriptase System (Invitrogen, USA) e um termociclador. O RNA total permaneceu, inicialmente, por 60 minutos a uma temperatura de 50°C. Passado este período, a reação foi aquecida a uma temperatura de 85°C por 5 minutos e então resfriada imediatamente a uma temperatura de 4°C. O cDNA pronto foi imediatamente usado na reação de PCR. Para a amplificação do cDNA formado na reação de transcriptase reversa, foi utilizado uma reação em cadeia de polimerase ou PCR. Os primers utilizados para hemeoxigenase 1 (HO-1) foram: senso (GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA) e o anti-senso (CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC). Para HO-1 e 18S (gene de referência) o processo envolveu 30 ciclos. No termociclador, através de sucessivas mudanças de temperatura, ocorreu: desnaturação (94°C); anelamento (60°C) e extensão (72°C). No último ciclo, foi realizado a extensão final de 8 minutos a 72 °C (WANG et al., 2001). Ao término da reação de PCR, o DNA amplificado foi analisado

através da técnica de eletroforese em gel de agarose. As amostras de DNA amplificado da reação de PCR foram preparadas para serem aplicadas nos poços do gel de agarose com a adição de um tampão de amostra contendo azul de bromofenol e glicose, para aumentar a viscosidade do DNA amplificado e impedir que o mesmo flutue no tampão de corrida. Ao término das aplicações das amostras nos poços, aplicou-se uma voltagem de 200 volts entre as extremidades do gel e uma corrente de 400 mA. A visualização dos produtos no gel após a corrida foi realizada pela reação de ligação do DNA com Brometo de Etídio (EtBr). A fotodocumentação dos produtos foi feita a partir da leitura da intensidade das bandas eletroforéticas pelo aparelho Gel Doc EQ System (Biorad-USA) utilizando o software (Quantity one Basic Software – Biorad, USA). Para avaliação semi-quantitativa da expressão gênica dos produtos desejados foi utilizado o método descrito por Gause & Adamovicz (1994), onde a intensidade das bandas obtidas foi normalizada frente à expressão gênica de um gene referência (GAUSE & ADAMOVICZ, 1994).

#### **4.20. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS.**

Para a avaliação histopatológica, uma amostra da mucosa gástrica dos camundongos foi fixada em uma solução de formaldeído 10%, onde permaneceu por 24 horas. Em seguida as amostras foram transferidas para uma solução de álcool 70%, onde permaneceu até a realização dos procedimentos histológicos. Inicialmente, as mucosas foram seccionadas e embebidas em parafina. Secções de 4 micrometros foram removidas da parafina, colocadas numa lâmina e coradas com hematoxilina-eosina e em seguida examinadas através de um microscópio óptico. As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios de Laine et al. (1988). Em síntese, foi avaliado perda de células epiteliais

(escores de 0 a 3), edema na superfície da mucosa (escores de 0 a 4), lesão hemorrágica (escores de 0 a 4) e infiltração de células inflamatórias (escores de 0 a 3), sendo 14 o escore máximo (LAINE et al., 1998). Toda a avaliação histopatológica foi realizada através de um estudo cego por um histopatologista experiente (GACB).

#### **4.21. AVALIAÇÃO POR IMUNOHISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DA ENZIMA HEMEOXIGENASE 1 (HO-1) DE FRAGMENTOS RETIRADOS DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ETANOL 50% OU INDOMETACINA (INDO).**

A partir dos fragmentos do estômago de camundongos submetidos à lesão gástrica induzida por etanol 50% ou INDO, foi avaliada a expressão da enzima HO-1 através de técnica de imunohistoquímica. As lâminas montadas a partir dos blocos de parafina utilizados para as análises histológicas, foram desparafinizadas e, em seguida hidratadas. O ensaio imunohistoquímico foi realizado seguindo o protocolo de Wang et al. (2001), utilizando técnica de bloqueio da peroxidase endógena, anticorpo primário de camundongo e secundário biotilado anti-igG de camundongo. A revelação foi feita com DAB e contra-coloração com hematoxilina de Harry (WANG et al., 2001). A expressão de HO-1 foi avaliada usando anticorpo policlonal de coelho contra HO-1 de camundongo (Santa Cruz).

#### **4.22. ANÁLISE ESTATÍSTICA.**

A análise estatística foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA). Quando houve diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Para análise das alterações



histológicas, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla Dunns. Os resultados foram expresso ou como média  $\pm$  E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana  $\pm$  mínimo e máximo (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## **5 – RESULTADOS**

### **5.1 – MODELO DE GASTROPATIA INDUZIDA POR ETANOL**

#### **5.1.1 - EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA E DO DEACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL 50%: CURVA DOSE-RESPOSTA:**

Na Figura 1, podemos observar que os animais tratados apenas com salina (grupo controle) não apresentaram lesão na mucosa gástrica, enquanto que a administração de etanol, na concentração de 50%, resultou no aparecimento de lesões gástricas na mucosa. Os pré-tratamentos com hemina (uma droga indutora da enzima HO-1, painel A), biliverdina (um produto da via HO-1, painel B) ou DMDC (uma droga doadora de CO, painel C) reduziram significativamente, de maneira dose dependente, a lesão gástrica provocada pela administração do etanol 50% na mucosa (Figura 5).

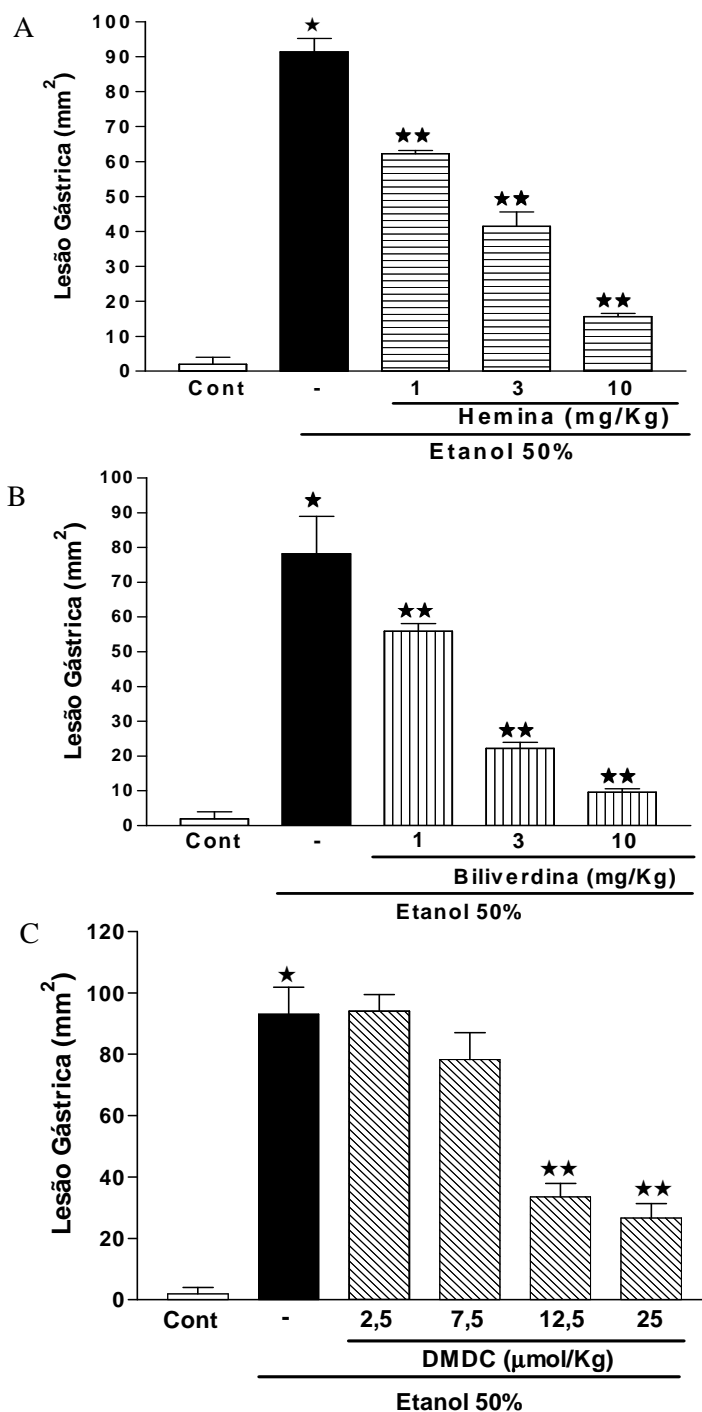
#### **5.1.2 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM HEMINA, BILIVERDINA OU DEACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NO MODELO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL 50%:**

Na análise microscópica, observou-se que o etanol, na concentração de 50%, provocou lesão hemorrágica, edema, perda de células epiteliais (Figura 6, painel A e Tabela 1), quando comparado com o grupo tratado com salina (grupo controle) (Tabela 1).

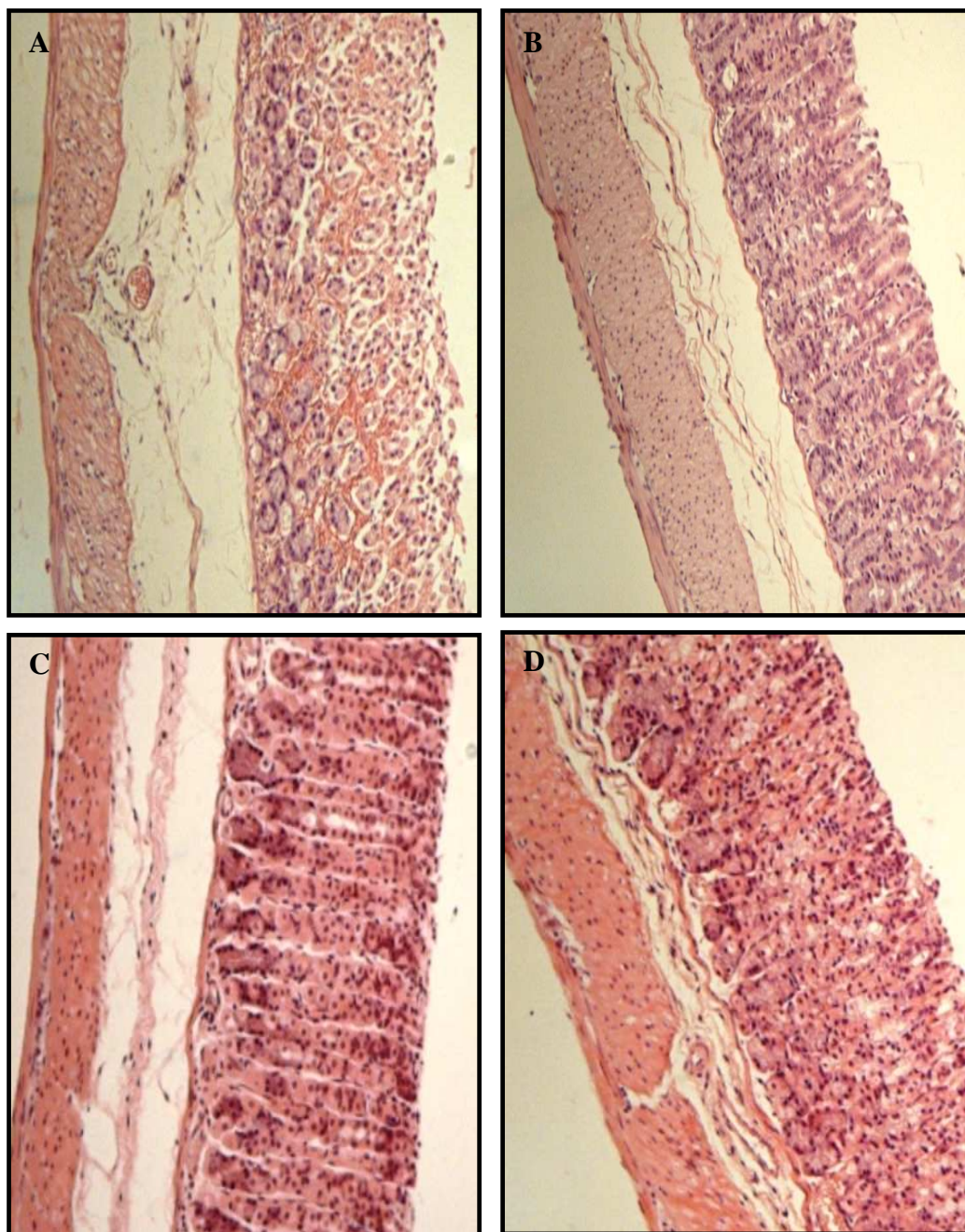
Não observamos aumento das células inflamatórias na mucosa gástrica após o tratamento com etanol 50%. O pré- tratamento com Hemina (10 mg/Kg), biliverdina (10 mg/Kg) diminuíram de forma significativa a hemorragia, o edema e a perda de células epiteliais induzidas pelo etanol 50% (Figura 6, painel B,C e D e Tabela 1). Por outro lado, o tratamento com DMDC (dose de 12,5  $\mu$ mol/Kg) só foi capaz de reduzir significativamente a lesão hemorrágica, mas não o edema e as perdas de células epiteliais (Tabela 1).

### **5.1.3 - EXPRESSÃO DA ENZIMA HEMEOXIGENASE 1 (HO-1) POR IMUNOHISTOQUÍMICA E PCR DE FRAGMENTOS RETIRADOS DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ETANOL 50% OU SALINA:**

Na Figura 7, observamos uma maior expressão da enzima hemeoxigenase 1 (HO-1), no tecido gástrico dos animais tratados com etanol 50%, pelo método de imunohistoquímica (Painel A e B) e PCR, quando comparado ao grupo salina. Na mucosa gástrica normal de animais tratados com salina (grupo controle) não foi observado marcação para HO-1 (Figura 7, painel A). Entretanto, no tecido gástrico de animais tratados com etanol 50% foi detectado um aumento na marcação para HO-1 no endotélio vascular, células epiteliais e células musculares lisas (Figura 7, painel B). Através da técnica de PCR, podemos ainda observar um aumento na transcrição do mRNA para HO-1 ( $1.12 \pm 2.2$ ) após a administração do etanol 50%, quando comparado com o grupo controle ( $1.0 \pm 0.0$ ) (Figura 7, painel C).



**FIGURA 5 – Hemina (painel A), biliverdina (painel B) e decarbonil dimanganês (DMDC, painel C) preveniu a lesão gástrica induzida por etanol 50%. Os pré-tratamentos com hemina, biliverdina ou DMDC reduziram a lesão gástrica induzida por etanol, de maneira dose dependente. O grupo controle (CONT) foi tratado somente com salina. A área total das lesões gástricas macroscópicas foi determinada 1 hora após a administração de etanol 50%. O resultado foi expresso como média  $\pm$  S.E.M. para grupo de seis animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo etanol. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls.**



**FIGURA 6 – Avaliação histológica da administração de hemina, um indutor da via da HO-1 (painel B), biliverdina (painel C) e do decaarbonil dimanganês (DMDC, painel D) no modelo de gastropatia por etanol. Hemina, biliverdina e DMDC diminuíram, de forma significativa, a lesão gástrica microscópica induzida por etanol 50%. Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com: Painel A: grupo etanol 50% (0,5 ml/Kg, via oral); Painel B: hemina (10 mg/Kg, via i.p.) + etanol (0,5 ml/Kg, via oral) ; Painel C: biliverdina (10 mg/Kg, via i.p.) + etanol (0,5 ml/Kg, via oral); Painel D: DMDC (12,5 μmol/Kg, via i.p.) + etanol (0,5 ml/Kg, via oral).**

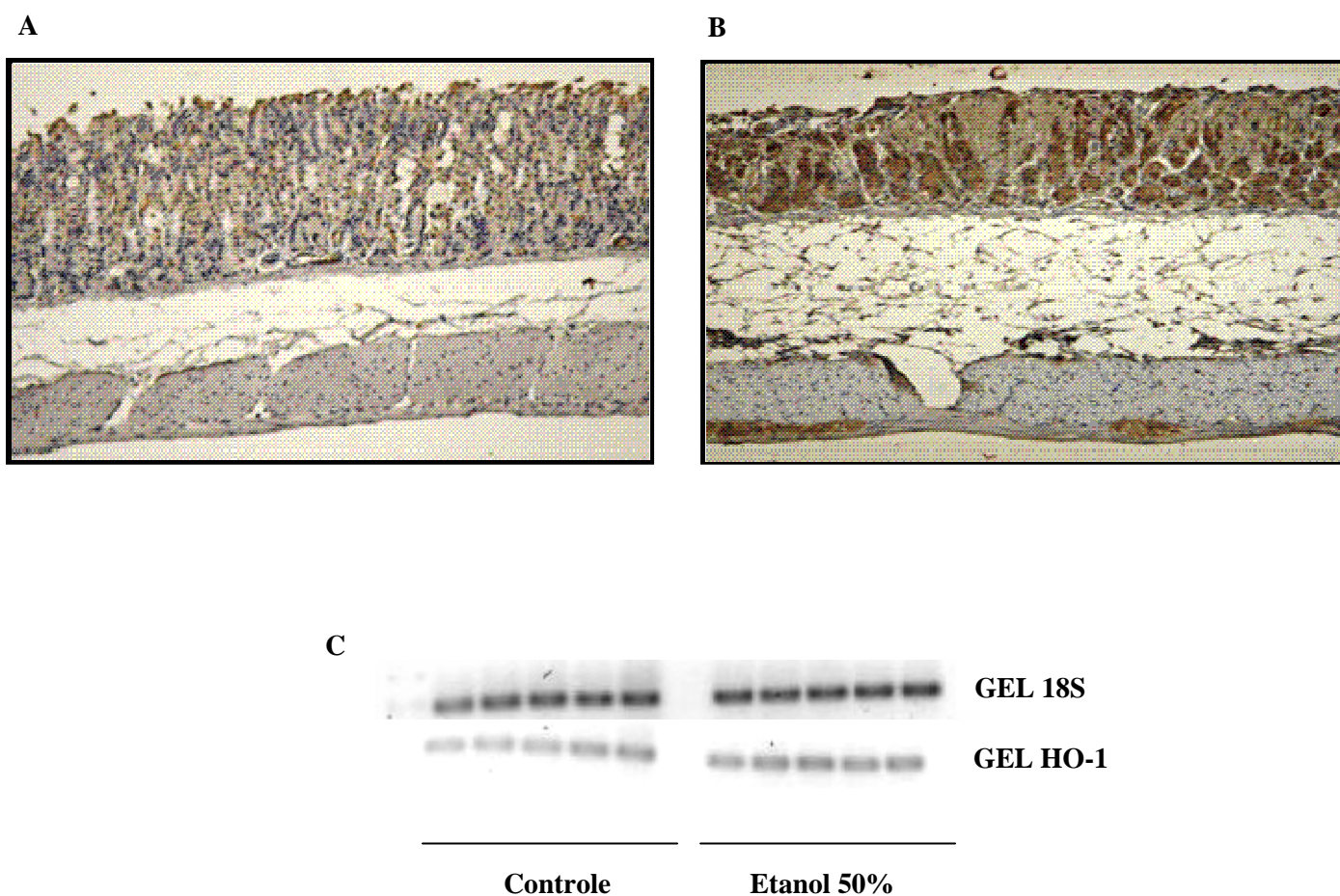
**Tabela 1 – Avaliação microscópica pelos criterios de Laine et al. (1988) da administração de hemina (10 mg/kg), biliverdina (10 mg/kg) ou decacarbonil dimanganês (DMDC) (12,5 µmol/kg) na lesão induzida por etanol 50%.**

<b>Grupo Experimental (N=6)</b>	<b>Lesão hemorrágica (escore 0 - 4)</b>	<b>Edema (escore 0 - 4)</b>	<b>Perda de células epiteliais (escore 0 - 3)</b>	<b>Células Inflamatórias (escore 0 - 3)</b>	<b>Total (escores 14)</b>
<b>Controle (Salina)</b>	0	0	0	0	0
<b>Etanol 50%</b>	4 (3 – 4)*	4 (3 – 4)*	3 (2 – 3)*	0	11(8 – 11)*
<b>Hemina+ Etanol 50%</b>	1 (0 – 2)**	1 (0 – 1)**	0 (0 – 1)**	0	2 (0 – 2)**
<b>Biliverdina + Etanol 50%</b>	1 (0 – 2)**	1 (1 – 0)**	1 (1 – 2)**	0	2 (1 – 2)**
<b>DMDC+ Etanol 50%</b>	1 (0 – 3)**	2 (1 – 2)	1 (1 – 3)	0	5 (2 – 7)**

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

(\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle

(\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo etanol 50%.



**FIGURA 7 – Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol.** Painel A: Fotomicrografias da mucosa gástrica (Magnífico, x100) demonstrando ausência de imunoreatividade para a enzima HO-1 na mucosa gástrica de camundongos normais. No painel B observa-se uma maior imunoreatividade para a enzima HO-1 no endotélio vascular, epitélio e células musculares lisas no tecido gástrico 1 hora após a administração de etanol 50%, quando comparado com o grupo. Painel C: PCR para 18S e mRNA para HO-1 na mucosa gástrica de camundongos 1 hora após a administração de etanol 50%. Por PCR foi demonstrado uma baixa expressão da HO-1 na mucosa gástrica de camundongos normais (grupo controle). Administração de etanol 50% aumentou, de forma significativa, a transcrição de mRNA para HO-1 quando comparado com o grupo controle.

#### **5.1.4 - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONDIALDEIDO (MDA) E DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PREVIAMENTE TRATADOS COM HEMINA, BILIVERDINA OU DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA INDUZIDA POR ETANOL 50%:**

Na lesão gástrica por etanol 50% observamos um aumento significativo dos níveis de MDA, associado com uma diminuição significativa no nível de GSH, quando comparado com o grupo controle (Tabela 2). A administração de hemina, biliverdina ou DMDC diminuiu, de forma significativa, a formação de MDA e o consumo de GSH associados à lesão por etanol a 50% (Tabela 2).

#### **5.1.5 - AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BILIRRUBINA NO TECIDO GÁSTRICO DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM HEMINA, BILIVERDINA OU DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA POR ETANOL 50%:**

Na tabela 3, observamos que o etanol 50%, por gavagem, aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a concentração de bilirrubina na mucosa gástrica, quando comparado com o grupo controle (salina). Administração de hemina (10 mg/Kg) ou biliverdina (10 mg/Kg), aumentou, de forma significativa, os níveis de bilirrubina no tecido gástrico, quando comparado com o grupo etanol 50% (Tabela 3). Por outro lado, o DMDC, na dose de 12,5  $\mu\text{mol/Kg}$ , não foi capaz de aumentar os níveis de bilirrubina na mucosa gástrica, quando comparado com o grupo etanol 50% (Tabela 3).



**Tabela 2 – Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com hemina (10 mg/kg), biliverdina (10 mg/kg) ou decacarbonil dimanganês (DMDC) (12,5 µmol/kg) no curso da lesão gástricas induzidas por etanol 50%.**

		<b>Etanol 50%</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Veículo</b>	<b>Hemina</b>	<b>Biliverdina</b>	<b>DMDC</b>
<b>MDA (nmol/g de tecido)</b>	79.4±0.6	177.7±9.9*	72.1±2.7**	81.4±4.0**	90.1±12.3**
<b>GSH (µg/g de tecido)</b>	243.4±13.2	56.2±7.6*	140.8±8.2**	333.8±19.5**	188.9±8.6**

(\*) p<0,05, quando comparado com o grupo controle

(\*\*) p<0,05, quando comparado com o grupo etanol 50% + veículo.

**Tabela 3 – Determinação dos níveis de bilirrubina na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com hemina (10 mg/Kg), biliverdina (BLV) (10 mg/kg) e decacarbonil dimanganês (DMDC) (12,5  $\mu$ mol/Kg) no modelo de gastropatia induzida por etanol 50%**

	<b>Etanol 50%</b>				
	<b>Controle</b>	<b>Veículo</b>	<b>Hemina</b>	<b>Biliverdina</b>	<b>DMDC</b>
<b>Bilirrubina (mg/dL)</b>	0,19 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,03*	0,67 $\pm$ 0,03**	1,0 $\pm$ 0,04**	0,50 $\pm$ 0,03

(\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle

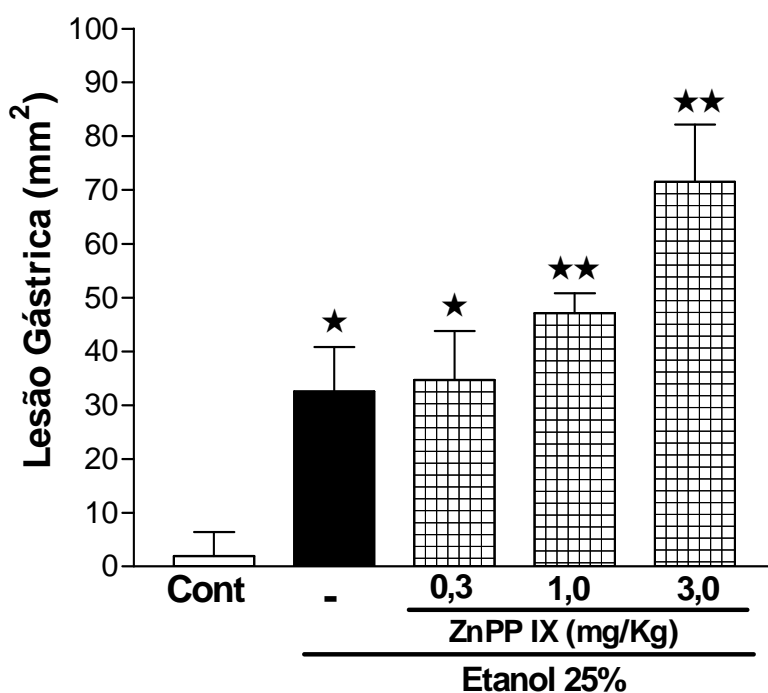
(\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo etanol 50% + veículo.

### **5.1.6 - EFEITO DO ZINCO PROTOPORFIRIM IX (ZnPP IX), UM INIBIDOR DA ENZIMA HEMEOXIGENASE 1 (HO-1), NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL 25%- CURVA DOSE RESPOSTA:**

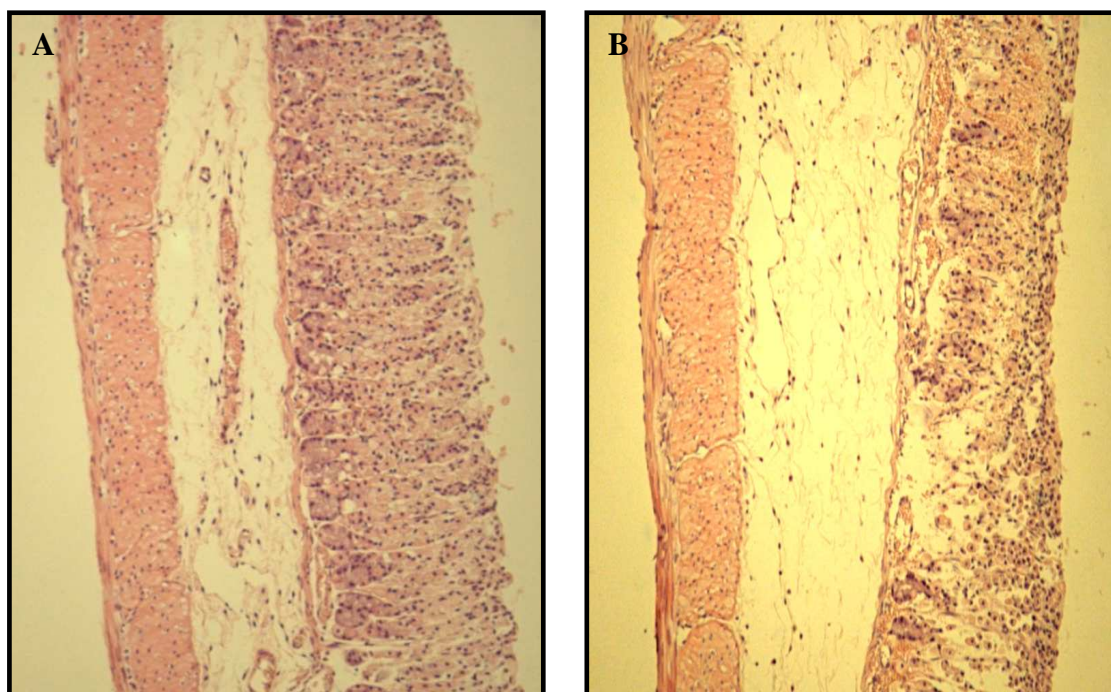
Na Figura 8, podemos observar que a administração, por gavagem, de etanol 25% resultou em lesões na mucosa gástrica ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o grupo tratado com salina (grupo controle). A inibição da enzima HO-1 pelo ZnPP IX amplificou de maneira dose dependente as lesões gástricas induzida pelo etanol 25%.

### **5.1.7 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ZINCO PROTOPORFIRIM IX (ZnPP IX) NO MODELO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL 50%:**

Na análise microscópica, observou-se que o etanol, na concentração de 25%, provocou um desarranjo nas glândulas gástricas, com perdas das células epiteliais, edema e hemorragia, sem aumento da infiltração de células inflamatórias (Figura 9, painel B e Tabela 4), quando comparado com o grupo controle tratado somente com salina (Tabela 4). A administração de ZnPP IX, na dose de 3,0 mg/Kg, potencializou o efeito lesivo do etanol promovendo um aumento significativo de hemorragia, edema e mas não da perda de células epiteliais, quando comparado com o grupo etanol 25% (Figura 9, painel B e Tabela 4).



**FIGURA 8 – Zinco protoporfirin IX (ZnPP IX) , um inibidor da enzima hemeoxigenase 1, aumentou significativamente a lesão induzida por etanol 25% na mucosa gástrica de camundongos.** O pré-tratamento dos animais com ZnPP IX nas doses de 0,3, 1,0 e 3,0 mg/Kg , via i.p., uma hora antes da administração do etanol 25% (0,5 ml/Kg), aumentou, de forma significativa, a lesão gástrica induzida por etanol 25%. O grupo controle (Cont) foi tratado somente com salina. A área total de lesões gástricas macroscópicas foi determinada 1 hora após a administração de etanol 25%. O resultado foi expresso como média  $\pm$  S.E.M. para grupo de seis animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo etanol. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls.



**FIGURA 9 – Análise microscópica da administração do zinco protoporfirim IX (ZnPP IX) na gastropatia induzida por etanol 25%. ZnPP IX, um inibidor da enzima HO-1, amplificou o efeito lesivo do etanol 25%, aumentando, de forma significativa, a lesão gástrica induzida pelo etanol 25% na mucosa gástrica de camundongos. Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com: Painel A: grupo etanol 25% (0,5 ml/Kg, via oral). Painel B: ZnPP IX (3 mg/Kg, via i.p.) associado ao etanol 25% (0,5 ml/Kg, via oral).**

**Tabela 4 - Avaliação microscópica de acordo com os critérios de Laine et al. (1988) da mucosa gástrica de camundongos pré-tratados zinco protoporfirin IX (ZnPP IX) (3 mg/Kg) nas lesões induzidas por etanol 25%.**

<b>Grupo Experimental (N=6)</b>	<b>Lesão hemorrágica (escore 0 - 4)</b>	<b>Edema (escore 0 - 4)</b>	<b>Perda de células epiteliais (escore 0 - 3)</b>	<b>Células Inflamatórias (escore 0 - 3)</b>	<b>Total (escores 14)</b>
<b>Controle (Salina)</b>	0	0	0	0	0
<b>Etanol 25%</b>	3 (3 - 4)*	3 (3 - 4)*	3 (2 - 3)*	0	9(8 - 11)*
<b>ZnPP IX + Etanol 25%</b>	4 (3 - 4)**	4 (2 - 4)**	2 (2 - 3)	0	10 (8 - 11)**

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

(\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle

(\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo etanol 25%.

### **5.1.8 - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONDIALDEIDO (MDA) E DOS GRUPOS SUFIDRÍLICOS NÃO PROTÉICOS (GLUTATIONA – GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PREVIAMENTE TRATADOS COM ZINCO PROTOPORFIRIN IX (ZnPP IX) NA GASTROPATIA INDUZIDA POR ETANOL 25%:**

A lesão gástrica induzida pelo etanol 25% foi acompanhada pelo aumento da concentração de MDA ( $p < 0,05$ ), diminuição dos níveis de GSH ( $p < 0,05$ ) no tecido gástrico dos animais, quando comparado com o grupo controle (Tabela 5). O tratamento com ZnPP IX (3 mg/Kg), potencializou o efeito do etanol 25%, aumentando ainda mais a concentração de MDA ( $p < 0,05$ ) e reduzindo os níveis de GSH na mucosa gástrica quando comparado com o grupo etanol 25% (Tabela 5).

### **5.1.9 - AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BILIRRUBINA NO TECIDO GÁSTRICO DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM ZINCO PROTOPORFIRIM IX (ZnPP IX) NO MODELO DE GASTROPATIA POR ETANOL 25%:**

Na tabela 3, observamos que o etanol 25%, por gavagem, aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a concentração de bilirrubina na mucosa gástrica, quando comparado com o grupo controle (salina). Administração de ZnPP IX, na dose de 3mg/Kg, não alterou a concentração de bilirrubina no tecido gástrico, quando comparado com o grupo etanol 25% (Tabela 6).

**Tabela 5 – Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com zinco protoporfirin IX (ZnPP IX) (3 mg/Kg) no curso da gastropatia induzidas por etanol 25%.**

		<b>Etanol 25%</b>	
	<b>Controle</b>	<b>Veículo</b>	<b>ZnPP IX</b>
<b>MDA (nmol/g de tecido)</b>	28,9±7,7	50,6±7,6*	149,6±13**
<b>GSH (µg/g de tecido)</b>	218,8±23,1	181,7±4,7*	82,0±4,7**

(\*) p<0,05, quando comparado com o grupo controle

(\*\*) p<0,05, quando comparado com o grupo etanol 25%.



**Tabela 6 – Determinação dos níveis de bilirrubina na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com Zinco protoporfirim IX (ZnPP IX), na dose de 3 mg/Kg na gastropatia induzidas por etanol 25%.**

		<b>Etanol 25%</b>	
	<b>Controle</b>	<b>Veículo</b>	<b>ZnPP IX</b>
<b>Bilirrubina (mg/dL)</b>	0,29±0,04	0,37±0,03*	0,41±0,03

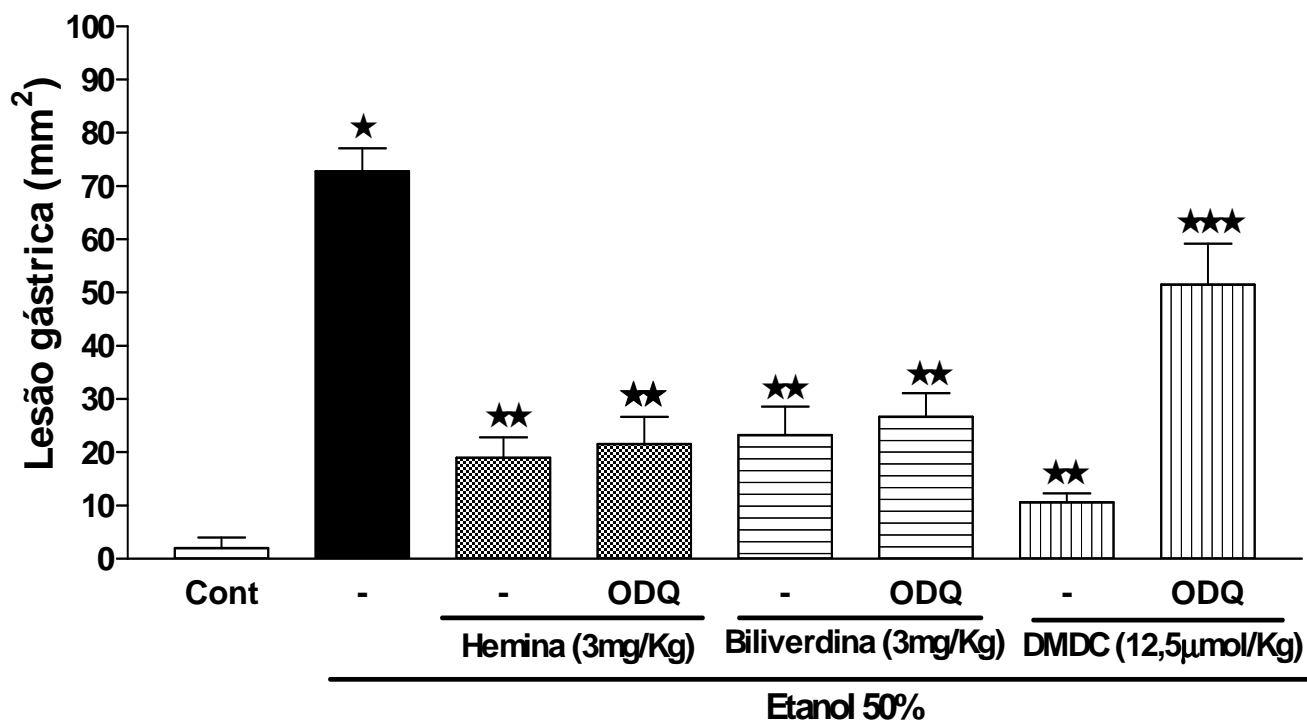
(\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (salina).

#### **5.1.10 - PAPEL DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (GSs) NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL 50%:**

A fim de determinar o envolvimento da guanilato ciclase na gastroproteção induzida pela hemina, biliverdina ou DMDC, os animais foram pré-tratados com ODQ, um inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (cGMP). Na figura 10, verifica-se que o ODQ aboliu completamente o efeito gastroprotetor do DMDC na lesão gástrica induzida por etanol 50%. Por outro lado, esse efeito não foi observado nos animais pré-tratados com hemina ou biliverdina (Figura 10).

#### **5.1.11 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MALONDIÁLDEIDO (MDA) E DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM ODQ ASSOCIADO AO DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA POR ETANOL 50%:**

No curso da gastropatia induzida por etanol a 50%, o co-tratamento com ODQ + DMDC foi acompanhado pelo aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos níveis de MDA e por uma diminuição significativa da concentração de GSH no tecido gástrico quando comparado com o grupo tratado somente com DMDC (Tabela 7).



**FIGURA 10 - Papel da guanilato ciclase solúvel no efeito gastroprotetor da via HO-1/biliverdina/CO contra lesões induzidas por etanol 50% em camundongos.** ODQ, um inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (GMPc) no foi capaz de reverter a gastroproteção induzida por DMDC, mas não reverteu a proteção da hemina e da biliverdina. ODQ (12,5 µmol/Kg, i.p.) foi administrado trinta minutos antes do tratamento com hemina (3,0 mg/Kg, i.p.), biliverdina (3,0 mg/Kg, i.p.), DMDC (12,5 µmol/Kg) ou seus respectivos veículos. Depois de 30 minutos, etanol 50% foi administrado por gavagem. A área total de lesões gástricas macroscópicas foi determinada 1 hora após a administração de etanol 50%. O grupo controle foi tratado somente com salina. Os resultados foram expressos como média ± S.E.M. para grupo de seis animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle. (\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo etanol 50%. (\*\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo DMDC + etanol 50%. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls.

**Tabela 7 – Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com ODQ (12,5 mg/kg), 30 minutos antes da administração de decarbonil dimanganês (DMDC) (12,5  $\mu$ mol/kg) na gastropatia induzida por etanol 50%.**

	<b>ETANOL 50 %</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Veículo</b>	<b>DMDC</b>	<b>DMDC + ODQ</b>
<b>MDA (nmol/g de tecido)</b>	62,4 $\pm$ 0,6	184,7 $\pm$ 4,9*	90.1 $\pm$ 12.3**	153,1 $\pm$ 6,3****
<b>GSH (<math>\mu</math>g/g de tecido)</b>	223,1 $\pm$ 9,2	76,9 $\pm$ 6,4*	188.9 $\pm$ 8.6**	89,4 $\pm$ 2.6****

(\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle.

(\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo etanol 50%.

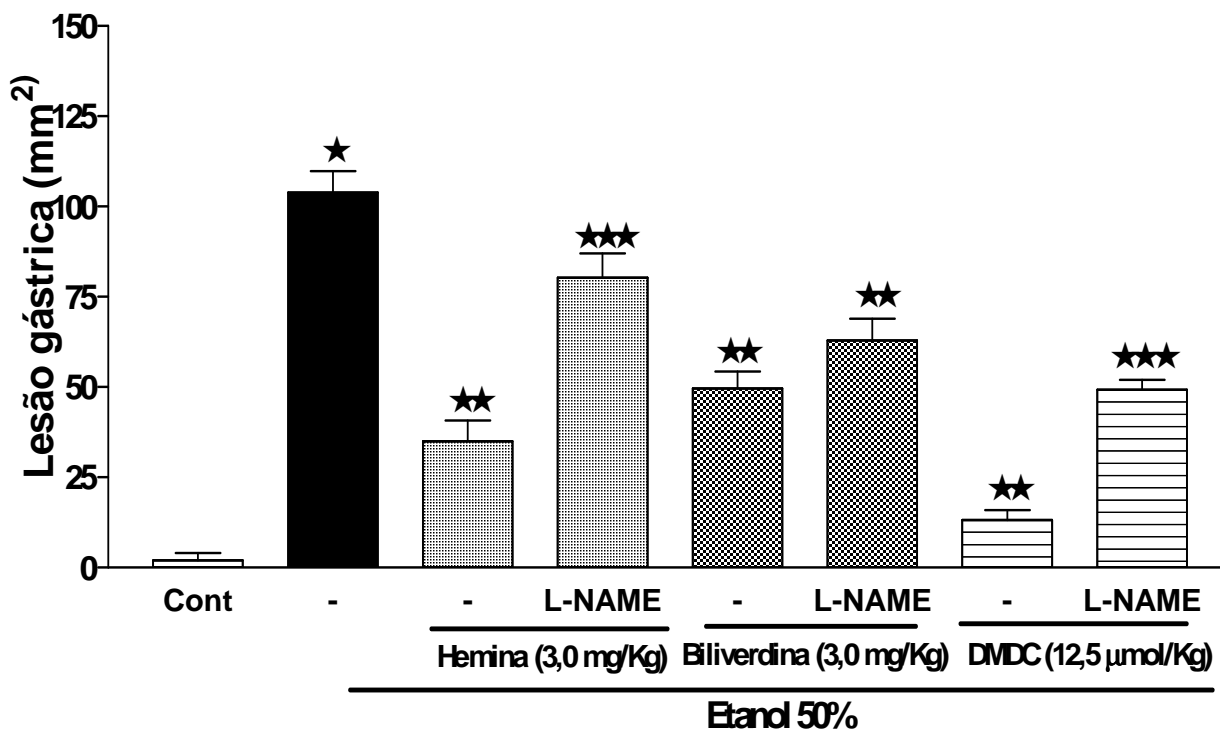
(\*\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo DMDC + etanol 50%.

### **5.1.12 - PAPEL DA NO SINTASE NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NO CURSO DA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL 50%:**

Para determinar o envolvimento da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na gastroproteção induzida pela hemina, biliverdina ou DMDC, os animais foram pré-tratados com L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, na dose de 3,0 mg/Kg. Na figura 11, verifica-se que o L-NAME aboliu completamente o efeito gastroprotetor da hemina e do DMDC na gastropatia por etanol 50% (Figura 11). Por outro lado, esse efeito do L-NAME, não foi observado com o tratamento com biliverdina no modelo de lesão gástrica por etanol 50% (Figura 11).

### **5.1.13 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MALONDIÁLDEIDO (MDA) E DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM L-NAME ASSOCIADO À HEMINA, OU DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA POR ETANOL 50%:**

No curso da gastropatia induzida por etanol a 50%, o co-tratamento com L-NAME + hemina ou L-NAME + DMDC foi acompanhado pelo aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos níveis de MDA e por uma diminuição significativa da concentração de GSH no tecido gástrico quando comparado com o grupo tratado somente com hemina ou DMDC (Tabela 7).



**FIGURA 11 - Papel do da NO sintase no efeito protetor da via HO-1/biliverdina/CO contra lesões induzidas por etanol 50% em camundongos.** Administração de L-NAME foi capaz de reverter a gastroproteção induzida por hemina ou DMDC. Por outro lado, não reverteu a proteção da biliverdina. L-NAME (3,0 mg/Kg, i.p.) foi administrado trinta minutos antes do tratamento com hemina (3,0 mg/Kg, i.p.), biliverdina (3,0 mg/Kg, i.p.), DMDC (12,5 umol/Kg) ou seus respectivos veículos. Depois de 60 minutos, etanol 50% (0,5 ml/Kg) foi administrado por gavagem. O grupo controle foi tratado somente com salina, via oral. A área total de lesões gástricas macroscópicas foi determinada 1 hora após a administração de etanol 50%. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. para grupo de seis animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo etanol 50%. (\*\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo hemina + etanol 50% ou DMDC + etanol 50%. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Newman-keuls.

**Tabela 8 – Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA) e Glutathiona Reduzida (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com L-NAME (3,0 mg/kg), 30 minutos antes da administração da hemina (3,0 mg/Kg) ou decacarbonil dimanganês (DMDC) (12,5 µmol/kg) na gastropatia induzida por etanol 50%.**

		<b>ETANOL 50%</b>				
	<b>Controle</b>	<b>Veículo</b>	<b>Hemina</b>	<b>Hemina+ L-NAME</b>	<b>DMDC</b>	<b>DMDC + L-NAME</b>
<b>MDA (nmol/g de tecido)</b>	31,1 ± 65,1	177.7±9.9*	72.1±2.7**	122,6 ± 14,2***	90.1±12.3**	150,6±15,9***
<b>GSH (µg/g de tecido)</b>	359,7 ± 21,5	56.2±7.6*	140.8±8.2**	99,7 ±32,1***	188.9±8.6**	86,3±12,2***

(\*) p<0,05, quando comparado com o grupo controle

(\*\*) p<0,05, quando comparado com o grupo etanol 50% + veículo.

(\*\*\*) p<0,05, quando comparado com o grupo hemina + etanol 50% ou DMDC + etanol.

## **5.2 – MODELO DE GASTROPATIA POR INDOMETACINA**

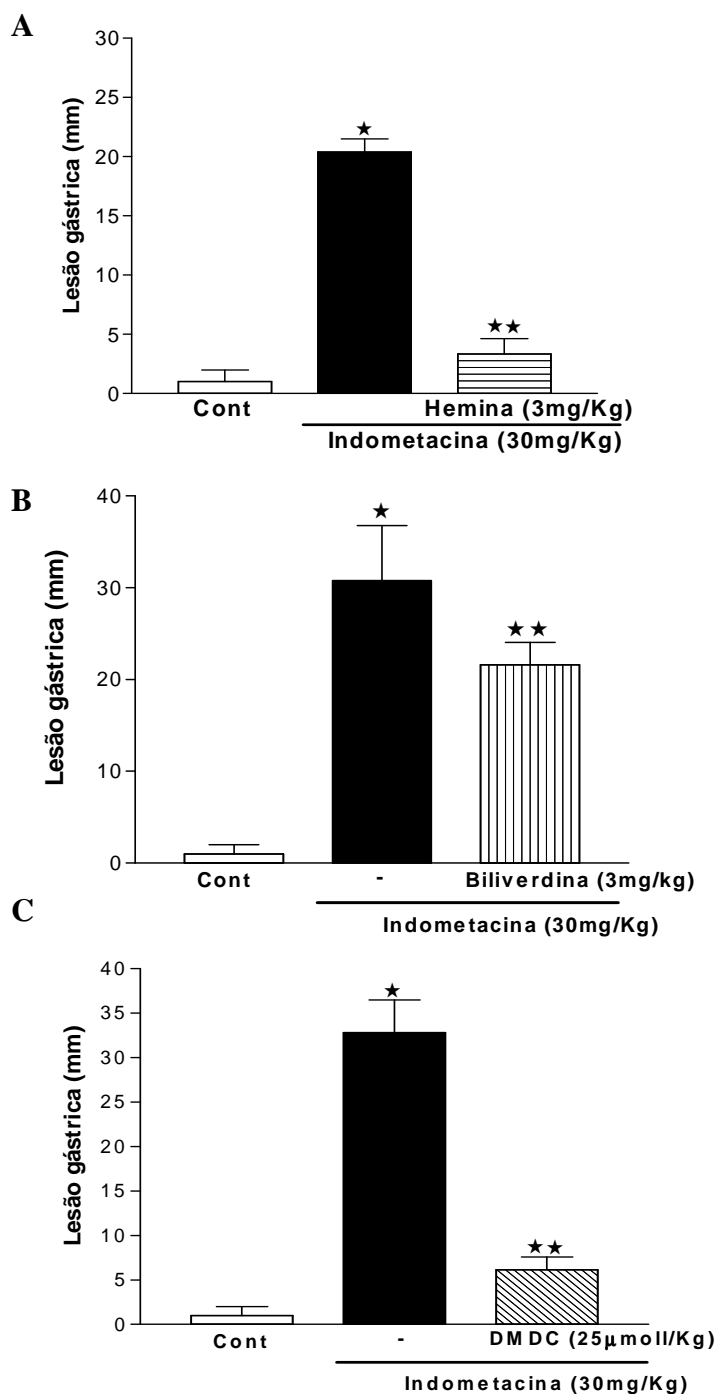
### **5.2.1 - EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DECARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO):**

A administração de INDO resultou no aparecimento de lesões gástricas, quando comparado com o grupo controle (Figura 12). O tratamento com hemina, biliverdina (3 mg/Kg, via i.p.) ou DMDC (12,5  $\mu$ mol/Kg, via i.p.) foi capaz de reverter o efeito lesivo da INDO, diminuindo significativamente a lesão gástrica (Figura 12).

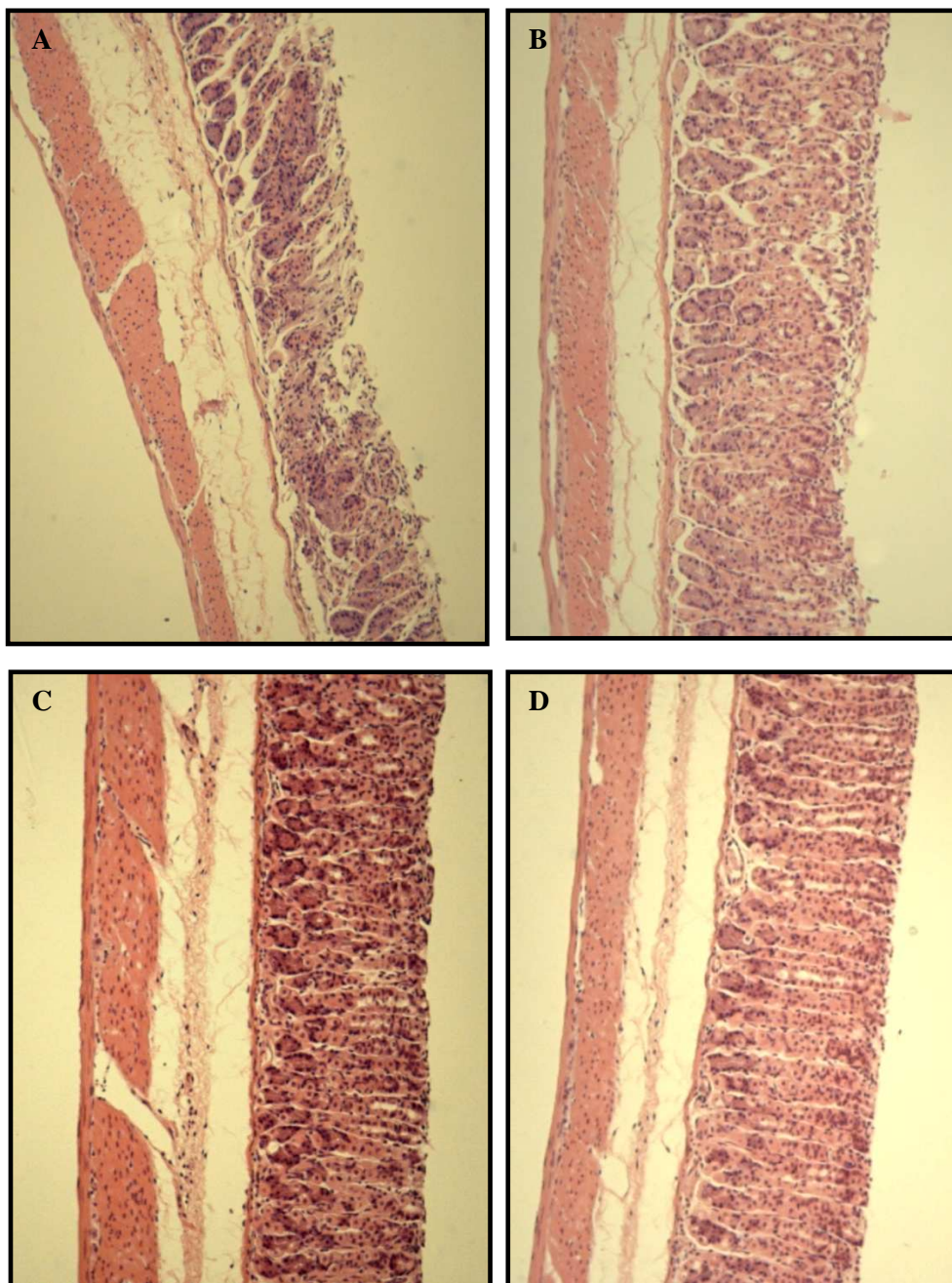
### **5.2.2 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM HEMINA, BILIVERDINA OU DECARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NO MODELO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO):**

Observamos que a INDO, na concentração de 30 mg/kg, por via oral, provocou um desarranjo nas glândulas gástricas com perdas das células epiteliais, edema, hemorragia e intensa infiltração de células inflamatórias (Figura 13, painel A e Tabela 9). Hemina ou biliverdina, nas doses de 3,0 mg/Kg, ou DMDC, na dose de 12,5 $\mu$ mol/Kg, diminuíram de forma significativa os parâmetros avaliados como hemorragia, edema, perda de células epiteliais e a infiltração de células inflamatórias induzidas por INDO (Figura 13, painel B,C,D e Tabela 9).





**FIGURA 12 – Hemina, um indutor da via da HO-1 (painel A), biliverdina (painel B) e decacarbonil dimanganês (DMDC, painel C) preveniram a lesão gástrica induzida por indometacina (INDO). O tratamento dos animais com hemina, biliverdina ou DMDC reduziu a lesão gástrica induzida por INDO. O grupo controle (CONT) foi tratado somente com salina. A área total das lesões gástricas macroscópicas foi determinada 3 horas após a administração de INDO. O resultado foi expresso como média  $\pm$  S.E.M. para grupo de seis animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo INDO. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Newman-Keuls.**



**FIGURA 13 – Avaliação histológica da administração de hemina (painel B), biliverdina (painel C) e do decacarbonil dimanganês (DMDC, painel D) no modelo de gastropatia por indometacina (INDO). Hemina, biliverdina e DMDC diminuíram, de forma significativa, a lesão gástrica microscópica induzida por INDO. Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com: Painel A: grupo INDO (30 mg/Kg, via oral); Painel B: hemina (3 mg/Kg, via i.p.) + INDO (30 mg/Kg, via oral) ; Painel C: biliverdina (10 mg/Kg, via i.p.) + INDO (30 mg/Kg, via oral); Painel D: DMDC (12,5  $\mu$ mol/Kg, via i.p.) + INDO (30 mg/Kg, via oral).**

**Tabela 9 – Avaliação microscópica pelos critérios de Laine (1988) de camundongos pré-tratados com hemina (3,0 mg/kg), biliverdina (3,0 mg/kg) ou decarbonil dimanganês (DMDC) (12,5 µmol/kg) no curso da lesão microscópica induzida por indometacina (INDO) (30 mg/Kg).**

<b>Grupo Experimental (N=6)</b>	<b>Lesão hemorrágica (escore 0 - 4)</b>	<b>Edema (escore 0 - 4)</b>	<b>Perda de células epiteliais (escore 0 - 3)</b>	<b>Células Inflamatórias (escore 0 - 3)</b>	<b>Total (escores 14)</b>
<b>Controle (Salina)</b>	0	0	0	0	0
<b>INDO</b>	4 (2 - 4)*	4 (2 - 4)*	3 (2 - 3)*	3 (2 - 3)*	14(8 - 14)*
<b>Hemina+ INDO</b>	1 (0 - 3)**	1 (0 - 2)**	1 (0 - 1)**	1 (0 - 2)**	4 (0 - 8)**
<b>Biliverdina+ INDO</b>	1 (0 - 2)**	1 (1 - 2)**	1 (1 - 2)**	1 (1 - 3)**	4 (2 - 9)**
<b>DMDC+ INDO</b>	1 (0 - 2)**	1 (1 - 2)**	1 (0 - 2)**	1 (0 - 2)**	4 (1 - 8)**

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

(\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle

(\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo INDO + veículo.

### **5.2.3 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA HEMEOXIGENASE 1 (HO-1) POR IMUNOHISTOQUÍMICA NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM INDOMETACINA (INDO):**

Na Figura 14, observamos uma maior expressão da enzima hemeoxigenase 1 (HO-1), no tecido gástrico dos animais tratados com indometacina 30 mg/kg, pelo método de imunohistoquímica (Painel A), quando comparado ao grupo salina (Painel B). Na mucosa gástrica normal de animais tratados com salina (grupo controle) não foi observado marcação para HO-1 (Figura 14, painel A). Por outro lado, em animais tratados com INDO foi detectado um aumento significativo na marcação para a enzima HO-1, principalmente no endotélio vascular, células epiteliais e células musculares lisas (Figura 14, painel B), quando comparado com o grupo tratado somente com salina (grupo controle).

### **5.2.4 - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MIELOPEROXIDASE (MPO), MALONDÍALDEIDO (MDA) E GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PREVIAMENTE TRATADOS COM HEMINA, BILIVERDINA OU DECACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA INDUZIDA PELA INDOMETACINA (INDO):**

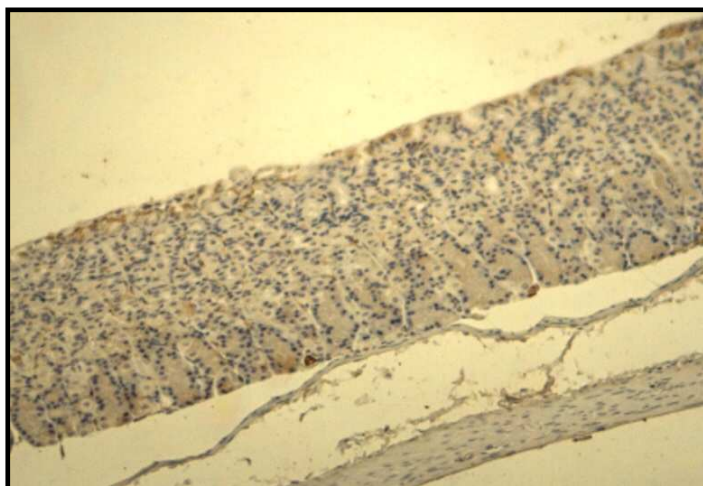
A lesão gástrica por indometacina, na dose de 30 mg/Kg, foi acompanhada por um aumento da atividade de mieloperoxidase (MPO), demonstrando assim uma importante participação de neutrófilos nos processo inflamatório, quando comparado com o grupo controle (animais tratados somente com salina, por via oral) (Tabela 10). Foi observado ainda um aumento significativo dos níveis de MDA ( $p < 0,05$ ) no tecido gástrico, associado com uma redução significativa do GSH, quando comparado com o grupo tratado somente

com salina (grupo controle) (Tabela 10). O tratamento com hemina (3,0 mg/Kg), biliverdina (3,0 mg/Kg) ou DMDC (12,5  $\mu$ mol/Kg), por via intraperitoneal, 1 hora antes da administração da INDO (30 mg/Kg) diminuiu, de forma significativa, a formação de MPO e MDA na mucosa gástrica, quando comparado com o grupo INDO (Tabela 10). Observamos ainda que, o pré-tratamento com hemina, biliverdina ou DMDC provocou um aumento significativo da concentração de GSH no tecido gástrico, quando comparado com o grupo INDO, retornando a níveis semelhantes a dos animais tratados somente com salina (Tabela 10).

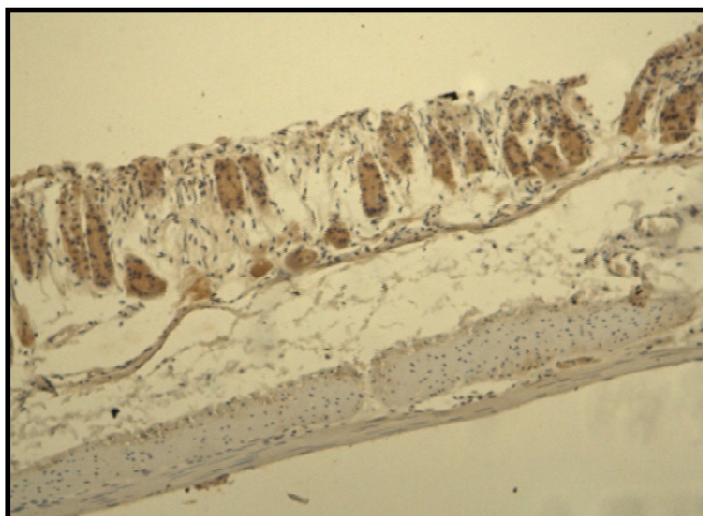
#### **5.2.5 - AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BILIRRUBINA NO TECIDO GÁSTRICO DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM HEMINA, BILIVERDINA OU DECACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA POR INDOMETACINA (INDO):**

Na tabela 11, observamos que a indometacina na dose de 30 mg/kg por gavagem, aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a concentração de bilirrubina na mucosa gástrica, quando comparado com o grupo controle (salina). Administração de hemina (10 mg/Kg) ou biliverdina (10 mg/Kg), aumentou, de forma significativa, os níveis de bilirrubina no tecido gástrico, quando comparado com o grupo INDO (Tabela 11). Por outro lado, o DMDC, na dose de 12,5  $\mu$ mol/Kg, não foi capaz de aumentar os níveis de bilirrubina na mucosa gástrica, quando comparado com o grupo INDO (Tabela 11).

A



B



**FIGURA 14 – Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com INDO.** Painel A: Fotomicrografias da mucosa gástrica (Magnificação, x100) demonstrando ausência de imunoreatividade para a enzima HO-1 em camundongos normais, tratados somente com salina, por via oral (painel A). No painel B foi demonstrado imunoreatividade para a enzima HO-1 no endotélio vascular, epitélio e células musculares lisas no tecido gástrico 1 hora após a administração, por via oral, de indometacina, na dose de 30 mg/Kg.

**Tabela 10 – Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO), malondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com hemina (3,0 mg/kg), biliverdina (3,0 mg/kg) ou decacarbonil dimanganês (DMDC) (12,5 µmol/kg) no curso da contra lesões gástricas induzidas por indometacina (INDO) (30 mg/Kg).**

	INDOMETACINA				
	Controle	Salina	Hemina	Biliverdina	DMDC
<b>MPO ( U de MPO/mg de tecido)</b>	3,9±0.4	24,9±3,3*	8,2±1,2**	16,4±4,0**	8,2±0,9**
<b>MDA (nmol/g de tecido)</b>	79.4 ± 0.6	128,9 ± 6,2*	72.1 ± 2.7**	58,8 ± 4,3**	88,1±11,9**
<b>GSH (µg/g de tecido)</b>	243.4 ± 13.2	58,7 ± 4,7*	112,2 ± 11,07**	275,5 ± 47,5**	186,7±32,2* *

(\*) p<0,05, quando comparado com o grupo controle.

(\*\*) p<0,05, quando comparado com o grupo indometacina + salina.

**Tabela 11 – Determinação dos níveis de bilirrubina na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com hemina (3,0 mg/Kg), biliverdina (3,0 mg/kg) ou decacarbonil dimanganês (DMDC) (12,5 µmol/Kg) no curso das lesões gástricas induzidas por indometacina (INDO) (30 mg/Kg).**

	INDOMETACINA				
	Controle	Salina	Hemina	Biliverdina	DMDC
<b>Bilirrubina (mg/dL)</b>	0,2 ± 0,03	0,7 ± 0,09*	1,0 ± 0,15**	1,5 ± 0,3**	0,8±0,06

(\*) p<0,05, quando comparado com o grupo controle.

(\*\*) p<0,05, quando comparado com o grupo indometacina + salina.



**5.2.6 - DOSAGEM DE TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  E IL-10 NO TECIDO GÁSTRICO DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM HEMINA, BILIVERDINA OU DEACACARONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA POR INDOMETACINA (INDO):**

Na tabela 12, observamos que os animais tratados com INDO, na dose de 30 mg/Kg, apresentaram um aumento na concentração de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , na mucosa gástrica dos animais, quando comparado com o grupo controle (animais tratados somente com salina). Por outro lado, a concentração de IL-10, não se mostrou alterada, quando comparada com o grupo controle (Tabela 12). O tratamento com hemina, Biliverdina ou DMDC diminuiu, de forma significativa, a concentração IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e aumentaram ( $p < 0,05$ ) os níveis de IL-10 na mucosa gástrica de animais submetidos a gastropatia por INDO (Tabela 12).

**Tabela 12 - Determinação da concentração das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 no tecido gástrico de animais tratados com salina (controle), hemina (3,0 mg/kg), biliverdina (3,0 mg/Kg) ou decacarbonil dimanganês (DMDC) (12,5  $\mu$ mol/Kg) durante lesão gástrica induzida por indometacina (30 mg/Kg) em camundongo.**

		<b>INDOMETACINA</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Salina</b>	<b>Hemina</b>	<b>Biliverdina</b>	<b>DMDC</b>
<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/ml)</b>	1840 $\pm$ 213	4007 $\pm$ 275 *	2675 $\pm$ 179 **	2456,4 $\pm$ 124**	3046 $\pm$ 429 **
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	986,8 $\pm$ 74,5	1527 $\pm$ 159*	1099 $\pm$ 121**	979,9 $\pm$ 114**	1035 $\pm$ 77,3 **
<b>IL-10 (pg/ml)</b>	897,3 $\pm$ 45,1	970,7 $\pm$ 32,6	1482 $\pm$ 200**	1558,8 $\pm$ 144**	1490 $\pm$ 114**

(\*) p<0,05, quando comparado com o grupo controle.

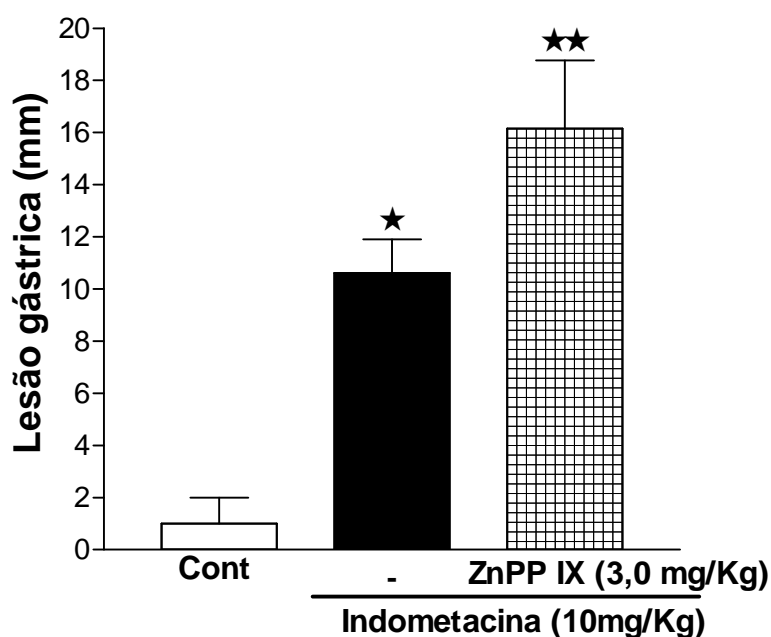
(\*\*) p<0,05, quando comparado com o grupo indometacina + veículo.

### **5.2.7 - EFEITO DO ZINCO PROTOPORFIRIM IX (ZnPP IX) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO):**

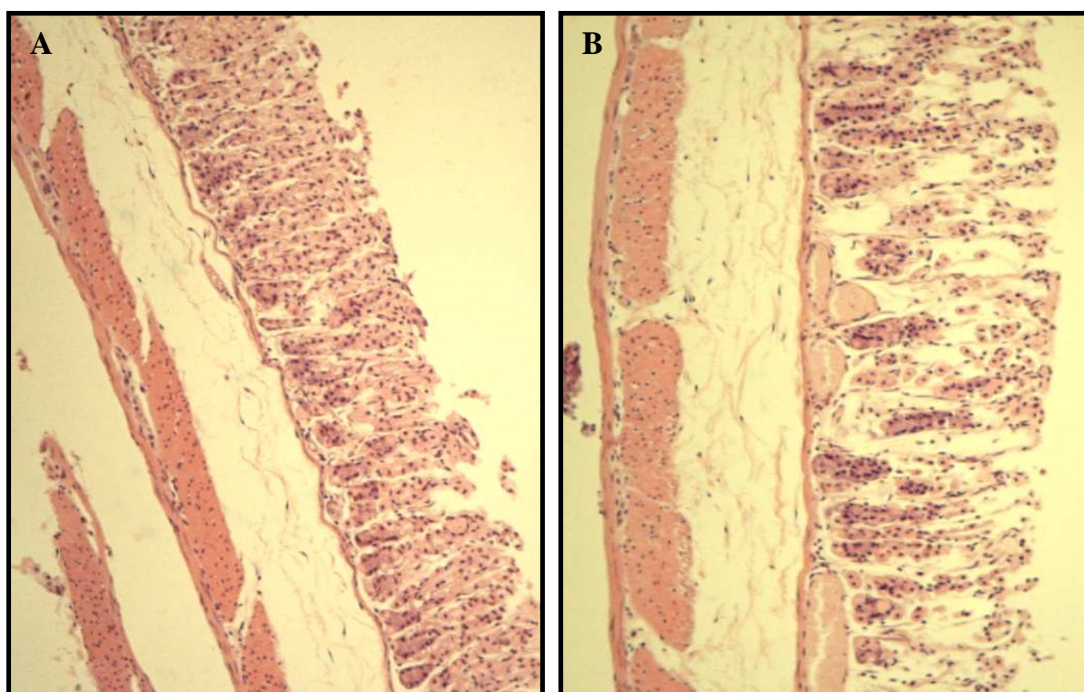
Na Figura 15, observar-SE que a administração, por gavagem, Indometacina, na dose de 10 mg/Kg resultou em lesões na mucosa gástrica ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o grupo tratado com salina (grupo controle). A inibição da enzima HO-1 pelo ZnPP IX amplificou de maneira significativa as lesões gástricas induzida pela INDO

### **5.2.8 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ZINCO PROTOPORFIRIM IX (ZnPP IX) NO MODELO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO):**

INDO, na dose de 10 mg/Kg., provocou hemorragia, edema, infiltração de células inflamatórias e perda de células epiteliais (Figura 16, painel B e Tabela 13), quando comparado com o grupo controle tratado somente com salina (Figura 16, painel A e Tabela 5). ZnPP IX, potencializou o efeito lesivo da INDO amplificando a lesão microscópica provocada pela INDO (Figura 16, painel B e Tabela 13), quando comparado com o grupo controle tratado com INDO (Figura 16, painel B e Tabela 13).



**FIGURA 15 – Zinco protoporfirin IX (ZnPP IX) aumentou significativamente a lesão induzida por indometacina na mucosa gástrica de camundongos.** O pré-tratamento dos animais com ZnPP IX, um inibidor da enzima HO-1, 1 hora antes da administração da indometacina (INDO), na dose de 3,0 mg/Kg (via i.p.) aumentou, de forma significativa, a lesão gástrica induzida indometacina (10 mg/Kg, via oral). O grupo controle (Cont) foi tratado somente com salina. A área total de lesões gástricas macroscópicas foi determinada 3 hora após a administração de indometacina na dose de 10 mg/Kg. O resultado foi expresso como média  $\pm$  S.E.M. para grupo de seis animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo INDO. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Newman-keuls.



**FIGURA 16 – Efeito microscópico da administração do zinco protoporfirim IX (ZnPP IX) na gastropatia induzida por indometacina (INDO).** ZnPP IX, um inibidor da enzima hemeoxigenase 1 (HO-1), amplificou o efeito lesivo da indometacina (10 mg/Kg, via oral) aumentando, de forma significativa, a lesão gástrica induzida pela INDO na mucosa gástrica de camundongos. Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos tratados com: Painei A: INDO (10 mg/Kg) via oral. Painei B: grupo tratado com ZnPP IX (3 mg/Kg, via i.p.) + INDO (10 mg/Kg, via oral).

**Tabela 13 - Avaliação microscópica pelos escores de Laine et al., (1988) da mucosa gástrica de camundongos pré-tratados zinco protoporfirin IX (ZnPP IX) (3 mg/Kg) nas lesões induzidas por indometacina (INDO) (10 mg/Kg).**

<b>Grupo Experimental (N=6)</b>	<b>Lesão hemorrágica (escore 0 - 4)</b>	<b>Edema (escore 0 - 4)</b>	<b>Perda de células epiteliais (escore 0 - 3)</b>	<b>Células Inflamatórias (escore 0 - 3)</b>	<b>Total (escores 14)</b>
<b>Controle (Salina)</b>	0	0	0	0	0
<b>INDO</b>	3(2-3)*	2(2-3)*	2(2-3)*	2(1-3)*	9(7-12)*
<b>ZnPP IX + INDO</b>	4(3-4)**	4(3-4)**	3(2-3)**	3(2-3)**	14(10-14)**

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

(\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle

(\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo INDO + veículo.

**5.2.9 - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MIELOPEROXIDASE (MPO), MALONDÍALDEIDO (MDA) E DOS GRUPOS SUFIDRÍLICOS NÃO PROTÉICOS (GLUTATIONA – GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PREVIAMENTE TRATADOS COM ZINCO PROTOPORFIRIN IX (ZnPP IX) NA GASTROPATIA INDUZIDA PELA INDOMETACINA (INDO):**

Na tabela 14, INDO, na dose de 10 mg/Kg, por via oral, provocou um aumento significativo da atividade de MPO e de MDA ( $p < 0,05$ ) e uma diminuição da concentração de GSH, quando comparado com o grupo controle (Tabela 14). O tratamento com ZnPP IX potencializou o efeito da INDO, aumentando a concentração de MPO e MDA ( $p < 0,05$ ) e diminuindo, ainda mais, os níveis de GSH na mucosa gástrica, quando comparado com o grupo INDO (Tabela 14).

**5.2.10 - AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BILIRRUBINA NO TECIDO GÁSTRICO DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM ZINCO PROTOPORFIRIM IX (ZnPP IX) NO MODELO DE GASTROPATIA POR INDOMETACINA (INDO):**

Na tabela 15, podemos observar que o aumento do efeito lesivo da INDO após administração de ZnPP IX não alterou a concentração de bilirrubina no tecido gástrico, quando comparado com o grupo INDO.

**Tabela 14 – Determinação dos níveis de Mieloperoxidase (MPO), Malondialdeído (MDA) e Glutathiona Reduzida (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com zinco protoporfirin IX (ZnPP IX) (3 mg/Kg) nas lesões gástricas induzidas por indometacina (INDO) (10 mg/kg).**

	Controle	INDOMETACINA	
		Veículo	ZnPP IX
<b>MPO ( U de MPO/mg de tecido)</b>	3.9±0,4	7,7±0,5*	12,7±2,1**
<b>MDA (nmol/g de tecido)</b>	74,9±6,9	121,2±3,6*	172,0±7,5**
<b>GSH (µg/g de tecido)</b>	182.1±33	129,0±11,6 *	79,7±5,2**

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

(\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle

(\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo indometacina + veículo.



**Tabela 15 – Determinação dos níveis de bilirrubina na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com Zinco protoporfirim IX (ZnPP IX), na dose de 3 mg/Kg na gastropatia induzidas por indometacina (10 mg/Kg).**

		<b>INDOMETACINA</b>	
	<b>Controle</b>	<b>Veículo</b>	<b>ZnPP IX</b>
<b>Bilirrubina (mg/dL)</b>	0,31±0,06	0,42±0,03*	0,44±0,07*

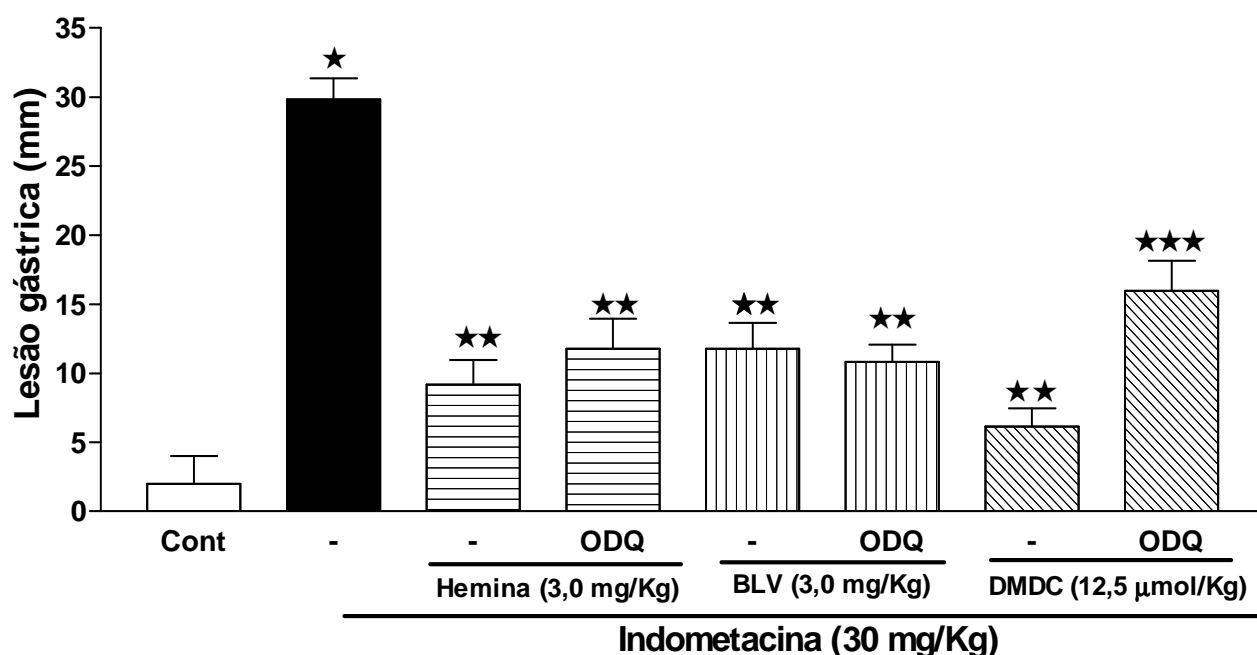
(\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (salina).

**5.2.11 - PAPEL DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (GCs) NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO) EM CAMUNDONGOS:**

A fim de determinar o envolvimento da guanilato ciclase na gastroproteção induzida pela hemina, biliverdina ou DMDC, os animais foram pré-tratados com ODQ, um inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (cGMP). Na figura 17, verifica-se que o ODQ aboliu completamente o efeito gastroprotetor do DMDC na lesão gástrica induzida por INDO, na dose de 30 mg/kg. Por outro lado, esse efeito não foi observado nos animais pré-tratados com hemina ou biliverdina (Figura 17).

**5.2.12 - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MIELOPEROXIDASE (MPO), MALONDIÁLDEIDO (MDA) E DOS GRUPOS SUFIDRÍLICOS NÃO PROTÉICOS (GLUTATIONA – GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM ODQ ASSOCIADO À DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO):**

A reversão do efeito gastroprotetor do DMDC pelo ODQ, foi acompanhado do aumento dos níveis de MPO e MDA e por uma diminuição importante da concentração de GSH na mucosa gástrica, retornando a níveis semelhantes aos dos animais tratados somente com INDO (30 mg/Kg, por via oral) (Tabela 16).



**FIGURA 17 - Papel da guanilato ciclase solúvel no efeito gastroprotetor da via HO-1/biliverdina/CO contra lesões induzidas por indometacina (INDO) em camundongos.** ODQ, um inibidor da guanilato ciclase solúvel (GMPc) foi capaz de reverter a gastroproteção induzida por DMDC, mas não reverteu a proteção da hemina e da biliverdina. ODQ (12,5 µmol/Kg, i.p.) foi administrado trinta minutos antes do tratamento com hemina (3,0 mg/Kg, i.p.), biliverdina (3,0 mg/Kg, i.p.), DMDC (12,5 µmol/Kg) ou seus respectivos veículos. Depois de 30 minutos, indometacina foi administrada por gavagem. O grupo controle foi tratado somente com salina, via oral. A área total de lesões gástricas macroscópicas foi determinada 3 horas após a administração de indometacina (30 mg/Kg). Os resultados foram expressos como média ± S.E.M. para grupo de seis animais por grupo. (\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo INDO (\*\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo DMDC + INDO. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Newman-keuls.

**Tabela 16 – Determinação dos níveis de Mieloperoxidase (MPO), Malondialdeído (MDA) e Glutathiona Reduzida (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com ODQ (12,5 mg/kg), 30 minutos antes da administração de decacarbonil dimanganês (DMDC) (12,5  $\mu$ mol/kg) na gastropatia induzida por indometacina (INDO) (30 mg/Kg).**

	<b>INDOMETACINA</b>			
	<b>Controle</b>	<b>Veículo</b>	<b>DMDC</b>	<b>DMDC + ODQ</b>
<b>MPO ( U/mg de tecido)</b>	4,2 $\pm$ 0.2	32,4 $\pm$ 0,9*	8,2 $\pm$ 0,9**	29,7 $\pm$ 1,8***
<b>MDA (nmol/g de tecido)</b>	56.7 $\pm$ 0.7	134,1 $\pm$ 5,9*	88,1 $\pm$ 11,9**	128,9 $\pm$ 9,4***
<b>GSH (<math>\mu</math>g/g de tecido)</b>	211,9 $\pm$ 11,5	42,7 $\pm$ 2,7*	186,7 $\pm$ 32,2**	64,6 $\pm$ 19,2***

(\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle

(\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo INDO + veículo.

(\*\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo DMDC + INDO.

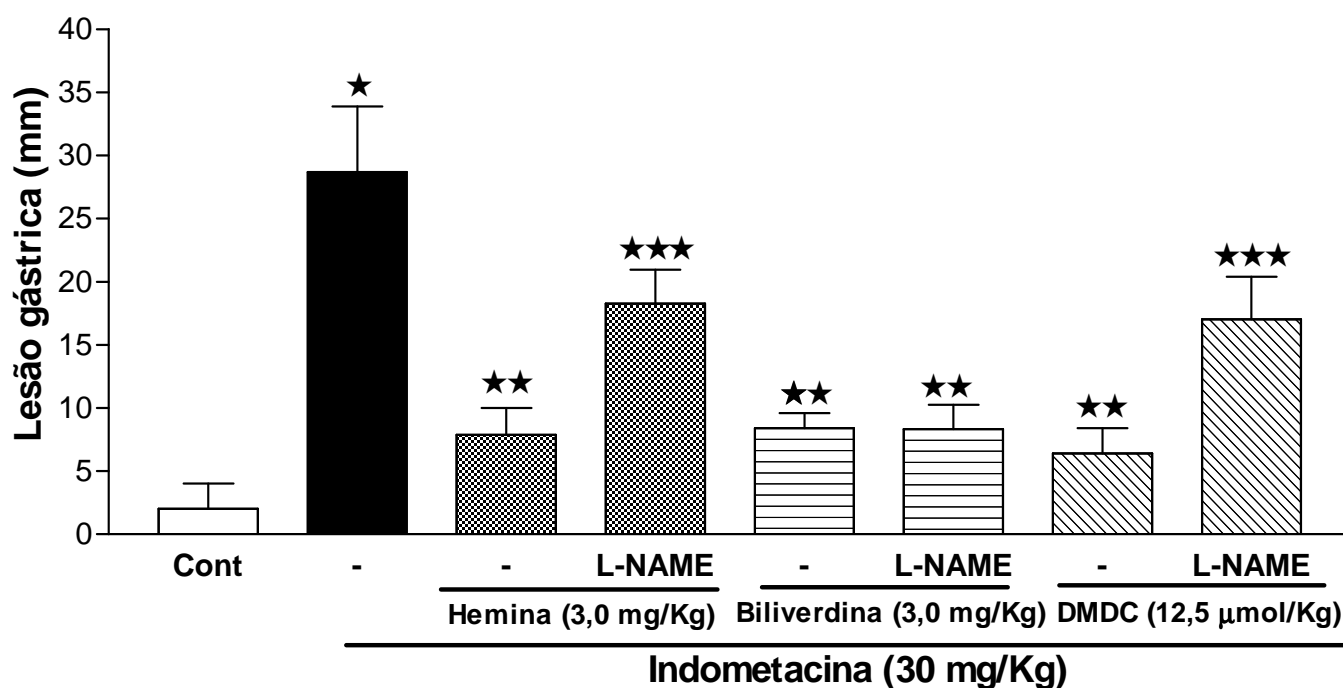
### **5.2.13 - PAPEL DA NO SINTASE NO EFEITO PROTETOR DA HEMINA, BILIVERDINA OU DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO) EM CAMUNDONGOS**

L-NAME, um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS) induzida, foi utilizado para verificar a participação do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da hemina, biliverdina ou DMDC. Animais pré-tratados com L-NAME, na dose de 3,0 mg/Kg, reverteu completamente o efeito protetor da hemina e do DMDC no modelo de gastropatia induzida por INDO. L-NAME promoveu um aumento significativo das lesões na mucosa gástrica de animais tratados com hemina ou DMDC quando comparado com os grupos hemina mais INDO ou DMDC mais INDO, respectivamente (Figura 18). Avaliando o efeito da administração de biliverdina, o L-NAME, na mesma dose testada, não foi capaz de reverter o efeito protetor da biliverdina na gastropatia induzida por INDO (Figura 18).

### **5.2.14 - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MIELOPEROXIDASE (MPO), MALONDIALDEÍDO (MDA) E DOS GRUPOS SUFIDRÍLICOS NÃO PROTÉICOS (GLUTATIONA – GSH) NA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM L-NAME ASSOCIADO À HEMINA, BILIVERDINA (BLV) OU DEACACARBONIL DIMANGANÊS (DMDC) NA GASTROPATIA INDUZIDA POR INDOMETACINA (INDO)**

No curso da gastropatia induzida por INDO 30 mg/Kg o co-tratamento com L-NAME + hemina ou L-NAME + DMDC foi acompanhado pelo aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da atividade de MPO e dos níveis de MDA, associada por uma diminuição

significativa da concentração de GSH no tecido gástrico quando comparado com o grupo tratado somente com hemina ou DMDC (Tabela 17).



**FIGURA 18 - Papel da NO sintase no efeito protetor da via HO-1/biliverdina/CO contra lesões induzidas por indometacina (INDO) em camundongos.** Administração de L-NAME, um inibidor da NO sintase, foi capaz de reverter a gastroproteção induzida por hemina ou DMDC. Por outro lado, não reverteu o papel protetor da biliverdina. L-NAME (3,0 mg/Kg, i.p.) foi administrado trinta minutos antes do tratamento com hemina (3,0 mg/Kg, i.p.), biliverdina (3,0 mg/Kg, i.p.), DMDC (12,5 µmol/Kg) ou seus respectivos veículos. Depois de 60 minutos, INDO (30 mg/Kg) foi administrado por gavagem. O grupo controle foi tratado somente com salina, via oral. A área total de lesões gástricas macroscópicas foi determinada 3 horas após a administração de INDO. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. para grupo de seis animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo indometacina. (\*\*\*)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo hemina + INDO ou DMDC + INDO. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Newman-keuls.

**Tabela 17 – Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO), malondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH) no tecido gástrico de camundongos pré-tratados com L-NAME (3,0 mg/kg), 30 minutos antes da administração de hemina (3,0 mg/Kg) ou decaarbonil dimanganês (DMDC) (12,5 µmol/kg) na gastropatia induzida por indometacina (30 mg/Kg).**

		INDOMETACINA				
	Controle	Veículo	Hemina	Hemina + L-NAME	DMDC	DMDC + L-NAME
<b>MPO ( U/mg de tecido)</b>	4,2 ± 0,2	34,1 ± 0,9*	8,2 ± 1,2**	11,3 ± 0,9***	8,2 ± 0,9**	27,2 ± 2,4***
<b>MDA (nmol/g de tecido)</b>	56,7 ± 0,7	142,1 ± 7,2*	72,1 ± 2,7**	126,5 ± 6,5***	88,1 ± 11,9**	133,5 ± 8,4***
<b>GSH (µg/g de tecido)</b>	211,9 ± 11,5	42,7 ± 2,7*	112,2 ± 11,07**	71,7 ± 9,4***	186,7 ± 32,2**	78,3 ± 5,2***

(\*) p<0,05, quando comparado com o grupo controle

(\*\*) p<0,05, quando comparado com o grupo INDO + veículo.

(\*\*\*) p<0,05, quando comparado com o grupo hemina + INDO ou DMDC + INDO.



## 6. DISCUSSÃO

As doenças do trato gastrintestinal relacionadas ao consumo excessivo de etanol e AINEs, possuem um importante papel na gastroenterologia clínica. Pacientes que fazem consumo abusivo de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) ou etanol possuem uma maior predisposição de vir a ter gastrite hemorrágica aguda. O foco da farmacoterapia atual tem sido reduzir a secreção gástrica ácida (CHAMBERLAIN, 1993). Devido a um crescente aumento no consumo de etanol e de AINEs em todas as classes sociais, temos que reconhecer que há uma necessidade enorme de pesquisas que visem à compreensão das doenças ligadas ao uso exagerado dessas substâncias e tentar desenvolver estratégias efetivas para prevenir e tratar os diferentes tipos de doenças do estômago.

A reconstituição epitelial é extremamente importante na manutenção da estrutura e funcionamento da barreira mucosa. A formação dos radicais livres e a liberação de mediadores inflamatórios reduzem a taxa de proliferação celular dificultando o processo de reconstituição das células gástricas. Por outro lado, o epitélio gástrico é recoberto por um espesso muco que impede a retrodifusão dos íons  $H^+$ . O rompimento da barreira da mucosa pelo refluxo de bile, uremia, etanol ou pelo uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) aumentam a permeabilidade da mucosa e permitem a retrodifusão do íon  $H^+$ , aumentando a acidose tecidual (BEEJAY & WOLFE, 2000). A alteração no fluxo sanguíneo da mucosa é um outro fator de grande importância na gênese das injúrias gástricas. O fluxo sanguíneo pode ser profundamente alterado por ação de drogas/toxinas, como o ácido acetil salicílico, etanol e pela entrada de agentes luminiais, como ácido e pepsina (ROBBINS, 1998). A cicatrização das lesões fica comprometida devido à redução do fluxo sanguíneo na mucosa causada por estes agentes (BOOTHE, 1999). Outro fator envolvido na lesão gástrica é o refluxo do conteúdo duodenal que ocorre levando a

exposição da mucosa à pepsina e aos ácidos biliares, promovendo assim, a formação dos radicais livres, lesão oxidativa da mucosa e rompimento vascular pela ativação de mediadores inflamatórios como: Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ou das interleucinas pro-inflamatórias (BEEJAY & WOLFE, 2000).

Embora existam muitos produtos disponíveis no mercado para o tratamento das patologias gástricas como: antiácidos, inibidores da bomba de prótons e bloqueadores H<sub>2</sub>, algumas dessas drogas apresenta reações adversas, como ginecosmatia, alterações hematopoiéticas, nefrite intestinal aguda (RA & TOBE, 2004), trombocitopenia (ZLABEK & ANDERSON, 2002), reações anafiláticas, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (FISHER & LE COUTEUR, 2001) e todas necessitam de um período de 4 semanas para concretizar a cicatrização das lesões. Dessa forma, um tratamento eficaz contra a gastropatia por etanol ou de AINES poderia ser encontrado investigando os mecanismos pelo quais esses compostos promovem lesão na mucosa ou a correção das falhas induzidas por elas, assim possibilitando uma maior rapidez para a cicatrização da mucosa.

Os modelos animais desempenham um papel importante na busca de novas drogas com ação gastroprotetoras. Considerando que a etiologia das úlceras é multifatorial, as lesões na mucosa gástrica podem ser induzidas, utilizando diversos mecanismos (SAMONINA et al., 2004). Alguns dos modelos agudos mais utilizados para avaliação de substâncias antiulcerogênicas em animais são as lesões gástricas induzidas por etanol ou por INDO, pois são capazes de reproduzir as principais características fisiopatológicas da gastrite em humanos (BODE & BODE, 2001; MACMATH TL, 1990; SANTOS & RAO, 2001).

No trato gastrintestinal, as complicações mais graves associadas à utilização de etanol são: gastrites, úlcera gástrica, refluxo gastro-esofágico, diarreia e pancreatite

crônica. As lesões gástricas provocadas pelo etanol ocorrem por uma redução da secreção de bicarbonato e muco protetor, ficando a mucosa exposta à ação hidrolítica e proteolítica do ácido clorídrico e da pepsina, respectivamente. O etanol também promove o aumento da secreção ácida e alteração da vascularização na mucosa do estômago, devido ao rompimento da vascularização local com diminuição do fluxo sanguíneo (OATES & HAKKINEN, 1988). No estômago propriamente dito encontramos a gastrite e úlceras gástricas, caracterizadas pela presença de edema, hemorragia, infiltrado de células inflamatórias e aumento da permeabilidade celular (BODE & BODE, 2001; MACMATH TL, 1990; SANTOS & RAO, 2001).

No modelo de lesão gástrica induzida por AINEs, como a INDO observamos um aumento da inflamação principalmente na mucosa gástrica. A INDO inibe a biossíntese de prostaglandinas do estômago, especificamente a PGI<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>, diminuindo assim os mecanismos de defesa do estômago, tornando este órgão mais vulnerável à lesão. O conhecimento da fisiopatologia da lesão gástrica por AINEs, bem como dos mecanismos envolvidos na defesa da mucosa gástrica a agressões externa, contribui para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento e profilaxia desta complicação.

No presente trabalho, nós demonstramos que a administração de etanol resultou em lesões hemorrágicas no tecido gástrico de camundongos e através das análises histopatológicas, nós observamos que a lesão foi acompanhada por uma intensa hemorragia, edema e desarranjo nas glândulas gástricas com perdas das células epiteliais. De acordo com a literatura, a lesão gástrica induzida por etanol ocorre predominantemente na porção glandular do estômago e devido a sua ação necrotizante promove a formação de graves lesões, acompanhadas de hemorragias, progredindo para destruição total do tecido (LACY, 1988), sendo as lesões histopatológicas mais evidenciadas as congestões, edema,

hemorragia, erosão e necrose (AL-SHABANAH et al., 2000; LA CASA et al., 2000). Na lesão gástrica por etanol, outros autores mostraram a presença de hemorragias subepiteliais focais na mucosa devido à ação direta dos efeitos tóxicos do etanol e indireta dos mediadores como cicloxigenase, citocinas, radicais livres e outras moléculas de sinalização, provocando inflamação ou apoptose ou redução do fluxo sanguíneo no tecido gástrico (LEE et al., 2005; SZABO et al., 1985). Em nosso modelo de lesão por etanol, não observamos a presença de infiltrado de células inflamatórias na mucosa gástrica. Isso pode ser explicado pelo fato da lesão ser avaliada 1 hora após a administração do etanol. Entretanto, alguns trabalhos publicados relatam que lesões avaliadas 3 horas após a administração do etanol podem ser acompanhada por um da migração de células inflamatórias para a mucosa gástrica (LIEBER, 1997; LEE et al., 2005). Em relação à gastropatia por INDO já se conhece a capacidade dos AINEs em reduzir o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica e aumentar a adesão de leucócitos ao endotélio, sendo assim um modelo onde ocorre uma nítida participação dos neutrófilos (KITAHORA et al., 1987; GANA et al., 1986; WALLACE, 1997). Nossos resultados demonstraram que a administração de INDO resultou no aparecimento de lesões gástricas importantes no estômago nos camundongos. Após uma avaliação histológica, nós observamos à presença de perdas das células epiteliais, edema, hemorragia e intensa infiltração de células inflamatórias. Seguindo com o propósito de confirmar a participação das células inflamatórias no curso da lesão induzida por INDO realizamos a dosagem de MPO e verificamos um aumento significativo dos níveis de MPO no tecido gástrico. Dessa forma podemos inferir que os modelos de lesão gástrica aguda que estamos utilizando em nossos experimentos cursam por vias diferentes, no qual se observou a presença de um infiltrado neutrofílico na gastropatia por INDO, dado este não observado na lesão gástrica induzida por etanol.

O papel dos radicais livres derivados do oxigênio (ROS) no desenvolvimento da lesão gástrica induzida por agentes químicos é bem documentada e envolve um aumento do estresse oxidativo, com geração de espécies reativas do oxigênio, e uma diminuição do mecanismo de defesa antioxidante (JONSSON et al., 2007). Os ROS são lesivos por apresentar uma variedade de mecanismos, dentre eles a peroxidação de lipídeos nas membranas celulares, promovendo alteração na permeabilidade e fluidez da membrana, prejudicando as funções dos receptores, canais iônicos e outras proteínas que fazem parte das membranas (FREEMAN & CRAPO, 1982). No mecanismo de proteção conhecido como defesa antioxidante é possível encontrar compostos químicos como, por exemplo, vitamina E,  $\beta$ -caroteno, selênio, ácido ascórbico (vitamina C), glutathione reduzida (GSH) que diminuem a ação tóxica das ROS e proteínas (enzimas) antioxidantes como as superóxido dismutases, catalase e glutathione peroxidase (YU, 1994). Baseado nos resultados obtidos em nossos experimentos, nós demonstramos que a administração de etanol ou INDO causou um aumento importante da peroxidação lipídica, determinada através do aumento da concentração de MDA e de uma diminuição dos níveis glutathione (GSH) no tecido gástrico. Corroborando com nossos resultados, estudos experimentais têm demonstrado que a geração de radicais livres associadas à patogênese de lesões gástricas induzidas por etanol ou INDO medeia à injúria no tecido estimulando a peroxidação dos lipídios, provocando danos na membrana celular através da coagulação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Ademais, compostos sulfidrílicos, como a glutathione, são importantes no reparo de danos celulares quando agentes oxidantes estão envolvidos no processo de injúria (JONSSON et al., 2007). Repetto et al. demonstraram que etanol induz o estresse oxidativo, com conseqüente aumento da peroxidação lipídica, aumentando os níveis de MDA e depleção dos níveis de GSH (REPETTO et al., 2002). Outro ponto importante como conseqüência da peroxidação lipídica e a ativação de NF- $\kappa$ B nas células

musculares lisas e endoteliais é a presença de uma intensa hemorragia e edema, parâmetros característicos da lesão gástrica induzida por etanol e INDO, respectivamente (ALTURA & GEBREWOLD, 2002; JOSSON & PALMBLAD, 2001).

Além de verificar a participação dos neutrófilos no curso da lesão por INDO, verificamos, também, a participação das citocinas pró-inflamatórias. Acredita-se que citocinas pró-inflamatórias como, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sejam mediadores importantes na gastropatia induzida por AINEs (SANTUCCI et al., 1995). Nossos resultados estão, novamente, de acordo com a literatura, na qual observamos que os animais tratados com INDO, apresentaram um aumento na concentração de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no tecido gástrico. Por outro lado, a concentração de IL-10, não se mostrou alterada nesse modelo de gastropatia.

A heme oxigenase do tipo 1 (HO-1) é uma enzima microsossomal que cataliza a degradação do heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e ferro (Abraham NG et al,1988). Alguns trabalhos têm demonstrado que a indução da enzima HO-1 promove uma proteção celular contra injúria oxidativa envolvendo diferentes mecanismos, como o controle dos níveis intracelulares de heme livre (ação anti-oxidante), produção de biliverdina (ação anti-oxidante), melhor perfusão nutritiva via liberação de CO e induz a síntese de ferritina (BAUER & BAUER, 2002) através da liberação de ferro livre (RYTER & TYRRELL, 2000). Foi demonstrado que o heme é capaz de estimular a produção de radicais livres, a expressão de moléculas de adesão e a infiltração de neutrófilos para o sítio lesado (SHONO T et al, 1996). Por outro lado, pequenas concentrações do heme podem possuir efeitos antiinflamatórios e citoprotetores importantes, através do aumento da expressão da HO-1 e estimulação da formação de HO-1 e seus produtos, como o CO e biliverdina (BELCHER et al, 2006). Wang et al. demonstrou que a administração de um

indutor da via HO-1 (SnMP) foi capaz de proteger a mucosa colônica de lesões induzidas por TNBS, por um mecanismo dependente do aumento da expressão de HO-1 (WANG et al., 2001). Administração intracolônica de 5-ASA aumentou a expressão da HO-1 e promoveu uma proteção contra lesões colônicas induzidas por TNBS (HORVÁTH et al., 2008). Erbil et al. sugeriu que a proteção induzida por octreotide no modelo de colite induzido por TNBS em ratos é dependente da ação da enzima HO-1 (ERBIL et al., 2007). Não só em modelos experimentais animais, mas também pacientes com colite ulcerativa foram observados um aumento da expressão da HO-1 na mucosa colônica (TAKAGI et al., 2008). As razões acima citadas justificam a necessidade de um estudo mais detalhado da via da via HO-1/biliverdina/CO em modelos de lesões gástricas experimentais.

Em nossos modelos experimentais de lesões gástricas agudas, utilizando imunomarcadores específicos, nos observamos um aumento da expressão da enzima HO-1 na mucosa gástrica de animais tratados tanto com etanol ou INDO, principalmente no endotélio vascular, células epiteliais e células musculares lisas. Corroborando com esse resultado, nós observamos, por PCR, um aumento na transcrição do mRNA para HO-1 na mucosa gástrica após a administração do etanol. A expressão do gene da HO-1 é fortemente induzida por agentes ou condições que aumentam o estresse oxidativo incluindo LPS, metais pesados, hipóxia, choque térmico, isquemia, radiação, óxido nítrico, citocinas, inflamação e o próprio substrato, heme (MAINES et al., 1997). A presença da hemoglobina decorrente da hemorragia presente na mucosa induzida por etanol ou INDO, pode atuar como uma molécula pró-inflamatória, aumentando a atividade da HO-1 no tecido gástrico (OU HS et al., 1999). Estes dados estão coerentes com os nossos resultados, os quais mostram um aumento da imunomarcagem de enzima HO-1 nos dois modelos de gastropatia estudados. O heme é importante no controle da expressão de várias proteínas,

como globinas, enzimas envolvidas na síntese do próprio heme, citocromos, mieloperoxidase, hemeoxigenase-1e receptores de transferrina. Além disso, o heme e indispensável em outros sistemas enzimáticos, como cicloxigenase e óxido nítrico sintase (NOS) (WAGENER et al., 2003). Em 2008, Ueda et al. demonstrou que a administração de ácido clorídrico (HCl) causou um aumento na expressão de mRNA para HO-1 na mucosa gástrica (UEDA et al., 2008). Alguns trabalhos publicados demonstraram um aumento substancial da expressão de HO-1 e da resposta inflamatória em modelo de colite induzido por TNBS (VARGAS et al., 2007; ERBIL et al., 2007). Administração intracolônica de 5-ASA aumentou tanto a expressão da HO-1 como também a atividade enzimática de HO-1 (HORVÁTH et al., 2008). Em modelo de lesão hepática, também foi observado o aumento da expressão de HO-1 (FAROMBI & SURH, 2006). Não só em modelos experimentais animais, mas também pacientes com colite ulcerativa foram observados um aumento da expressão da HO-1 na mucosa colônica (TAKAGI et al., 2008).

A bilirrubina é um dos principais componentes das defesas antioxidantes e vários estudos vêm demonstrando relação inversa entre níveis de bilirrubina e doenças relacionadas com estresse oxidativo. A administração de etanol ou INDO causou um aumento de lesões na mucosa gástrica acompanhadas por um aumento da concentração do pigmento da bile, determinado através da dosagem de bilirrubina no tecido gástrico. Diante disso, podemos sugerir que o aumento da concentração de bilirrubina encontrada na mucosa gástrica dos camundongos tratados com etanol ou INDO é devido ao aumento da expressão da enzima HO-1, pois bilirrubina é um produto do catabolismo enzimático da biliverdina (produto da HO-1) que sobre ação da ação biliverdina redutase é convertida em bilirrubina.



No modelo de lesão gástrica induzida por etanol ou INDO, hemina (uma droga indutora da enzima HO-1), biliverdina (um produto da via HO-1) ou DMDC (uma droga doadora de CO) reduziram significativamente a lesão no tecido gástrico dos animais. Dessa forma podemos inferir que a via HO-1/biliverdina/CO apresentam um importante papel gastroprotetor. Dados publicados na literatura demonstraram que em modelos de colite, a indução da enzima HO-1 por cobalto protoporfirin ou heme reduziu significativamente a lesão colônica, bem como, o processo inflamatório associado a esta lesão (HEGAZI et al., 2005; VARGA et al., (2007). Yao et al. observaram que o tratamento com quercitina protegeu os hepatócitos do estresse oxidativo induzido por etanol (YAO P et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado ainda que a Ketamina diminuiu a susceptibilidade da mucosa gástrica a lesões induzidas por irritantes luminiais durante endotoxemia, por promover um aumento da expressão da enzima HO-1 (HELMER et al., 2006). Entretanto, esses trabalhos não definiram qual o substrato da HO-1 estaria envolvido nestes efeitos citoprotetores.

Diante da possibilidade da atividade antioxidante ser um dos possíveis mecanismos pelo qual a via da HO-1/biliverdina/CO promova uma melhora da lesão gástrica induzida por etanol ou INDO, nós avaliamos o efeito da hemina, biliverdina ou do DMDC na peroxidação lipídica (determinado através da dosagem de MDA) e na concentração de glutatona (GSH) na mucosa gástrica após administração de etanol. No presente estudo, a administração de hemina, biliverdina ou DMDC diminuiu, de forma significativa, a formação de MDA e o consumo de GSH associados à lesão por etanol ou INDO. Nossos resultados sugeriram que a geração de biliverdina e CO, pelo aumento da expressão da enzima HO-1, apresentam propriedades antioxidantes nos modelos experimentais de gastropatia por etanol ou indometacina.

No modelo de gastropatia por INDO, neutrófilos apresentam uma ação oxidante com geração de ROS (YOSHIDA et al., 1995). Nossos resultados demonstraram que no modelo de gastropatia por INDO, hemina, biliverdina e o DMDC são capazes de proteger a mucosa gástrica, diminuindo a infiltração de neutrófilos e a produção de IL-1 e TNF- $\alpha$ . Além disso, promovem a diminuição do estresse oxidativo como descrito anteriormente, visto que diminuí as concentrações de MDA associado ao aumento dos níveis de GSH no tecido gástrico de animais. Administração de hemina, biliverdina ou DMDC no modelo de gastropatia por INDO diminuiu infiltração de neutrófilos, determinado pela dosagem de MPO, na mucosa gástrica. ROS gerados pelo metabolismo do ácido aracdônico, macrófagos e neutrófilos, podem contribuir para danos causados na mucosa gástrica (RAMOS et al., 1995). Atualmente a ação antioxidante da bilirrubina nos tecidos está bem estabelecida, demonstrando-se que ela é capaz de neutralizar oxirradicais com velocidade surpreendente. Isto ocorre porque a biliverdina (resultante da oxidação da bilirrubina pelos oxirradicais) é rapidamente reconvertida em bilirrubina, fechando o ciclo e disponibilizando-a novamente para a ação antioxidante. Além da ação antioxidante, é atribuída à bilirrubina a capacidade de inibir a molécula de adesão de célula vascular (VCAM-1), inibindo a migração transendotelial de leucócitos em modelos experimentais de inflamação (RIGATO et al., 2005). Em modelos de estresse oxidativo, a administração de bilirrubina parece ser citoprotetora, devido sua ação antioxidante (TOMARO & BATLLE, 2002; MANCUSO, 2004). De acordo com os nossos dados, hemina e biliverdina são capazes de proteger a mucosa gástrica no modelo de gastropatia por etanol ou INDO, aumentando significativamente a concentração de bilirrubina no tecido gástrico. Por outro lado, esse evento não foi observado nos animais tratados com DMDC, onde a concentração de bilirrubina se apresentou igual a dos animais controles. Logo, a ação antioxidante da bilirrubina é um evento crucial na gastroproteção induzida por hemina ou

biliverdina, mas não participa do processo de proteção do DMDC no modelo de gastropatia por etanol ou INDO. Em modelo de lesão hepática foi observado um aumento na concentração de bilirrubina em resposta a infusão de LPS em ratos (WANG et al., 2004). Além disso, atenuam a ativação e a disfunção das células endoteliais vasculares (KAWAMURA et al., 2005). Parece que em nossos modelos de lesão gástrica por etanol ou indometacina, hemina e biliverdina apresentam uma ação antiinflamatória importante, via produção de bilirrubina, uma substância com ação antioxidante e citoprotetora.

Para confirmar a ação antiinflamatória da via HO-1/biliverdina/CO, nossos dados demonstraram que hemina, biliverdina e DMDC foram capazes de diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias como, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e aumentar IL-10, uma citocina antiinflamatória no modelo de lesão induzida por INDO. Nossos dados estão de acordo com a literatura, onde Yamashita et al. demonstraram que a biliverdina possui ação antiinflamatória através da inibição de fatores de transcrição, como NF-kB e fator nuclear de células T ativadas (YAMASHITA et al., 2004). Em modelos de animais transplantados, a administração de biliverdina diminuiu a infiltração de neutrófilos e de citocinas pró-inflamatórias, através da inibição de fatores de transcrição, como NF-kB e NFAT (NAKAO et al., 2004). De acordo com a literatura, CO pode funcionar como um modulador da resposta inflamatória em pulmão asmático. Pacientes com bronquiectasia, uma doença pulmonar inflamatória, apresentaram uma maior quantidade de CO exalado, quando comparado com o grupo controle, sugerindo que o CO pode atuar como um marcador da resposta inflamatória nesses pacientes (HORVATH et al., 1998). Por outro lado, em alguns modelos experimentais o CO inibe a transcrição de genes pró-inflamatórios, e aumenta as citocinas antiinflamatórias (BELCHER et al., 2006). Foi sugerido que CO exógeno diminuiu o infiltrado neutrofílico e a produção de IL-5 em modelo murino de asma (CHAPMAN et al., 2005). Corroborando com os nossos dados,

Otterbein et al. publicou que o CO foi capaz de inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e MIP (proteína inflamatória de macrófago)-1 $\beta$  e de aumentar a citocina antiinflamatória IL-10 em modelo de inflamação induzida por LPS (OTTERBEIN et al., 2000).

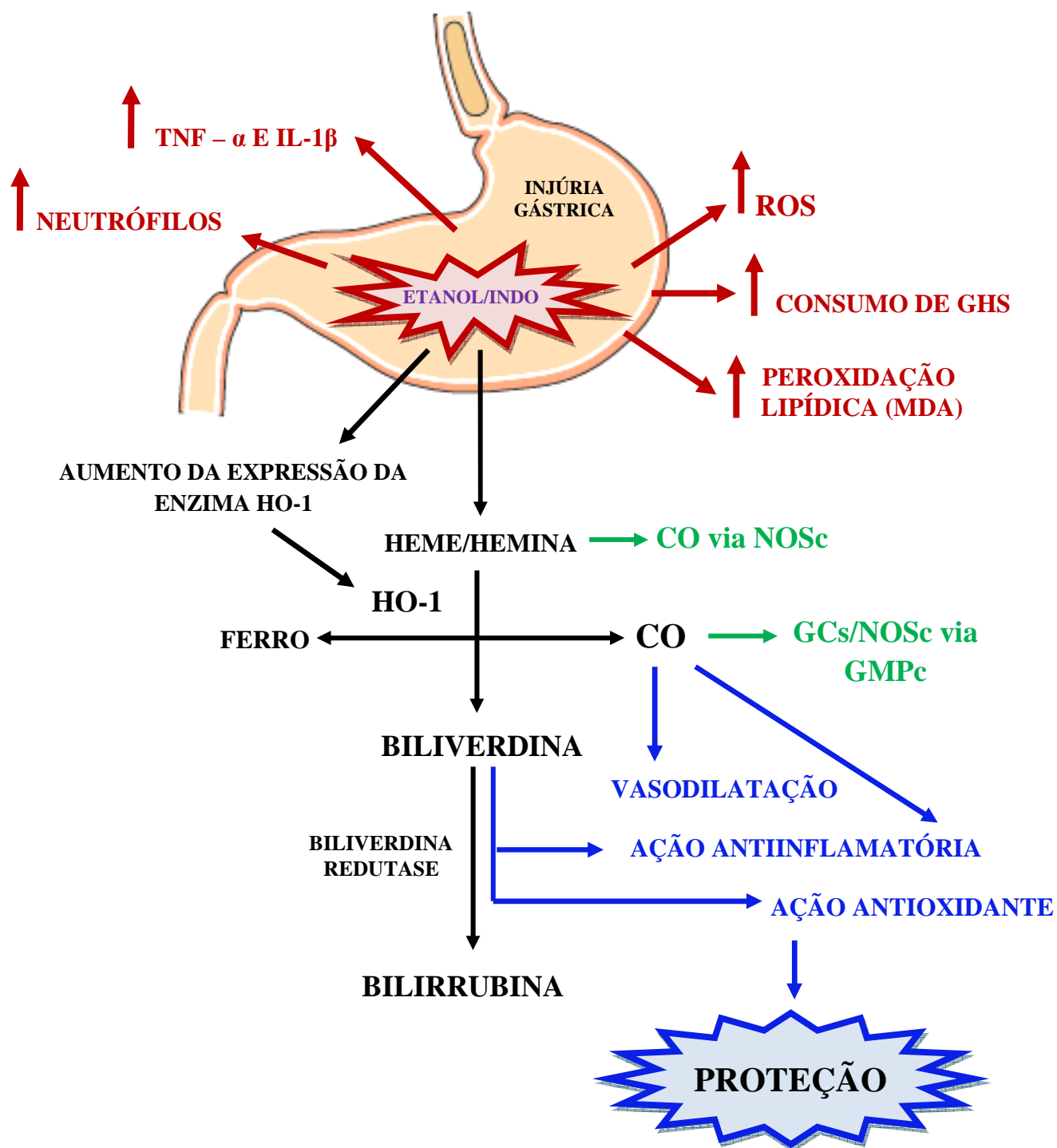
Com o objetivo de corroborar a participação efetiva da enzima HO-1, foi utilizado ZnPP IX, um inibidor da HO-1, nos modelos de gastropatia por doses sub-máximas de etanol e INDO. A inibição da enzima HO-1 pelo ZnPP IX amplificou de maneira significativa as lesões gástricas induzida por doses sub- máximas de etanol ou INDO. Administração de etanol ou INDO provocou hemorragia, edema, e perda de células epiteliais. Por outro lado, observamos a presença de células inflamatórias apenas no modelo de gastropatia por INDO, dado este confirmado pelo aumento da atividade de MPO em fragmentos retirados da mucosa de animais tratado com ZnPP IX associada a INDO. ZnPP IX, ao inibir enzima HO-1, potencializou o efeito lesivo, amplificando os parâmetros observados na lesão microscópica induzida por etanol ou INDO. O tratamento com ZnPP IX potencializou ainda a ação pró-oxidante das substâncias estudadas, onde podemos observar um aumento das concentrações de MDA associada a diminuição de GSH na gastropatia por etanol ou INDO. Administração de ZnPP IX não alterou a concentração de bilirrubina nos modelos de gastropatias induzidas por etanol ou INDO. Alguns trabalhos têm demonstrado que a inibição da HO-1, com conseqüentemente falta dos produtos derivados desta via enzimática, amplificaram o efeito lesivo e aumentaram consideravelmente os eventos inflamatórios. Figueiredo et al. mostraram que zinco protoporfirina IX ou estanho protoporfirina IX foram capazes de aumentar o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos (FIGUEIREDO et al., 2007). Wang et al. mostrou que a redução da atividade enzimática da HO-1 pelo ZnPP IX induziu a uma piora da inflamação no modelo de colite induzido por TNBS (WANG et al., 2001).

Estudos recentes demonstraram que o óxido nítrico (NO) e o monóxido carbono (CO) possuem algumas propriedades fisiológicas semelhantes como, por exemplo, a ativação da guanilato ciclase solúvel e elevação dos níveis intracelulares de cGMP. Muitos dos efeitos do CO dependem da ativação da guanilato ciclase, que gera o 3', 5'-monofosfato guanosinida cíclico (GMPc) e da modulação da MAPK, que são moléculas sinalizadoras importantes presente no processo inflamatório. Os efeitos do GMP cíclico mediados pelo CO incluem a neurotransmissão, a inibição da agregação plaquetária e da proliferação celular e ações anti-apoptótica, antiinflamatória e citoprotetora (RYTER AND OTTERBEIN, 2004). Utilizando abordagem farmacológica, nós demonstramos que a inibição da guanilato ciclase solúvel (GMPc) pelo ODQ reverteu o efeito protetor do DMDC, um doador de CO, nos modelos de gastropatia por etanol ou INDO. Entretanto, ODQ não alterou o efeito gastroprotetor da hemina ou biliverdina nos modelos de gastropatia estudados. A reversão do efeito gastroprotetor do DMDC pelo ODQ nos modelos de gastropatia foi acompanhada do aumento dos níveis de MDA e por uma diminuição importante da concentração de GSH na mucosa gástrica. E no modelo de gastropatia por INDO, onde observamos a presença de células inflamatórias, ocorreu um aumento dos níveis de MPO, quando os animais foram pré-tratados com ODQ, demonstrando assim a participação dos neutrófilos nesse evento. Nossos resultados estão de acordo com a literatura, no qual alguns trabalhos têm demonstrado que CO é capaz de ativar a guanilato ciclase solúvel (RYTER & OTTERBEIN, 2004; MORITA et al., 1995), e que esta ativação pode contribuir para diminuição de processos inflamatórios (FREITAS et al., 2006). O CO reduz respostas inflamatórias em diversos modelos de estresse oxidativo (OTTERBEIN et al., 2003).

O óxido nítrico é outro mediador gasoso relevante na prevenção e reparo de injúrias no TGI, participando no controle da produção de muco e secreção de bicarbonato, na regulação do fluxo sanguíneo capilar, atua como agente citoprotetor, antiinflamatório e como complemento aos efeitos protetores das prostaglandinas no estômago (MUSCARA & WALACE, 1999). Além de facilitar a cicatrização do tecido lesado, a inibição da síntese da NO sintase (NOS) aumentou a susceptibilidade do estômago a injúria provocada por AINEs e por agentes químicos, como o etanol (KAWANO & TSUJI, 2000). L-NAME, um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), foi utilizado para verificar a participação do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor da hemina, biliverdina ou DMDC. L-NAME reverteu completamente o efeito gastroprotetor do da hemina e do DMDC nos modelos de gastropatia induzida por etanol ou INDO, promovendo um aumento significativo das lesões na mucosa gástrica dos animais. Por outro lado, L-NAME não foi capaz de reverter o efeito protetor da biliverdina na gastropatia induzida por etanol ou INDO. A reversão do efeito gastroprotetor da hemina ou DMDC pelo L-NAME promoveu um aumento do estresse oxidativo, visto que aumentou a concentração de MDA e diminuiu os níveis de GSH. Mas, de forma exclusiva, o aumento da concentração de MPO só foi observado na mucosa de animais pré-tratados com INDO associado ao L-NAME. Tanto a NOS como HO-1 são presentes em processos fisiopatológicos e estudos sugerem que HO-1 pode servir tanto para regular, como também, para dar continuidade aos efeitos dos NO. As ações biológicas do NO são mediadas em parte por ação sobre uma enzima chamada guanilato ciclase, ativando-a, e em consequência elevando a concentração de seu produto, o GMP cíclico (GMPc). O GMPc é principal mecanismo de transdução de sinal pelo qual o NO determina seus efeitos fisiológicos. Hoje são conhecidas e estudadas diversas ações biológicas do NO, estando entre as principais ações a vasodilatação, a inibição da agregação plaquetária, a inibição da proliferação e migração de células

musculares lisas dos vasos, a inibição da quimiotaxia de leucócitos e o crescimento endotelial. A enzima NO-1 poderia se ligar à enzima NOS causando sua inativação. Demonstrou-se que o CO é de fato capaz de se ligar a NOS (CHRISTODOULIDES et al., 1995), e que quando administrado exogenamente inibe a atividade da NOS. A inibição da NOS pelos produtos da HO-1 poderia ser importante visto que NO é um radical livre, e pode reagir de forma inespecífica com muitos componentes celulares, causando os efeitos patológicos (VERMA et al., 1994). Por outro lado, a exposição dos hepatócitos ao tratamento exógeno do CO resultou em uma indução rápida da expressão dos iNOS seguida por uma indução da expressão HO-1 (ZUCKERBRAUN et al., 2006). No contraste, em diversos modelos de transplantes, a exposição ao CO impede a rejeição e injúria causada por isquemia/reperfusão conjuntamente com a inibição da expressão dos iNOS (RYTER et al., 2004). Dessa forma, nós sugerimos que a geração de CO, via ativação de HO-1 e NOS, é capaz de ativar a produção de GMPc e da enzima NOS constitutiva, na qual induz um efeito protetor, provavelmente por um aumento do fluxo sanguíneo e diminuição do estresse oxidativo e diminuição da infiltração de neutrófilos, na mucosa gástrica de animais submetidos a gastropatia por etanol ou INDO, respectivamente.

Com base nos dados obtidos, sugerimos o seguinte modelo hipotético:



Baseado nos dados citados acima, nossos resultados demonstraram que a via HO-1/biliverdina/CO possui um papel protetor importante no modelo experimental agudo de lesões gástricas induzidas por etanol e por INDO, por um mecanismo via CO e NO



dependente da ativação da guanilato ciclase solúvel, e independente, via biliverdina. Este evento parece depender, também, da diminuição da produção de radicais livres, visto que o pré-tratamento com hemina, biliverdina ou DMDC diminuiu a peroxidação lipídica e aumentou a concentração de GSH, substâncias importantes na remoção dos radicais livres presentes no modelo de gastropatia por etanol. Já no modelo de gastropatia por INDO observamos a participação de células inflamatórias, como neutrófilos e as citocinas pró-inflamatórias na gênese da lesão gástrica. Hemina, biliverdina ou DMDC foram capazes de diminuir essas substâncias que contribuem para a formação da lesão gástrica por AINEs e ainda foi capaz de aumentar os níveis de IL-10, uma citocina antiinflamatória no tecido gástrico. Dessa forma, podemos sugerir que os produtos da ativação da via HO-1, como a biliverdina e CO, podem ser alvos interessantes para o desenvolvimento de novas terapêuticas no tratamento da inflamação gástrica.

## 7. CONCLUSÕES

6.1 - A via HO-1/biliverdina/CO participa do processo de defesa da mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol ou INDO em camundongos.

6.2 - O efeito protetor da via HO-1/biliverdina/CO na gastropatia por etanol é dependente da ação antioxidante, por diminuir a peroxidação lipídica e o consumo de GSH.

6.3 - No modelo de gastropatia por INDO, observamos uma ação antioxidante e antiinflamatória da via HO-1/biliverdina/CO, os quais observaram uma diminuição da peroxidação lipídica, consumo de GSH, infiltração de células inflamatórias, bem como a inibição de citocinas pró-inflamatória, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e o aumento de IL-10, uma citocina antiinflamatória importante no processo de defesa da mucosa gástrica.

6.4 - Observamos que a administração de etanol ou INDO aumentou a expressão da HO-1 e a sua capacidade de sintetizar bilirrubina na mucosa gástrica.

6.5 - O bloqueio farmacológico da guanilato ciclase solúvel ou da NOS constitutiva reverteram a gastroproteção do DMDC, mas não da biliverdina, nos modelos de gastropatia por etanol ou INDO. Dessa forma, evidenciamos que o mecanismo de ação gastroprotetor do CO é dependente da via CO/GMPc/NOS.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, R.T., Ho, S.N., Barna, T.J., Rusovick. K.M., McKean, D.J. Inhibition of T-cell antigen receptor-mediated transmembrane signaling by protein kinase C activation. **Mol Cell Biol.** Dec; 8(12):5448-58, 1988.

Allen, A., Flemström, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am J Physiol Cell Physiol.** Jan;288(1):C1-19, 2005.

Al-Shabanah, O.A., Raza, M., Al-Harbi, M.M., Al-Bekairi, A.M., Al-Gharably, N.M., Qureshi, S. Effect of ninhydrin on the biochemical and histopathological changes induced by ethanol in gastric mucosa of rats. **Life Sci.** Jun 23;67(5):559-66. 2000.

Altura, B.M., Gebrewold, A. Inhibitor of nuclear factor-Kappa B activation attenuates venular constriction, leukocyte rolling-adhesion and microvessel rupture induced by ethanol in intact rat brain microcirculation: relation to ethanol-induced brain injury. **Neurosci Lett.** Dec 6;334(1):21-4, 2002.

Alper, J. New bind for ulcer bacterium. **Science.** Dec 17;262(5141):1817, 1993.

Bakken, A. F., Thaler, M. M. and Schmid, R., Metabolic regulation of heme catabolism and bilirubin production. I. Hormonal control of hepatic heme oxygenase activity. **J Clin Invest.**, 51: 530-536, 1972.

Barañano, D.E., Snyder, S.H. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Sep 25; 98(20):10996-1002, 2001.

Bhatnagar, M., Sisodia, S.S. Antisecretory and antiulcer activity of *Asparagus racemosus* Willd. against indomethacin plus pyloric ligation-induced gastric ulcer in rats. **J Herb Pharmacother**; 6(1):13-20, 2006.

Beejay, U., Wolfe, M.M. Acute gastrointestinal bleeding in the intensive care unit. The gastroenterologist's perspective. **Gastroenterol Clin North Am.**, Jun;29(2):309-36, 2000.

Belcher, J.D., Mahaseth, H., Welch, T.E., Otterbein, L.E., Hebbel, R.P., Vercellotti, G.M. Heme oxygenase-1 is a modulator of inflammation and vaso-occlusion in transgenic sickle mice. **J Clin Invest.** Mar;116(3):808-16, 2006.

Black, R.B., Rhodes, J., Davies, G.T., Gravelle, H., Sweetnam, P. A controlled clinical trial of cholestyramine in the treatment of gastric ulcer. **Gastroenterology.** Dec;61(6):821-5, 1971.

Bode JC, Bode C. Alcohol, the gastrointestinal tract and pancreas. **Ther Umsch.** Apr; 57(4):212-9, 2000.

Boothe, D.M. Gastrointestinal pharmacology. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, Mar;29(2):343-76, 1999.

Bradley, P.P.; Christensen, R.D.; Rothstein, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, 60, 618-622, 1982.

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.**, 26; 385(1): 47-6, 1999.

Calam, J., Baron, J.H. ABC of the upper gastrointestinal tract: Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **BMJ.**, 27;323(7319):980-2, 2001.

Camhi, S. L., Alam, J., Otterbein, L., Sylvester, S. L. and Choi, A. M., Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 13: 387-398, 1995.

Catella-Lawson, F., McAdam, B., Morrison, B.W., Kapoor, S., Kujubu, D., Antes, L., Lasseter, K.C., Quan, H., Gertz, B.J., FitzGerald, G.A. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. **J Pharmacol Exp Ther.**;289(2):735-41, 1999.

Chamberlain, J. A tendency to pay more attention to what something is called rather than what it is. **J Pharm Pharmacol.** Sep;45(9):769, 1993.

Chapman, J.T., Otterbein, L.E., Elias, J.A., Choi, A.M. Carbon monoxide attenuates aeroallergen-induced inflammation in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. Jul;281(1):L209-16, 2001.

Christodoulides N, Durante W, Kroll MH, Schafer AI. Vascular smooth muscle cell heme oxygenases generate guanylyl cyclase-stimulatory carbon monoxide. **Circulation.**, May 1;91(9):2306-9, 1995.

Cho, C.H., Pfeiffer, C.J., Misra, H.P. Ulcerogenic mechanism of ethanol and the action of sulphanilyl fluoride on the rat stomach in-vivo. **J Pharm Pharmacol** 43: 495-498, 2001.

Davenport, H.W. Ethanol damage to canine oxyntic glandular mucosa. **Proc Soc Exp Biol Med**. Dec;126(3):657-62, 1967.

Davenport JC. Pressure-pain thresholds in the oral cavity in man. **Arch Oral Biol**. Nov;14(11):1267-74, 1969.

Doi, K., Akaike, T., Fujii, S., Tanaka, S., Ikebe, N., Beppu, T., Shibahara, S., Ogawa, M. and Maeda, H., Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. **Br. J. Cancer.**, 80: 1945-1954, 1999.

Emim, J.A., Oliveira, A.B., Lapa, A.J. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. **J Pharm Pharmacol**. Feb;46(2):118-22, 1994.

Erbil, Y., Giriş, M., Abbasoğlu, S.D., Barbaros, U., Yanik, B.T., Necefli, A., Olgaç, V., Toker, G.A. Effect of heme oxygenase-1 induction by octreotide on TNBS-induced colitis. **J Gastroenterol Hepatol.**, Nov;22(11):1852-8, 2007.

Farombi, E.O., Surh, Y.J. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. **J Biochem Mol Biol.**, 30;39(5):479-91, 2006.

Figueiredo, R.T., Fernandez, P.L., Mourao-As, D.S., Porto, B.N., Dutra, F.F., Alves, L.S., Oliveira, M.F., Oliveira, P.L., Graça-Souza, A.V., Bozza, M.T. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. **J Biol Chem.**, 13;282(28):20221-9, 2007.

Fisher, A.A., Le Couteur, D.G. Intracerebral hemorrhage following possible interaction between celecoxib and clopidogrel. **Ann Pharmacother.**, Dec;35(12):1567-9, 2001.

Foresti, R., Hoque, M., Bains, S., Green, C.J, Motterlini, R. Haem and nitric oxide: synergism in the modulation of the endothelial haem oxygenase-1 pathway. **Biochem J.**, 372:381-390, 2003.

Freeman, B.A., Crapo, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab Invest.**, Nov;47(5):412-26, 1982.

Freitas, A., Alves-Filho, J.C., Secco, D.D., Neto, A.F., Ferreira, S.H., Barja-Fidalgo, C., Cunha, F.Q. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. **Br. J. Pharmacol.** 149(4):345-54, 2006.

Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y, Yet SF, Pinsky DJ. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nat Med.*, May;7(5):598-604, 2001.

Gana, T.J.; Huhlewych, R.; Koo, J. Focal gastric mucosal blood flow in aspirin-induced ulceration. **Ann. Surg.**, 205, 399-403. 1987.

Gerke P, Hapke U, Rumpf HJ, John U. Alcohol-related diseases in general hospital patients. **Alcohol Alcohol.**, 32(2):179-84,1997.

Goncalves de Moraes, V.L.; Boris Vargaftig, B.; Lefort, J.; Meager, A.; Chignard, M. Effect of cyclo-oxygenase inhibitors and modulators of cyclic AMP formation on lipopolysaccharide-induced neutrophil infiltration in mouse lung. **Br J Pharmacol.**, 117(8): 1792-6, 1996.

Guslandi, M. Erosive gastritis does acid matter? **Gut.**, Oct;28(10):1321-2, 1987.

Gottfried, E.B., Korsten, M.A., Lieber, C.S. Alcohol-induced gastric and duodenal lesions in man. **Am J Gastroenterol.**70(6):587-92, 1978.



Gutteridge, J.M., Halliwell, B. Reoxygenation injury and antioxidant protection: a tale of two paradoxes. **Arch Biochem Biophys.**, Dec;283(2):223-6, 1990.

Gutteridge, J.M. Ageing and free radicals. **Med Lab Sci.**, Dec;49(4):313-8, 1992.

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.**, 49(3):443-53, 2001.

Ham EA, Soderman DD, Zanetti ME, Dougherty HW, McCauley E, Kuehl FA Jr. Inhibition by prostaglandins of leukotriene B4 release from activated neutrophils. **Proc Natl Acad Sci.**, Jul;80(14):4349-53, 1983.

Handrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., Simmons, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Oct 15;99(21):13926-31, 2002.

Hartsfield, C.L., Alam, J., Cook, J.L., Choi, A.M. Regulation of heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle cells by nitric oxide. **Am J Physiol.**, 273(5 Pt 1):L980-8, 1997.

Hawkey, C.J., Rampton, D.S. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? **Gastroenterology.** Nov;89(5):1162-88, 1985,

Hawkey, C.J. COX-1 and COX-2 inhibitors. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.**, 15(5):801-20, 2001.

Hayashi, S., Takamiya, R., Yamaguchi, T., Matsumoto, K., Tojo, S.J., Tamatani, T., Kitajima, M., Makino, N., Ishimura, Y., Suematsu, M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. **Circ Res.**, Oct 15;85(8):663-71, 1999.

Hegazi, R.A., Rao, K.N., Mayle, A., Sepulveda, A.R., Otterbein, L.E., Plevy, S.E. Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. **J Exp Med.**19;202(12):1703-13, 2005.

Helmer, K.S., Suliburk, J.W., Mercer, D.W. Ketamine-induced gastroprotection during endotoxemia: role of heme-oxygenase-1. **Dig Dis Sci.** 51(9):1571-81; 2006.

Hirschowitz, E.A., Ohwada, A., Pascal, W.R., Russi, T.J., Crystal, R.G. In vivo adenovirus-mediated gene transfer of the Escherichia coli cytosine deaminase gene to human colon carcinoma-derived tumors induces chemosensitivity to 5-fluorocytosine. **Hum Gene Ther.** Aug;6(8):1055-63, 1995.

Hiruma-Lima, C.A., Gracioso, J.S., Rodríguez, J.A., Haun, M., Nunes, D.S., Souza Brito, A.R. Gastroprotective effect of essential oil from Croton cajucara Benth. (Euphorbiaceae). **J Ethnopharmacol.** Mar;69(3):229-34, 2000.

Horváth, B., Hortobágyi, L., Lenzsér, G., Schweer, H., Hrabák, A., Sándor, P., Benyó, Z. Carbon monoxide-prostaglandin E2 interaction in the hypothalamic circulation. **Neuroreport.**, Oct 29;19(16):1601-4, 2008.

Ishihara, K., Kuwata, H., Ohara, S., Ohkawa, H., Okabe, H., Hotta, K. Mucus glycoprotein and mucosal protection. **J Clin Gastroenterol.**;10 Suppl 1:S24-7, 1988.

Jonsson, A.S., Palmblad, J.E. Effects of ethanol on NF-kappaB activation, production of myeloid growth factors, and adhesive events in human endothelial cells. **J Infect Dis.** Sep 15;184(6):761-9; 2001.

Jonsson, I.M., Verdrengh, M., Brisslert, M., Lindblad, S., Bokarewa, M., Islander, U., Carlsten, H., Ohlsson, C., Nandakumar, K.S., Holmdahl, R., Tarkowski, A. Ethanol prevents development of destructive arthritis. **Proc. Natl. Acad . Sci.** 104(1):258-63; 2007.

Kawano, S., Tsuji, S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. **J Gastroenterol Hepatol.** Mar;15 Suppl:D1-6; 2000.

Kawamura, K., Ishikawa, K., Wada, Y., Kimura, S., Matsumoto, H., Kohro, T., Itabe, H., Kodama, T., Maruyama, Y. Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular endothelial activation and dysfunction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** Jan;25(1):155-60; 2005.

Kishore, R., Hill, J.R., McMullen, M.R., Frenkel, J., Nagy, L.E. ERK1/2 and Egr-1 contribute to increased TNF-alpha production in rat Kupffer cells after chronic ethanol feeding. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** Jan;282(1):G6-15;2002.

Kitahora, T.; Guth, P.H. Effect of aspirin plus hydrochloric acid on the gastric mucosal microcirculation. **Gastroenterology.**, 93(4):810-7, 1997.

Ko, J.K., Cho, C.H. Histological study of mechanisms of adaptive cytoprotection on ethanol-induced mucosal damage in rat stomachs. **Dig Dis Sci.** Jun;43(6):1248-57; 1998.

Konturek, P. C.; Brzozowski, T.; Sliwowski, Z.; Pajdo, R.; Stachura, J.; Hahn, E. G.; Konturek, S. J. Involvement of nitric oxide and prostaglandins in gastroprotection induced by bacterial lipopolysaccharide. **Scand. J. Gastroenterol.**, 33, n. 7, p. 691-700, 1998.

Korolkiewicz, R.P., Sein-Anand, J., Ruczyński, J., Rekowski, P., Bieniaszewski, L., Chodorowski, Z., Petruszewicz, J., Ujda, M., Dabkowski, J., Bitel, M., Kato, S., Takeuchi, K. The role and interactions of nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO), and prostanoids in the pathogenesis of postoperative ileus in rats. **J Gastrointest Surg.** Mar-Apr;8(3):346-57 ; 2004.

Krumenacker, J.S., Hanafy, K.A., Murad, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. **Brain Res Bull.** Feb 15;62(6):505-15, 2004.

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.**, Apr;98(4):909-20;1990.

La Casa, C., Villegas, I., Alarcón de la Lastra, C., Motilva, V., Martín Calero, M.J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **J Ethnopharmacol.** Jul;71(1-2):45-53; 2000.

Laine, L. Endoscopic therapy for peptic ulcer hemorrhage: heater probe and alcohol injection. **Gastroenterology** 100(2):575-7; 1991.

Laine, L., Weinstein, W.M. Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. **Gastroenterology**, 94(6):1254-62; 1988.

Langenbach, R.; Morham, S.G.; Tiano, H.F.; Loftin, C.D.; Ghanayem, B.I.; Chulada P.C.; Mahler, J.F.; Lee, C.A.; Goulding, E.H.; Kluckman, K.D.; Kim, H.S.; Smithies, O. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. **Cell.**, 3;83 (3):483-92, 1995.

Leung, W.K., To, K.F., Go, M.Y., Chan, K.K., Chan, F.K., Ng, E.K., Chung, S.C., Sung, J.J. Cyclooxygenase-2 upregulates vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in human gastric carcinoma. **Int J Oncol.** Nov;23(5):1317-22; 2003.

Lewis, D.A., Hanson, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. **Prog Med Chem.**;28:201-31; 1991.

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.** Nov;21(8):1360-6; 1997 .

MacMath, T.L. Alcohol and gastrointestinal bleeding. **Emerg Med Clin North Am.** Nov;8(4): 859-72; 1990.

Maines, M.D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 37:517-54;1997.

Malara, B., Joško, J., Tyrpień, M., Malara, P., Steplewska, K. Dynamics of changes in vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and angiogenesis in stress-induced gastric ulceration in rats. **J Physiol Pharmacol.** Jun;56(2):259-71; 2005.

Mancuso, C. Heme oxygenase and its products in the nervous system. **Antioxid Redox Signal.**6(5):878-87; 2004.

Martich, G.D.; Danner, R.L.; Ceska, M.; Suffredini, A.F. Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents. **J Exp Med.**, 1; 173(4): 1021-4, 1991.

McCoubrey, W.K. Jr., Huang, T.J., Maines, M.D. Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. **J Biol Chem.** May 9;272(19):12568-74; 1997.

Mihara, M., Uchiyama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem.** 86(1):271-8, 1978.

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.**, 37(3):164-71, 2002.

Moncada, C., Arvin, B., Le Peillet, E., Meldrum, B.S. Non-NMDA antagonists protect against kainate more than AMPA toxicity in the rat hippocampus. **Neurosci Lett.** Dec 9;133(2):287-90; 1991.

Moreland, R.B., Goldstein, I., Traish, A. Sildenafil, a novel inhibitor of phosphodiesterase type 5 in human corpus cavernosum smooth muscle cells. **Life Sci.**; 62(20):PL 309-18; 1998.

Morise, Z.; Komatsu, S.; Fuseler, J.W.; Granger, D.N.; Perry, M.; Issekutz, A.C.; Grisham, M.B. ICAM-1 and P-selectin expression in a model of NSAID-induced gastropathy. **Am J Physiol.** 274(2 Pt 1): G246-52, 1998.

Morise, Z.; Granger, D.N.; Fuseler, J.W.; Anderson, D.C.; Grisham, M.B. Indomethacin induced gastropathy in CD18, intercellular adhesion molecule 1, or P-selectin deficient mice. **Gut.**, 45(4):523-8, 1999.

Morita, T., Perrella, M.A., Lee, M.E., Kourembanas, S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. **Proc Natl Acad Sci.** 28;92(5):1475-9; 1995.

Muscará MN, Wallace JL. Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am J Physiol.** Jun;276(6 Pt 1):G1313-6; 1999.

Nakao, A., Otterbein, L.E., Overhaus, M., Sarady, J.K., Tsung, A., Kimizuka, K., Nalesnik, M.A., Kaizu, T., Uchiyama, T., Liu, F., Murase, N., Bauer, A.J., Bach, F.H. Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel. **Gastroenterology.** Aug;127(2):595-606; 2004.

Nam, S.Y., Kim, N., Lee, C.S., Choi, K.D., Lee, H.S., Jung, H.C., Song, I.S. Gastric mucosal protection via enhancement of MUC5AC and MUC6 by geranylgeranylacetone. **Dig Dis Sci.**; 50(11):2110-20; 2005.

Nanji, A.A., French, S.W. Animal models of alcoholic liver disease--focus on the intragastric feeding model. **Alcohol Res Health.** 27(4):325-30; 2003.

Nath, K.A. Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. **Kidney Int.** 70(3):432-43; 2006.

Nishie, A., Ono, M., Shono, T., Fukushi, J., Otsubo, M., Onoue, H., Ito, Y., Inamura, T., Ikezaki, K., Fukui, M., Iwaki, T., Kuwano, M. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. **Clin Cancer Res.** May;5(5):1107-13; 1999.

Oates, P.J., Hakkinen, J.P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterology.** Jan;94(1):10-21; 1998.



Olbe, L., Carlsson, E., Lindberg, P. A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. **Nat Rev Drug Discov.** Feb;2(2):132-9;2003.

Otterbein, L.E., Soares, M.P., Yamashita, K., and Bach, F.H. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. **Trends Immunol.** 24:449–455; 2003.

Otterbein, L.E., May, A., Chin, B.Y. Carbon monoxide increases macrophage bacterial clearance through Toll-like receptor (TLR)4 expression. **Cell Mol Biol;** 3;51(5):433-40; 2005.

Ou, H.S., Yang, J., Dong, L.W., Pang, Y.Z., Su, J.Y., Tang, C.S., Liu, N.K. Role of endogenous carbon monoxide in the pathogenesis of hypotension during septic shock. **Sheng Li Xue Bao.;** Feb;51(1):1-6; 1999.

Paimela, H., Goddard, P.J., Silen, W. Present views on restitution of gastrointestinal epithelium. **Dig Dis Sci.** Nov;40(11):2495-6; 1995.

Peskar, B.M., Lange, K., Hoppe, U., Peskar, B.A. Ethanol stimulates formation of leukotriene C4 in rat gastric mucosa.. **Prostaglandins.** Feb;31(2):283-93; 1986.

Peskar, B.M., Maricic, N. Role of prostaglandins in gastroprotection. **Dig Dis Sci.** Sep;43(9 Suppl):23S-29S; 1998.

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.**; Jun;301(3):969-74; 2002.

Phillipson, M., Atuma, C., Henriksnäs, J., Holm, L. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** Feb;282(2):G211-9; 2002.

Preedy, V.R., Richardson, P.J. Ethanol induced cardiovascular disease. **Br Med Bull.** Jan;50(1):152-63; 1994.

Ra, A., Tobe, S.W. Acute interstitial nephritis due to pantoprazole. **Ann Pharmacother.** Jan; 38(1):41-5; 2004.

Ramos, C.L., Pou, S., Rosen, G.M. Effect of anti-inflammatory drugs on myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical generation by human neutrophils. **Biochem Pharmacol.** Apr 18;49(8):1079-84; 1995.

Remick, D.G., Larrick, J., Kunkel, S.L. Tumor necrosis factor-induced alterations in circulating leukocyte populations. **Biochem Biophys Res Commun.** Dec 15;141(2):818-24; 1986.

Repetto, M.G., Llesuy, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz J Med Biol Res.** May;35(5):523-34; 2002.

Rigato, I., Ostrow, J.D., Tiribelli, C. Bilirubin and the risk of common non-hepatic diseases. **Trends Mol Med.** Jun;11(6):277-83; 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.** Sep;77(3):433-43; 1979.

Robert A, Bundy GL, Field SO, Nezamis JE, Davis JP, Hanchar AJ, Lancaster C, Ruwart MJ.

Rosenkranz, S. Alcohol consumption and arterial hypertension. **Dtsch Med Wochenschr.** Nov 21;128(47):2497-502; 2003.

Rosen, S.D., Rogers, A.I. Clinical recognition and evaluation of peptic ulcer disease. **Postgrad Med.** Oct;88(5):42-7,51,55; 1990.

Ryter, S.W., Tyrrell, R.M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Hemeoxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free Radic Biol Med.** 15; 28(2):289-309; 2000.

Ryter, S.W., Otterbein, L.E. Carbon monoxide in biology and medicine. **Bioessays** 26(3):270-80; 2004.

Ryter, S.W., Morse, D., Choi, A.M. Carbon monoxide: to boldly go where NO has gone before. **Sci STKE.** Apr 20;2004.

Ryter, S.W., Morse, D., Choi, A.M. Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 36(2):175-82; 2007.

Safieh-Garabedian, B., Poole, S., Allchorne, A., Winter, J., Woolf, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.** Aug;115(7):1265-75; 1995.

Samonina, G.E., Kopylova, G.N., Lukjanzeva, G.V., Zhuykova, S.E., Smirnova, E.A., German, S.V., Guseva, A.A. Antiulcer effects of amylin: a review. **Pathophysiology.** Jul;11(1):1-6; 2004.

Santos, F.A., Rao, V.S. 1,8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Dig Dis Sci.** Feb;46(2):331-7; 2001.

Santucci, L., Fiorucci, S., Giansanti, M., Brunori, P.m., Di Matteo, F.M., Morelli, A. Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumour necrosis factor alpha. **Gut.** Jul, 35(7), 909-15; 1994.

Santucci, L.; Fiorucci, S.; Di Matteo, F.M.; Morelli, A. Role of tumor necrosis factor alpha release and leukocyte margination in indomethacin-induced gastric injury in rats. **Gastroenterology**, 108(2):393-401, 1995.

Schmidt, K.L., Miller, T.A. Ultrastructural aspects of prostaglandin cytoprotection in an alcohol injury model. **J Clin Gastroenterol.**;10 Suppl 1:S84-92; 1988.

Scott, L.J.; Lamb, H.M. **Rofecoxib Drugs**, Sep;58(3):499-505, 1999.

Sedlak, J., Lindsay, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem** 25(1): 1192-1205; 1968.

Shono, T., Ono, M., Izumi, H., Jimi, S. I., Matsushima, K., Okamoto, T., Kohno, K. and Kuwano, M., Involvement of the transcription factor NF-kappaB in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. **Mol Cell Biol** 16: 4231-4239; 1996.

Simonyi, A., Woods, D., Sun, A.Y., Sun, G.Y. Grape polyphenols inhibit chronic ethanol-induced COX-2 mRNA expression in rat brain. **Alcohol Clin Exp Res.** Mar;26(3):352-7; 2002.

Singh, G.; Ramey, D.R.; Morfeld, D.; Shi, H.; Hatoum, H.T.; Fries, J.F. Gastrointestinal tract complications of nonsteroidal antiinflammatory drug treatment in rheumatoid arthritis a prospective observational cohort study. **Arch Intern Med**, 156:1530-6, 1996.

Souza, M.H.; Troncon, L.E.; Cunha, F.Q.; Oliveira, R.B. Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. **Braz J Med Biol Res.**, 36, 1383-1390, 2003.

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

Steiner, A. A., Branco, L. G., Cunha, F. Q. and Ferreira, S. H., Role of the heme oxygenase/carbon monoxide pathway in mechanical nociceptor hypersensitivity. **Br J Pharmacol** 132: 1673-1682, 2001.

Stocker, R. Antioxidant activities of bile pigments. **Antioxid Redox Signal**. Oct;6(5):841-9; 2004.

Suerbaum, S., Michetti, P. Helicobacter pylori infection. **N Engl J Med**. Oct 10;347(15):1175-86; 2002.

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** 88(1 Pt 2):228-36; 1985.

Takagi, T., Naito, Y., Mizushima, K., Nukigi, Y., Okada, H., Suzuki, T., Hirata, I., Omatsu, T., Okayama, T., Handa, O., Kokura, S., Ichikawa, H., Yoshikawa, T. Increased intestinal expression of heme oxygenase-1 and its localization in patients with ulcerative colitis. **J Gastroenterol Hepatol**. Dec;23 Suppl 2:S229-33; 2008.

Takahashi, T., Morita, K., Akagi, R., Sassa, S. Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries. **Curr Med Chem**. 11(12):1545-61; 2004.

Tarnawski, A., Brzozowski, T., Sarfeh, I.J., Krause, W.J., Ulich, T.R., Gergely, H., Hollander, D. Prostaglandin protection of human isolated gastric glands against

indomethacin and ethanol injury. Evidence for direct cellular action of prostaglandin. **J Clin Invest.** Apr;81(4):1081-9; 1988.

Tarnawski, A., Stachura, J., Durbin, T., Sarfeh, I.J., Gergely, H. Increased expression of epidermal growth factor receptor during gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology.** Feb;102(2):695-8; 1992.

Tomaro, M.L., Battle, A.M. Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. **Int J Biochem Cell Biol.** 34(3):216-20. 2002.

Ueda, K., Ueyama, T., Yoshida, K., Kimura, H., Ito, T., Shimizu, Y., Oka, M., Tsuruo, Y., Ichinose, M. Adaptive HNE-Nrf2-HO-1 pathway against oxidative stress is associated with acute gastric mucosal lesions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 295(3):G460-9; 2008.

Utsunomiya, I., Nagai, S., Oh-ishi, S. Differential effects of indomethacin and dexamethasone on cytokine production in carrageenin-induced rat pleurisy. **Eur J Pharmacol.,** Feb 3;252(2):213-8, 1994.

Vane, J.R.; Mitchell, J.A.; Appleton, I.; Tomlinson, A.; Bishop-Bailey, D.; Croxtall, J.; Willoughby, D.A. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. **Proc Natl Acad Sci. U S A,** Mar 15;91(6):2046-50, 1994.

Varga, C., Laszlo, F., Fritz, P., Cavicchi, M., Lamarque, D., Horvath, K., Posa, A., Berko, A., Whittle, B.J. Modulation by heme and zinc protoporphyrin of colonic heme oxygenase-

1 and experimental inflammatory bowel disease in the rat. **Eur J Pharmacol.** 30;561(1-3):164-71; 2007.

Verma, A., Hirsch, D.J., Glatt, C.E., Ronnett, G.V., Snyder, S.H. Carbon monoxide: a putative neural messenger. **Science.** Jan 15;259(5093):381-4; 1994.

Vicente, A. M., Guillen, M. I., Habib, A. and Alcaraz, M. J., Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. **J Pharmacol Exp Ther.** 307: 1030-1037; 2003.

Wagener, F.A., van Beurden, H.E., von den Hoff, J.W., Adema, G.J., Figdor, C.G. The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing. **Blood.** 15; 102(2):521-8; 2003.

Wallace, J.L.; Keenan, C.M.; Granger, D.N. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. **Am. J. Physiol.**, 259, 462-467,1990.

Wallace, J.L.; McKnight, W.; Miyasaka, M.; Tamatati, T.; Pauson, J.; Anderson, D.C.; Granger, D.N.; Kubes, P. Role of endothelial adhesion molecules in NSAID-induced gastric mucosal injury. **Am J Physiol.**, Nov;265(5 Pt 1):G993,1993.

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



Wallace, J.L. How do NSAIDs cause ulcer disease? *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 14:147-59, 2000.

Wallace, J.L., Miller, M.J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology*, Aug;119(2):512-20; 2000.

Wallace, J.L., Ma, L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. **Exp Biol Med (Maywood)**., Dec; 226(11): 1003-15 2001.

Wang, J., Lu, S., Moñne-Loccoz, P., Ortiz de Montellano, P.R. Interaction of nitric oxide with human heme oxygenase-1. **J. Biol. Chem.** Jan 24;278(4):2341-7; 2003.

Wang, W.P., Guo, X., Koo, M.W., Wong, B.C., Lam, S.K., Ye, Y.N., Cho, C.H. Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 281(2):G586-94;2001.

Whittle, B.J., László, F., Evans, S.M., Moncada, S. Induction of nitric oxide synthase and microvascular injury in the rat jejunum provoked by indomethacin. **Br J Pharmacol.** Oct;116(4):2286-90, 1995.

Wolfe, M.M., Soll, A.H. The physiology of gastric acid secretion. **N Engl J Med.** Dec 29;319(26):1707-15; 1988.

Wolfe, M.M. Risk factors associated with the development of gastroduodenal ulcers due to the use of NSAIDs. **Int J Clin Pract Suppl.** Apr;(135):32-7; 2003.

Wu, D., Cederbaum, A.I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. **Alcohol Res Health;** 27(4):277-84, 2003.

Yachie, A., Toma, T., Mizuno, K., Okamoto, H., Shimura, S., Ohta, K., Kasahara, Y., Koizumi, S. Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children. **Exp Biol Med (Maywood).** May;228(5):550-6; 2003.

Yamashita, K., McDaid, J., Ollinger, R., Tsui, T.Y., Berberat, P.O., Usheva, A., Csizmadia, E., Smith, R.N., Soares, M.P., Bach, F.H. Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. **FASEB J.** Apr;18(6):765-7; 2004.

Yao, P., Nussler, A., Liu, L., Hao, L., Song, F., Schirmeier, A., Nussler, N. Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. **J Hepatol.** 47(2):253-61; 2007.

Yoshida, N., Yoshikawa, T., Nakamura, Y., Arai, M., Matsuyama, K., Iinuma, S., Yagi, N., Naito, Y., Miyasaka, M., Kondo, M. Role of neutrophil-mediated inflammation in aspirin-induced gastric mucosal injury. **Dig Dis Sci.** Nov;40(11):2300-4;1995.

Xie, W.L.; Chipman, J.G.; Robertson, D.L.; Erikson, R.L.; Simmons, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.,** Apr 1;88(7):2692-6,1991.

Zlabek, J.A, Anderson, C.G. Lansoprazole-induced thrombocytopenia. **Ann Pharmacother.** May;36(5):809-11, 2002.

Zuckerbraun, B.S., Chin, B.Y., Wegiel, B., Billiar, T.R., Czimadia, E., Rao, J., Shimoda, L., Ifedigbo, E., Kanno, S., Otterbein, L.E. Carbon monoxide reverses established pulmonary hypertension. **J. Exp. Med.** Sep 4;203(9):2109-19; 2006.

## 9. ANEXOS

GASTROPROTECTIVE EFFECT OF THE HEME-OXYGENASE 1/BILIVERDIN/CO PATHWAY IN ETHANOL-INDUCED GASTRIC DAMAGE IN MICE.

Antoniella S Gomes<sup>a</sup>, Gemima G Gadelha<sup>a</sup>, Samara J Lima<sup>a</sup>, Joyce A Garcia<sup>a</sup>, Jand Venes R Medeiros<sup>a</sup>, Alexandre Havt<sup>a</sup>, Aldo A M Lima<sup>a</sup>, Ronaldo A Ribeiro<sup>a</sup>, Gerly Anne Castro Brito<sup>a</sup>, Fernando Q Cunha<sup>b</sup> and Marcellus HLP Souza<sup>a\*</sup>.

a-Brazilian Semi-Arid Institute of Biomedicine (INCT-IBISAB), School of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo, 1315, CEP: 60430-270, Fortaleza- CE, Brazil.

b- Department of Pharmacology, Ribeirao Preto School of Medicine, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, CEP: 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Correspondence:

Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, MD, PhD

Centro de Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

Address for reprint requests: Rua Cel. Nunes de Melo, 1315, Rodolfo Teófilo, Fortaleza-CE, Brazil, CEP: 60.430-270, Fax: +55-85-33668588.

e-mail: [souzamar@ufc.br](mailto:souzamar@ufc.br).

Running head: HO-1/Biliverdin/CO and gastric defense.

Subject categories: Gastrointestinal Pharmacology

**Abstract**

Our objective was to evaluate the role of the heme-oxygenase 1 (HO-1)/biliverdin/CO pathway in gastric defense against ethanol-induced gastric damage in mice. Mice were pre-treated with saline, hemin (HO-1 inducer), biliverdin (HO-1 product), DMDC (CO donor) or ZnPP IX (HO-1 antagonist). Another group received ODQ 30 minutes before hemin, biliverdin or DMDC. After 30 min, gastric damage was induced by ethanol. After one hour, rats were sacrificed. Gastric lesions were measured using a computer planimetry program, and gastric corpus pieces were assayed for malonylaldehyde (MDA), glutathione (GSH) or bilirubin. HO-1 expression was determined after saline or ethanol administration by PCR or immunohistochemistry. Ethanol (25% or 50%) induced gastric damage, increased MDA levels and reduced GSH in the gastric tissue. Ethanol (50%) increased HO-1 mRNA transcripts, HO-1 immunoreactivity, and the bilirubin concentration in gastric mucosa. Pre-treatment with hemin reduced gastric damage and MDA formation and increased the GSH concentration in gastric mucosa. ZnPP IX amplified the ethanol-induced gastric lesion, increased MDA formation and decreased the GSH concentration in gastric mucosa. Biliverdin and DMDC reduced gastric damage and MDA formation and increased GSH concentration in the gastric tissue. ODQ completely abolished the DMDC protective gastric effect. However, effects of hemin or biliverdin did not change with ODQ treatment. Our results suggest that the HO-1/biliverdin/CO pathway plays a protective role against ethanol-induced gastric damage through mechanisms that could be dependent (CO) or independent (biliverdin) of sGC activation.

**Keywords:** HO-1, CO, biliverdin, gastric damage, ethanol.

## 1- Introduction:

Ethanol ingestion causes acute gastric mucosal lesions in humans (Gottfried *et al.*, 1978; Laine *et al.*, 1991), through the release of inflammatory mediators, which induce vasoconstriction/ischemia, oxidative stress and lipid peroxidation and then cell death (Szabo *et al.*, 1985; Lutnicki *et al.*, 1992; Ito *et al.*, 1998). Additionally, anti-oxidant and free radical scavengers can decrease ethanol-induced damage in gastric mucosa (Cho *et al.*, 2001).

Heme-oxygenase-1 (HO-1) can provide an endogenous protective anti-oxidant system related to the increase in biliverdin and bilirubin, which possess anti-oxidant and anti-complement activities and can reduce lipid peroxidation (Takahashi *et al.*, 2004; Nath, 2006). In addition, carbon monoxide (CO) may also have anti-inflammatory properties, including inhibition of pro-inflammatory cytokine expression (Kirkby and Adin, 2006). HO-1 is the rate-limiting enzyme in heme degradation and results in the release of CO, ferrous iron and biliverdin product, which is subsequently reduced to bilirubin (Maines, 1997). In the gastrointestinal tract, HO-1 plays a protective role in colonic damage induced by the TNBS or dextran sodium sulfate-induced experimental colitis, and these preventive effects probably result from decreased free radical production (Wang *et al.*, 2001). A recently study demonstrated that ketamine diminishes gastric mucosa susceptibility to damage from luminal irritants during endotoxemia, partially mediated by up-regulation of HO-1 (Helmer *et al.*, 2006). In addition, in 2008 Ueda et al. demonstrated that the application of HCL caused an increase in HO-1 mRNA levels in gastric mucosa, and that pre-treatment with ZnPP (HO-1 inhibitor) significantly exacerbated HCL-induced acute gastric mucosal lesions (Ueda et al., 2008). However, the role of specific HO-1 enzymatic products in gastric defense was not completely elucidated.

Understanding both the pathways through which HO-1 is induced and the mechanism through which the enzyme exerts its beneficial effects may facilitate the development of novel

drugs. In the present study, we evaluated the role of the HO-1/biliverdin/CO pathway in gastric defense against ethanol-induced gastric damage in mice.

## 2- Methods

### 2.1- Animals.

Male mice (20-25 g), provided by the Central Bioterium of Pici, Federal University of Ceara, were kept in a temperature-controlled room with water *ad libitum*, and fasted 18 hr before experimental use. All animal treatment and surgical procedures were performed in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institute of Health (Bethesda, MD) and were approved by the local Ethics Committee.

### 2.2- Drugs and solutions.

Zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX), ferriprotoporphyrin IX chloride (hemin), ODQ and dimanganese decacarbonyl (DMDC) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Biliverdin was purchased from Porphyrin Products (Logan, UT, USA). ZnPP IX was dissolved in 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, hemin and biliverdin in 1 mM NaOH, DMDC and ODQ in DMSO. All drugs were protected from light, except DMDC, which was exposed to cold light before administration to mice.

### 2.3- Ethanol-induced gastric mucosal damage

After an 18-h fast, groups of mice orally received ethanol at concentrations of 25% and 50% (0.5 ml Kg<sup>-1</sup>) and were sacrificed one hour later. Stomachs were rapidly excised, opened along the greater curvature, washed with water and extended on a plastic board. The mucosal lesion area (mm<sup>2</sup>) was measured by planimetry using an Image J program. Gastric corpus fragments were then weighed, frozen and stored at -70°C until assayed for glutathione (GSH) (Sedlak & Lindsay, 1968), malonylaldehyde (MDA) (Mihara and Uchiyama, 1978) or bilirubin (Foresti *et al.*, 2003).

#### 2.4- Experimental protocol 1.

After an 18-hour fast, mice were injected intraperitoneal (i.p.) with hemin (1.0, 3.0 or 10 mg Kg<sup>-1</sup>), biliverdin (1.0, 3.0 or 10 mg Kg<sup>-1</sup>), DMDC, a CO donor (2.5, 7.5 or 12.5 μmol Kg<sup>-1</sup>), or an equivalent volume of their respective vehicles. Thirty minutes later, ethanol at a 50% concentration (0.5 ml Kg<sup>-1</sup>) was administered by gavage. Another group of mice was injected i.p. with ZnPP IX, a nonspecific HO-1 inhibitor (0.3, 1.0 or 3.0 mg Kg<sup>-1</sup>), or with an equivalent volume of its respective vehicle. Thirty minutes later, ethanol at a 25% concentration (0.5 ml Kg<sup>-1</sup>) was administered by gavage. One hour later, animals were killed by cervical dislocation. Stomachs were rapidly excised, opened along the greater curvature, washed with water and extended on a plastic board. The mucosal lesion area (mm<sup>2</sup>) was measured as described above. Fragments of the mucosa were immediately frozen and stored at -70°C until assayed for GSH, MDA or bilirubin.

#### 2.5- Experimental protocol 2.

After an 18-hour fast, mice were treated by i.p. injection with a soluble guanylate cyclase (sGC) inhibitor, ODC, at a dose of 25 mg Kg<sup>-1</sup>. After 30 minutes, hemin (3 mg Kg<sup>-1</sup>, i.p), biliverdin (3 mg Kg<sup>-1</sup>, i.p), DMDC (12.5 μmol Kg<sup>-1</sup>, i.p) or an equivalent volume of their respective vehicles was administered. Thirty minutes later, absolute ethanol at 50% concentration (0.5 ml Kg<sup>-1</sup>) was administered by gavage. One hour later, animals were killed by cervical dislocation. Stomachs were rapidly excised, opened along the greater curvature, washed with water and extended on a plastic board. The mucosal lesion area (mm<sup>2</sup>) was measured as previously described above.

#### 2.6- GSH assay.

Reduced glutathione (GSH) content in stomach tissues as non-protein sulfhydryls was estimated according to the method described by Sedlak and Lindsay (1968). A glandular segment from each stomach was homogenized in 5 ml of ice-cold 0.02 M EDTA solution (1 ml 100 mg<sup>-1</sup> tissue). Aliquots (400 μl) of tissue homogenate were mixed with 320 μl of distilled water and 80 μl



of 50% (w/v) trichloroacetic acid in glass tubes and centrifuged at  $3000 \times g$  for 15 min. Supernatants (400  $\mu$ l) were mixed with 800  $\mu$ l Tris buffer (0.4 M, pH 8.9), and 20  $\mu$ l 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB; 0.01 M) were added. After shaking the reaction mixture, the absorbance was measured at 412 nm within 5 min of 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) addition against a blank with no homogenate. The glutathione concentration was read off a standard curve and expressed as  $\mu$ g GSH  $g^{-1}$  of wet tissue.

#### 2.7- Malonylaldehyde levels.

Lipid peroxidation estimation was determined by measuring malonylaldehyde (MDA) production by using a thiobarbituric acid reaction (Mihara and Uchiyama, 1978). Briefly, 250  $\mu$ l of 10% homogenate of tissue sample plus 1.5 ml of 1%  $H_3PO_4$  and 0.5 ml of 0.6% thiobarbituric acid aqueous solution mixture was stirred and heated in boiling water for 45 min. After cooling, 2 ml of *n*-butanol were added and shaken, then the butanol layer was separated by centrifugation; the optical density of the *n*-butanol layer was determined at 535 and 520 nm and the optical density difference between both determinations was calculated and considered as the value for thiobarbituric acid. MDA concentrations were expressed as nanomoles  $g^{-1}$  of tissue.

#### 2.8- Histological assessment

For histological assessment, the glandular stomach was fixed in 10% neutral buffered formalin solution, sectioned and embedded in paraffin. Four micrometer-thick sections were deparaffinized, stained with hematoxylin and eosin, and then examined under a light microscope. Specimens were assessed according to the criteria of Laine *et al.*, 1988. In brief, a 1-cm length of each histological section was assessed for epithelial cell loss (a score of 0 to 3), edema in the upper mucosa (a score of 0 to 4), hemorrhagic damage (a score of 0 to 4), and presence of inflammatory cells (a score of 0 to 3). Afterwards, sections were evaluated by an experienced histopathologist (GACB) who was blinded to the experimental conditions.

### 2.9- HO-1 immunohistochemistry in gastric tissue.

The formalin-fixed colonic tissue was embedded in paraffin, and sections were dewaxed. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 30 min. After blocking in 0.05 mol l<sup>-1</sup> Tris-buffered saline (TBS) containing 3% normal horse serum and 0.3% Triton X-100 for 30 min, sections were rinsed with TBS buffer and incubated with mouse polyclonal IgG HO-1 antibodies (Santa Cruz,) diluted to 1:400 overnight at 4°C. The tissue was stained for antigen-antibody complexes using a peroxidase detection system (LSAB kit, DAKO).

### 2.10- Total RNA isolation and PCR.

Total RNA was isolated from mouse gastric tissue with TRIzol reagent (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). cDNA was amplified from RNA with the use of Thermoscript RT-PCR system reagent (GIBCO BRL). Primers were designed according to previously published sequences. Sense (AGC AGA ACC CAG TCT ATG CC) and antisense primers (CCA CCT CGT GGA GAC GCT T) for HO-1 (159-bp fragment) and sense (ACA TCC AAG GAA GGC AGC AG) and antisense primers (GCT GGA ATT ACC GCG GCT G) for 18S (179-bp fragment) were used. The 18S fragment was employed for internal control. For HO-1 and 18S amplifications, 30 cycles of PCR consisting of 1 min at 94°C for denaturing, 1 min at 60°C for annealing, and 8 min (final cycle) at 72°C for elongation, were conducted.

### 2.11- Bilirubin determination in tissue.

Briefly, 100 mg of frozen gastric tissue was homogenized in 1 ml of saline. Aliquots of 500 µl of homogenate were added to 250 mg of BaCl<sub>2</sub> and vortex-mixed thoroughly, as described by Foresti *et al.* (2003), with some modifications. Then, 0.75 ml of benzene was added to the mixture, and tubes were vigorously vortex-mixed again. The benzene phase containing extracted bilirubin was separated from the aqueous phase by centrifugation at 13000 *g* for 30 min. A standard bilirubin curve was obtained using commercial bilirubin (Labtest, Brazil). Bilirubin was

measured spectrophotometrically, as the absorbance difference between 450 and 600 nm and expressed as  $\text{mg dl}^{-1}$  (Foresti *et al.*, 2003).

#### 2.12- Statistical analysis.

Data were presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean of six to eight mice. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test, when appropriate. For histological assessment, the Kruskal-Wallis nonparametric test was used, followed by a Dunn's test for multiple comparisons. Differences were considered to be significant when  $P \leq 0.05$ .

### 3- Results

In this experimental model, ethanol at 50% concentration resulted in mucosal lesion in the stomach (Figure 1A), a significant increase in MDA levels ( $P<0.001$ ) and reduced ( $P<0.001$ ) GSH concentration in gastric tissue in comparison to the control group (Table 1). In Figure 3, we observed that HO-1 immunoreactivity was more robustly detected in gastric tissue 3 h after administration of 50% ethanol (panel B), and ethanol (50%) increased HO-1 mRNA transcripts when compared to the control group (panel C).

The administration of hemin (HO-1 inducer), biliverdin (product of the HO-1 system cleavage), and DMDC (CO donor) significantly reduced dose-dependent gastric damage (Figure 1) and MDA formation and increased GSH concentration in ethanol-induced gastropathy (Table 1). In the microscopic analysis (Table 2), gastric administration of ethanol induced disruption of the gastric gland superficial region with epithelial cell loss and intense hemorrhage, when compared to the control group. Hemin, biliverdin and DMDC significantly decreased hemorrhagic damage, edema and epithelial cells loss induced in gastric mucosa by ethanol administration (Table 2).

Absolute ethanol at 25% resulted in macroscopic (Figure 2) and microscopic (Table 4) mucosal lesion in the stomach. In Table 2, we observed that ethanol at a dose of 25% significantly increased MDA levels ( $P<0.001$ ) and reduced ( $P<0.001$ ) GSH concentration in the gastric tissue when compared to the ethanol group. HO-1 inhibition by ZnPP IX amplified the ethanol-induced macroscopic (Figure 2) and microscopic (Table 4) gastric lesion at a dose of 25% in a dose-dependent manner, increasing MDA formation and decreasing GSH concentration in gastric mucosa (Table 3).

Table 5 showed that hemin and biliverdin treatment resulted in bilirubin accumulation in gastric tissue during ethanol-induced gastropathy. However, administration of DMDC, the CO

donor, did not change bilirubin levels in gastric mucosa when compared to the 50% ethanol group.

Figure 4 illustrates that ODQ, a soluble guanylate cyclase inhibitor (sGC), reversed DMDC-induced gastroprotection, in ethanol-induced gastropathy. On the other hand, the gastroprotective effect of hemin and biliverdin did not change with ODQ treatment.

#### 4- Discussion and Conclusions

We demonstrated that ethanol administration resulted in severe macroscopic and microscopic gastric mucosal damage through an increase in reactive oxygen species generation and a decrease in endogenous anti-oxidant defense mechanisms (Jonsson *et al.*, 2007). Over the last few years, studies have demonstrated that up-regulation of HO-1 by hemin increased biliverdin and CO production, and decreased the redox state and inflammatory processes (Wagener *et al.*, 2003). It has also been shown that HO-1 has protective effects in colitis models (Hegazi *et al.*, 2005; Varga *et al.*, 2007). In 2008, Ueda *et al.* demonstrated that application of HCL caused an increase in HO-1 mRNA levels in gastric mucosa after application of HCl, and that pre-treatment with ZnPP (HO-1 inhibitor) significantly exacerbated HCl-induced acute gastric mucosal lesions (Ueda *et al.*, 2008). However, the role of specific HO-1 enzymatic products in gastric defense was not completely elucidated. Our results indicate that the HO-1/biliverdin/CO pathway plays a protective role against ethanol-induced gastric damage and that these preventive effects probably result from decreased free radical production.

We confirmed that absolute ethanol caused gastric damage with severe hemorrhage, increased lipid peroxidation and decreased GSH concentrations in gastric mucosa (Cho *et al.*, 2001). We also demonstrated that ethanol increased HO-1 mRNA transcripts and HO-1 immunoreactivity in gastric mucosa. Furthermore, bilirubin measurements in gastric mucosa after ethanol administration showed an increase in the generation of this bile pigment. Therefore, we can infer that during ethanol-induced gastric damage, there was an increase in the HO-1 expression, probably as a response to oxidative stress.

Using a pharmacological approach, we demonstrated that HO-1/biliverdin/CO pathway offers a protective effect against ethanol-induced gastric damage. Treatment with an HO-1 inducer (hemin), HO-1 product (biliverdin) or CO donor (DMDC) decreased ethanol-induced

gastropathy. As demonstrated in literature related to colitis models, HO-1 induction by cobalt protoporphyrin or heme significantly reduced colonic damage and inflammation (Hegazi *et al.*, 2005; Varga *et al.*, 2007). Yao *et al.* demonstrated that HO-1 up-regulation by quercetin protected human hepatocytes from ethanol-induced oxidative stress (Yao P *et al.*, 2007). Recently, it was also proven that ketamine diminishes gastric mucosa susceptibility to damage from luminal irritants during endotoxemia partially mediated by up-regulation of HO-1 (Helmer *et al.*, 2006). We also verified that a HO-1 enzyme inhibitor, zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX), increased gastric damage induced by ethanol. This observation is also supported by the literature. Wang *et al.* showed that a reduction of HO-1 activity by ZnPP IX induced a substantial colonic inflammation aggravation in colitis models (Wang *et al.*, 2001). Therefore, our results suggest that the generation of biliverdin and CO by HO-1 expression may protect the gastric mucosa against ethanol-induced gastric damage.

It was also demonstrated that HO-1 induction may protect cells against oxidative injury through different mechanisms, such as controlling intracellular levels of “free” heme (which can work as a pro-oxidant), producing biliverdin (which possesses anti-oxidant properties), improving nutritive perfusion via CO release, and inducing Fe-binding protein ferritin synthesis (Bauer and Bauer, 2002) by free iron release (Ryter and Tyrrell, 2000). In order to test if an anti-oxidative property may be one of the possible mechanisms through which HO-1/biliverdin/CO pathway ameliorated ethanol-induced gastric damage, we evaluated the effect of HO-1 inducer (hemin), HO-1 product (biliverdin) and CO donor (DMDC) treatment on lipid peroxidation and GSH concentration in gastric mucosa after ethanol administration. Table 3 shows that hemin, biliverdin and DMDC pre-treatment significantly reduced gastric MDA formation and increased GSH concentrations in ethanol-induced gastropathy. Furthermore, Table 4 illustrates that the HO-1 enzyme inhibitor, ZnPP IX, increased MDA formation and decreased GSH concentrations in ethanol-induced gastropathy. The literature demonstrated that bilirubin has anti-oxidant

properties against oxidative stress *in vivo* and *in vitro* (Tomaro and Batlle, 2002; Mancuso, 2004). It was established that physiological concentrations of bilirubin protect endothelial cells against hydrogen peroxide-mediated injury and prevent protein oxidation in human blood plasma (Ryter *et al.*, 2007). It was also demonstrated that HO-1-derived CO plays a pivotal role in mediating cytoprotection against oxidant-induced injury (Ryter and Tyrrell, 2000, Amersi *et al.*, 2002). Otterbein *et al.* have also demonstrated that rat exposure to low CO concentrations increases tolerance to hyperoxic lung injury (Otterbein *et al.*, 2005). Our results suggest that generation of biliverdin and CO by HO-1 expression may have anti-oxidative properties in ethanol-induced gastropathy.

Recent studies reported that CO has a number of important physiological properties activated through soluble guanylate cyclase and the elevation of intracellular cGMP levels. It seems to play an important role in blood flow regulation and resistance in several vascular beds (Ryter and Otterbein, 2004). Using a pharmacological approach, we demonstrated that soluble guanylate cyclase inhibition by ODQ reversed the protective effects of DMDC, a CO donor, against ethanol-induced gastric damage, but did not affect the gastroprotective effects of hemin and biliverdin. Our results are in accordance with the literature; some works have demonstrated that CO activates soluble guanylate cyclase (Ryter and Otterbein, 2004, Morita *et al.*, 1995), and that this activation could decrease inflammatory processes (Freitas *et al.*, 2006). Therefore, we can suggest that HO-1-generated CO, opposite to biliverdin, does activate cGMP production, which induces a gastric protective effect, probably through an increase in gastric blood flow.

In conclusion, our results indicate that the HO-1/biliverdin/CO pathway plays a protective role against ethanol-induced gastric damage due to mechanisms that can be dependent (CO) or independent (biliverdin) of GC activation. While there are many mechanisms through which this effect can occur, our data supports the hypothesis that decreased free radical production is of



primary importance. Results also suggest that CO and biliverdin could be tools for clinical therapies of gastric inflammation .

### **5- Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge the financial support from CNPq (Brazil) and the technical assistance of Maria Silvandira Freire França, Drs. Lima, Ribeiro, Brito, Cunha, and Souza, who are recipients of a CNPq fellowship. This work is part of the requirements to obtain a PhD degree in Pharmacology in Federal University of Ceará – UFC, School of Medicine, for AS Gomes.

## 6- Legends

Figure 1. HO-1 inducer, hemin (panel A), biliverdin (BLV, panel B) and dimanganese decacarbonyl, (DMDC, panel C), prevents ethanol-induced gastric damage. Pre-treatment of animals with hemin, biliverdin and DMDC reduced the ethanol-induced gastric lesion, in a dose-dependent manner. The control group (CONT) was treated with saline alone. The total area of macroscopic gastric lesions was determined after 1 h. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. for at least five animals per group. (\*)  $P < 0.001$ , when compared to the control. (\*\*)  $P < 0.05$ , when compared to the ethanol group. ANOVA and a Newman-Keuls test were used for evaluation.

Figure 2. Role of Zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX) in ethanol-induced gastric damage in the mice. Animal pre-treatment with ZnPP IX increased ethanol-induced gastric lesion, in a dose-dependent manner. Mice were pre-treated (i.p.) with doses of ZnPP IX (0.3; 1.0 and 3.0 mg Kg<sup>-1</sup>) or with their respective vehicles. After 30 min, ethanol 25% was injected by gavage. The control group (CONT) was treated with saline. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. for at least five animals per group. (\*)  $P < 0.05$ , when compared to the control group. (\*\*)  $P < 0.05$ , when compared to the ethanol 25% group. ANOVA and a Newman-Keuls test were used for evaluation.

Figure 3. Photomicrographs of gastric mucosa (Magnifications, x100) (panel A) showing HO-1 immunoreactivity was absent in normal gastric tissue (panel A), but HO-1 immunoreactivity was detected in the vascular endothelial, epithelial, and smooth muscle cells of gastric tissues 3 h after administration of the ethanol 50% (panel B). Panel C: PCR analysis of 18S (A) and HO-1 mRNA (B)

from gastric tissues after ethanol 50% and hemin plus ethanol 50% administration. PCR showed low HO-1 expression in normal mice gastric tissue (control group). After ethanol 50% administration, HO-1 mRNA transcripts increased significantly when compared to the control group.

Figure 4. Role of a soluble guanylate cyclase (sGC) in the gastroprotective effect of HO-1/biliverdin/CO pathway against ethanol-induced gastric damage. Animal pre-treatment with ODQ reversed DMDC gastroprotection, but not hemin or biliverdin (BLV) gastroprotection. ODQ (12.5 mg Kg<sup>-1</sup>, i.p.) was administered 30 min before hemin treatment (3 mg Kg<sup>-1</sup>), BLV (3 mg Kg<sup>-1</sup>), DMDC (12.5 µmol mg Kg<sup>-1</sup>) or treatment with their respective vehicles. After 30 min, ethanol 50% was injected by gavage. The control group was treated with saline. Results are expressed as the mean ± S.E.M. for at least five animals per group. \*\*) P<0.05, when compared to the ethanol 50% group. (\*\*\*) P<0.05, when compared to the ethanol 50% + DMDC group. ANOVA and a Newman-Keuls test were used for evaluation.

Figure 1

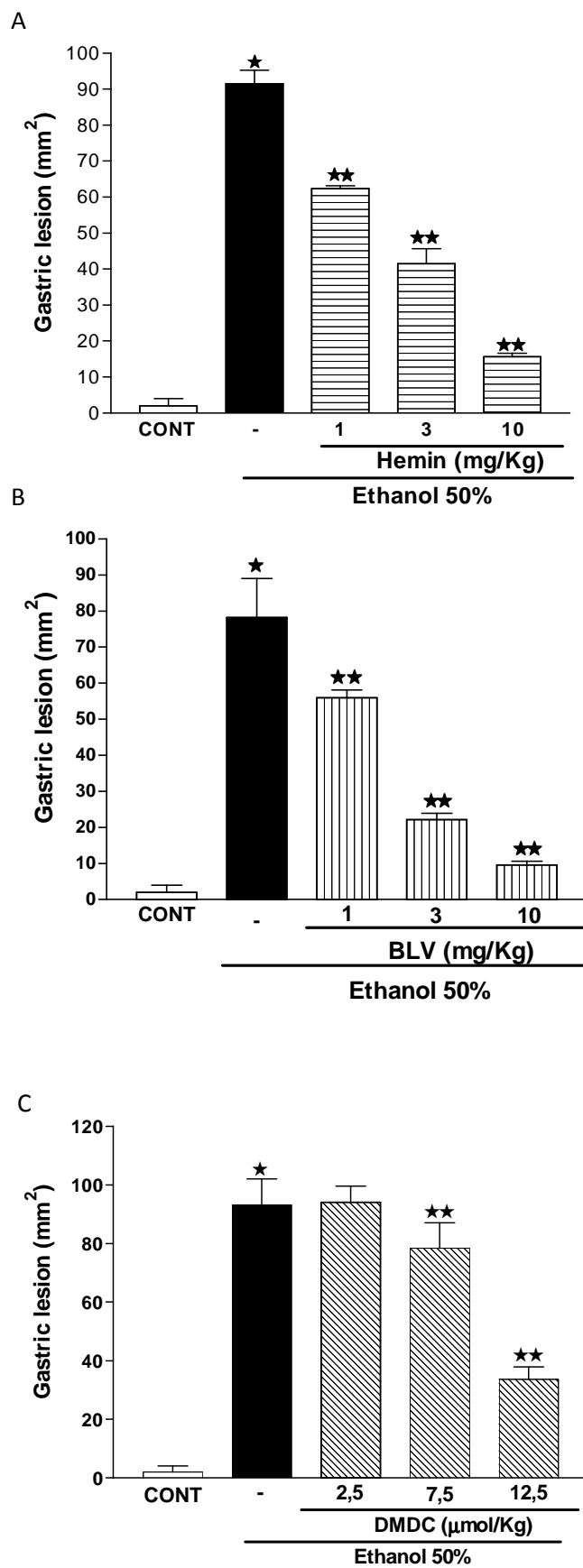


Figure 2

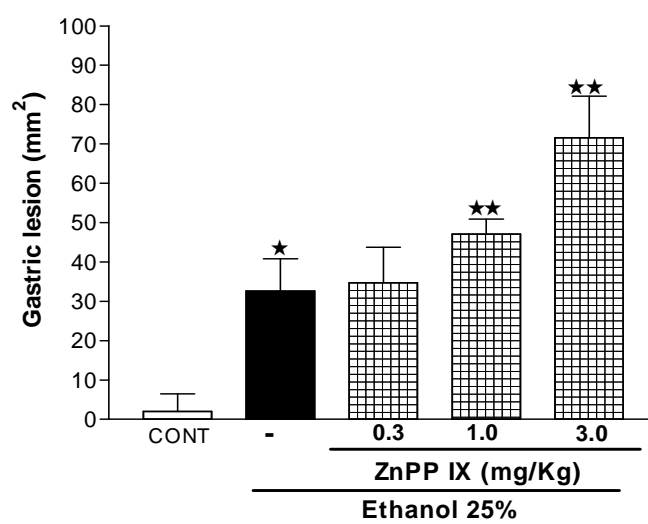


Figure 3

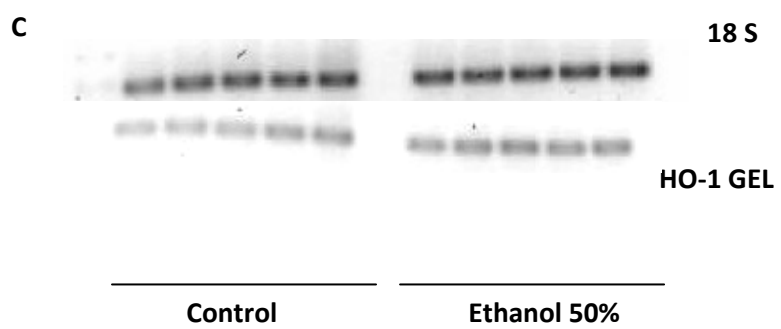
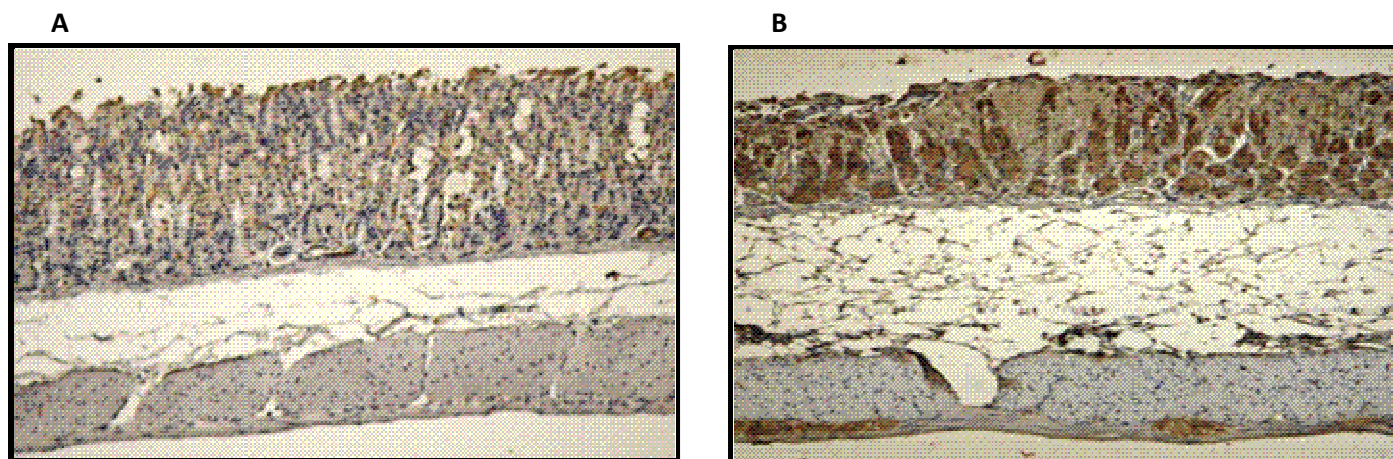


Figure 4

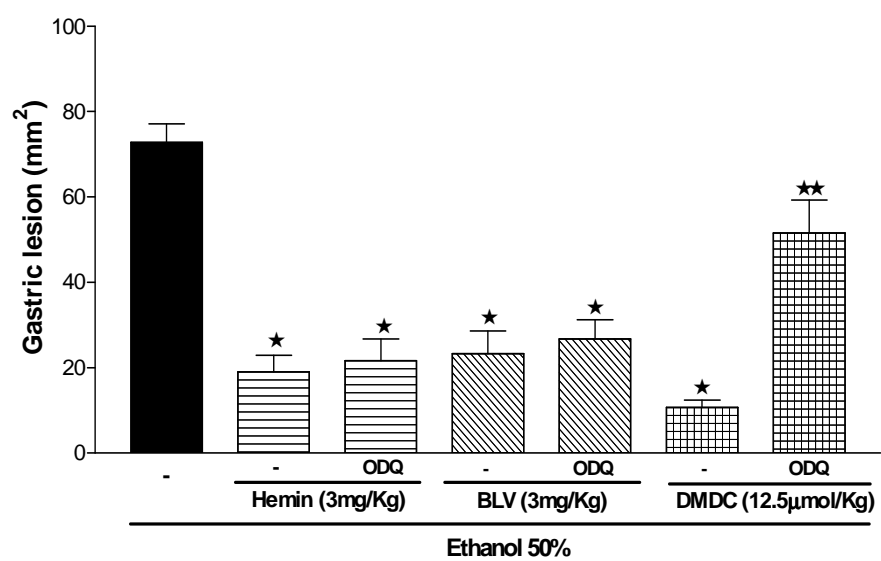


Table 1- Effect of hemin (10 mg Kg<sup>-1</sup>), biliverdin (10 mg Kg<sup>-1</sup>) or dimanganese decacarbonyl (DMDC) (12.5 μmol Kg<sup>-1</sup>) treatment in malonylaldehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels during ethanol-induced gastric damage in mice.

		Ethanol 50%			
	Control	Vehicle	Hemin	Biliverdin	DMDC
MDA (nmol/g of tissue)	79.4±0.6	177.7±9.9*	72.1±2.7**	81.4±4.0**	90.1±12.3**
GSH (μg/g of tissue)	243.4±13.2	56.2±7.6*	140.8±8.2 **	333.8±19.5 **	188.9±8.6 **

(\*) p<0.05, when compared with the control group.

(\*\*) p<0.05, when compared with the absolute ethanol group.



Table 2- Effect of hemin (10 mg Kg-1), biliverdin (10 mg Kg-1), dimanganese decacarbonyl (DMDC) (12.5  $\mu$ mol Kg-1) against ethanol-induced microscopic damage in gastric mucosa.

Experimental group (N=6)	Hemorrhagic damage (score 0 - 4)	Edema (score 0 - 4)	Epithelial cell loss (score 0 - 3)	Inflammatory cells (score 0 - 3)	Total (scores 14)
Saline	0	0	0	0	0
Ethanol 50%	4 (3 - 4)*	4 (3 - 4)*	3 (2 - 3)*	0	11 (8 - 11)*
Hemin+ Ethanol 50%	1 (0 - 2)**	1 (0 - 1)**	0 (0 - 1)**	0	2 (0 - 2)**
Biliverdin+ Ethanol 50%	1 (0 - 2)**	1 (1 - 0)**	1 (1 - 2)**	0	2 (1 - 2)**
DMDC+ Ethanol 50%	1 (0 - 3)**	2 (1 - 2)	1 (1 - 3)	0	5 (2 - 7)**

(\*)  $p < 0.05$ , when compared with the control group.

(\*\*)  $p < 0.05$ , when compared with the absolute ethanol group.

Table 3 - Malonylaldehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels in the gastric tissue of mice treated with Zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX) (3 mg Kg<sup>-1</sup>) during ethanol-induced gastric damage.

		Ethanol 25%	
	Control	Vehicle	ZnPP IX
MDA (nmol/g of tissue)	28.9±7.7	50.6±7.6*	149.6±13**
GSH (ug/g of tissue)	218.8±23.1	181.7±4.7*	82.0±4.7**

(\*) p<0.05, when compared with the control group.

(\*\*) p<0.05, when compared with the absolute ethanol group.

Table 4- Effect of Zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX) (3 mg Kg<sup>-1</sup>) in ethanol-induced microscopic damage in gastric mucosa in mice.

Experimental group (N=6)	Hemorrhagic damage (score 0 - 4)	Edema (score 0 - 4)	Epithelial cell loss (score 0 - 3)	Inflammatory cells (score 0 - 3)	Total (scores 14)
Saline	0	0	0	0	0
Ethanol 25%	3 (3 - 4)*	3 (3 - 4)*	3 (2 - 3)*	0	9 (8 - 11)*
ZnPP IX + Ethanol 25%	4 (3 - 4)**	4 (2 - 4)**	2 (2 - 3)	0	10 (8 - 11)**

(\*)  $p < 0.05$ , when compared with the control group.

(\*\*)  $p < 0.05$ , when compared with the absolute ethanol group.

Table 5 - Bilirubin levels in mice before treatment with hemin (10 mg Kg<sup>-1</sup>), biliverdin (10 mg Kg<sup>-1</sup>) or dimanganese decacarbonyl (DMDC) (12.5 μmol Kg<sup>-1</sup>) during ethanol-induced gastric damage.

		Ethanol 50%			
	Control	Vehicle	Hemin	Biliverdin	DMDC
Bilirubin (mg/dL)	0.19±0.02	0.43±0.03*	0.67±0.03**	1.0±0.04**	0.50±0.03*

(\*) p<0.05, when compared with the control group.

(\*\*) p<0.05, when compared with the absolute ethanol group.

## 7- References

- Amersi F, Nelson SK, Shen XD, Kato H, Melinek J, Kupiec-Weglinski JW, Horwitz LD, Busuttill RW, Horwitz MA (2002). Bucillamine, a thiol antioxidant, prevents transplantation-associated reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci* 25;99(13):8915-20.
- Bast A, Haenen GR, Doelman CJ (1988). Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 91: 2S-13S
- Bauer M, Bauer I (2002). Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 4(5):749-58.
- Cho CH, Pfeiffer CJ, Misra HP (2001). Ulcerogenic mechanism of ethanol and the action of sulphanilyl fluoride on the rat stomach in-vivo. *J Pharm Pharmacol* 43: 495-498.
- Foresti R, Hoque M, Bains S, Green CJ, and Motterlini R (2003). Haem and nitric oxide: synergism in the modulation of the endothelial haem oxygenase-1 pathway. *Biochem J* 372:381-390.
- Freitas A, Alves-Filho JC, Secco DD, Neto AF, Ferreira SH, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ (2006). Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *Br. J. Pharmacol*. 149(4):345-54.
- Gottfried EB, Korsten MA, Lieber CS (1978). Alcohol-induced gastric and duodenal lesions in man. *Am J Gastroenterol*.70(6):587-92.
- Hegazi RA, Rao KN, Mayle A, Sepulveda AR, Otterbein LE, Plevy SE (2005). Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. *J Exp Med*.19;202(12):1703-13.
- Helmer KS, Suliburk JW, Mercer DW (2006). Ketamine-induced gastroprotection during endotoxemia: role of heme-oxygenase-1. *Dig Dis Sci*. 51(9):1571-81; 2006 Aug 22.

Ito M, Suzuki Y, Ishihara M, Suzuki Y (1998). Anti-ulcer effects of antioxidants: effect of probucol. *Eur J Pharmacol.* 7; 354(2-3):189-96.

Jonsson IM, Verdrengh M, Brisslert M, Lindblad S, Bokarewa M, Islander U, Carlsten H, Ohlsson C, Nandakumar KS, Holmdahl R, Tarkowski A (2007). Ethanol prevents development of destructive arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(1):258-63.

Kirkby KA, Adin CA (2006). Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290(3):F563-71.

Tomaro ML, Batlle AM (2002). Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol.* 34(3):216-20.

Laine L (1991). Endoscopic therapy for peptic ulcer hemorrhage: heater probe and alcohol injection. *Gastroenterology* 100(2):575-7.

Laine L, Weinstein WM (1988). Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. *Gastroenterology.* 94(6):1254-62.

Lutnicki, Wrobel J, Ledwozyw A, Trebas-Pietras E (1992). The effect of calcium ions on the intensity of peroxidation processes and the severity of ethanol-induced injury to the rat's gastric mucosa. *Arch. Vet. Pol.* 32: 125-132.

Maines, MD (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37:517-54.

Mancuso C (2004). Heme oxygenase and its products in the nervous system. *Antioxid Redox Signal.* 6(5):878-87.

Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 86(1):271-8.

Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S (1995). Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci.* 28;92(5):1475-9.

Nath KA (2006). Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. *Kidney Int.* 70(3):432-43.

Otterbein LE, May A, Chin BY (2005). Carbon monoxide increases macrophage bacterial clearance through Toll-like receptor (TLR)4 expression. *Cell Mol Biol* 3;51(5):433-40.

Ryter SW, Otterbein LE (2004). Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* 26(3):270-80.

Ryter SW, Tyrrell RM (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Hemeoxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 15; 28(2):289-309.

Ryter SW, Morse D, Choi AM (2007). Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 36(2):175-82.

Sedlak J, Lindsay RH (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25(1): 1192-1205.

Szabo S, Trier JS, Brown A, Schnoor J (1985). Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology* 88(1 Pt 2):228-36.

Takahashi T, Morita K, Akagi R, Sassa S (2004). Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries. *Curr Med Chem.* 11(12):1545-61.

Ueda K, Ueyama T, Yoshida K, Kimura H, Ito T, Shimizu Y, Oka M, Tsuruo Y, Ichinose M (2008). Adaptive HNE-Nrf2-HO-1 pathway against oxidative stress is associated with acute gastric mucosal lesions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 295(3):G460-9.

Varga C, Laszlo F, Fritz P, Cavicchi M, Lamarque D, Horvath K, Posa A, Berko A, Whittle BJ (2007). Modulation by heme and zinc protoporphyrin of colonic heme oxygenase-1 and experimental inflammatory bowel disease in the rat. *Eur J Pharmacol.* 30;561(1-3):164-71.

Wagener FA, van Beurden HE, von den Hoff JW, Adema GJ, Figdor CG (2003). The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing. *Blood.* 15; 102(2):521-8.

Wang WP, Guo X, Koo MW, Wong BC, Lam SK, Ye YN, Cho CH (2001). Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281(2):G586-94.

Yao P, Nussler A, Liu L, Hao L, Song F, Schirmeier A, Nussler N (2007). Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *J Hepatol.* 47(2):253-61.