



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

**JAND-VENES ROLIM MEDEIROS**

**EFEITOS GASTROPROTETOR E PROCINÉTICO DO SULFETO DE  
HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S) EM CAMUNDONGOS - PAPEL DOS NEURÔNIOS  
AFERENTES SENSÍVEIS A CAPSAICINA, RECEPTORES VANILÓIDES DO TIPO  
1 (TRPV1) E CANAIS DE K ATP-DEPEDENTES (K<sub>ATP</sub>)**

**FORTALEZA**

**2009**

**JAND-VENES ROLIM MEDEIROS**

**EFEITOS GASTROPROTETOR E PROCINÉTICO DO SULFETO DE  
HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S) EM CAMUNDONGOS - PAPEL DOS NEURÔNIOS  
AFERENTES SENSÍVEIS A CAPSAICINA, RECEPTORES VANILÓIDES DO TIPO  
1 (TRPV1) E CANAIS DE K ATP-DEPEDENTES (K<sub>ATP</sub>)**

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

Orientador:

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza

Co-orientador:

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares

FORTALEZA

2009

M439e Medeiros, Jand-Venes Rolim

Efeitos gastroprotetor e procinético do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) em camundongos – papel dos neurônios aferentes sensíveis e capsaicina, receptores vanilóides do tipo 1 (TRPV1) e canais de K ATP-dependentes / Jand-Venes Rolim Medeiros. – Fortaleza, 2009.

128 f. : il.

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

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2009.

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares

1. Sulfeto de Hidrogênio 2. Gastropatias 3. Etanol 4. Canais de Potássio I. Souza, Marcellus Henrique Loiola Ponte de (orient.) II. Título

CDD: 616.3

**JAND-VENES ROLIM MEDEIROS**

**EFEITO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S) NA DEFESA DA MUCOSA E  
CONTROLE DA MOTILIDADE GÁSTRICA - PAPEL DOS NEURÔNIOS  
AFERENTES, RECEPTORES VANILÓIDES DO TIPO 1 (TRPV1) E CANAIS DE K  
ATP-DEPEDENTES (K<sub>ATP</sub>)**

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

**Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos**  
Universidade Federal do Ceará

---

**Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares**  
**(Co-orientador)**  
Universidade Federal do Ceará

---

**Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira**  
Universidade Federal do Piauí

---

**Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará**  
Universidade de São Paulo

*Agradeço ao grande arquiteto do universo por estar sempre iluminando os nossos caminhos.*

*Aos meus pais e minha irmã Regianne, pelo amor, dedicação e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos de minha vida.*

*Com amor dedico-lhes este trabalho, pois são eles os grandes responsáveis por mais esta conquista.*

*A minha esposa Waneska, pelo amor e  
companheirismo, pois se não tivesse o amor  
eu nada seria*

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

Aos bolsistas de iniciação científica **Victor e Nathanael**, pela grande ajuda na realização desse trabalho, meu sincero agradecimento;

A todos os integrantes do LAFICA, especialmente **Antoniella, Roberto, Dayse, Ana Paula, André Luiz, Pedro e Larisse** pela colaboração nas atividades laboratoriais, mas também pela amizade e inúmeros momentos compartilhados;

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

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

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento do meu projeto de mestrado.



*“A razão cardeal de toda a superioridade humana é  
sem dúvida a vontade. O poder nasce do querer.  
Sempre que o homem aplicar a perseverante energia  
de sua alma a um fim, ele vencerá obstáculos e se  
não atingir o alvo, pelo menos fará coisas admiráveis.”*

*José de Alencar*

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Recentemente, foi demonstrado que o H<sub>2</sub>S está envolvido em inúmeras funções fisiológicas e patológicas, sendo produzido em muitos tecidos de mamíferos. **OBJETIVOS:** Avaliar o papel do H<sub>2</sub>S na defesa da mucosa e no controle da motilidade gástrica em camundongos, bem como estudar a participação dos canais de K<sub>ATP</sub>, dos neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina e dos receptores TRPV1 neste efeito. **MÉTODOS:** Camundongos Swiss foram pré-tratados com L-cisteína (25, 50 ou 100 mg/kg, v.o), NaHS (75, 150 ou 300 μmol/kg, v.o) ou Lawesson's (3, 9, 27 ou 81 μmol/kg, v.o). Trinta minutos depois, o etanol 50% (0,5ml/25g, v.o) foi administrado. Depois de 1 h, os animais foram sacrificados e os estômagos abertos para determinação da área da lesão usando planimetria computadorizada. Além disso, fragmentos de tecidos foram removidos para análise microscópica e dosagem de glutationa e malondialdeído. Para o estudo do esvaziamento gástrico, outro grupo experimental foi tratado, por gavagem, com as mesmas doses de L-cisteína, NaHS ou Lawesson's, decorridos 30 min os animais receberam uma solução glicosada (5%) contendo vermelho de fenol (0,75 mg/ml) em cada animal. Após 10, 20 ou 30 min os animais foram sacrificados e o esvaziamento gástrico foi avaliado por técnica de espectrofotometria. Em outro grupo experimental os animais foram pré-tratados com glibenclamida (3 e 10 mg/Kg, v.o.) ou capsazepina (10 mg/kg, i.p). Após 1h, foram administrados a L-cisteína (50 mg/kg) ou os doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS 150 μmol/kg ou o reagente de Lawesson's 27μmol/kg, v.o). Trinta minutos depois, o etanol 50% foi administrado para avaliação da lesão gástrica e solução de vermelho de fenol foi administrada para avaliar o esvaziamento gástrico conforme descrito anteriormente. Para o estudo dos neurônios aferentes, foi realizado protocolo de ablação dos com doses neurotóxicas de capsaicina. Após 8 dias, os animais receberam NaHS ou o Lawesson's e o protocolo de lesão gástrica por etanol 50% foi determinado como descrito acima. Também foi determinado a contratilidade espontânea do fundo gástrico incubado com doses crescentes de NaHS ou KCl (controle) utilizando um transdutor de força isométrico acoplado a um sistema de aquisição de dados. **RESULTADOS:** A administração de L-cisteína, NaHS ou Reagente de Lawesson's preveniu, de forma dose dependente, a lesão por etanol no estômago. Essa proteção foi acompanhada do aumento de GSH e diminuição dos níveis gástricos de MDA quando comparado com o grupo tratado apenas com etanol. Glibenclamida (10 mg/kg) e a capsazepina reverteram completamente esse efeito protetor dos doadores de H<sub>2</sub>S. Nos animais depletados de neurônios aferentes, também houve uma reversão do efeito protetor dos doadores de H<sub>2</sub>S e da L-cisteína. O NaHS, o Lawesson's e a L-cisteína promoveram aceleração do esvaziamento gástrico quando comparado com o controle, de maneira dose dependente. Este efeito procínético foi abolido pela pré-administração de glibenclamida e capsazepina O NaHS também foi capaz de induzir um aumento no tônus basal que iniciou-se com máximo efeito na concentração de 300 μM em relação à contração controle de KCl. **CONCLUSÕES:** o H<sub>2</sub>S preveniu a lesão gástrica, o consumo de GSH e aumento da peroxidação lipídica na mucosa gástrica, induzidos pela administração de etanol em camundongos. O H<sub>2</sub>S também apresentou efeito procínético, acelerando o esvaziamento gástrico de líquidos em camundongos. Podemos inferir que esses efeitos devem-se a ativação dos canais de K<sub>ATP</sub>, dos neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina e dos receptores TRPV1

**Palavras-chave:** *Sulfeto de hidrogênio. lesão gástrica. Etanol. esvaziamento gástrico. canais de K<sub>ATP</sub>. TRPV1.*

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Recently, the involvement of H<sub>2</sub>S has been demonstrated in several physiological and pathological conditions, being constitutively produced in mammalian tissues. **AIM:** To study the role of H<sub>2</sub>S on both the gastric mucosa defense and the control of gastric motility in mice, and additionally to evaluate the participation of K<sub>ATP</sub> channels, capsaicin-sensitive afferent neurons and TRPV1 receptors in these effects. **METHODS:** Swiss mice were pre-treated with either L-cysteine (25, 50 or 100 mg/kg, *p.o.*), NaHS (75, 150 or 300 μmol/kg, *p.o.*) or Lawesson's reagent (3, 9, 27 or 81 μmol/kg, *p.o.*). The animals were then given ethanol 50% (0.5ml/25g, *p.o.*) 30 min later. After 1h of ethanol instillation, the mice were sacrificed and had the stomach collected to measure the injured area through planimetry software. Moreover some samples were obtained to histopathological analysis, glutathione (GSH), and malonyldialdehyde (MDA) dosages. In the study of gastric empty, the animals were administered L-cysteine, NaHS or Lawesson's reagent, and 30 min later a phenol red solution (0.75 mg/ml) diluted in glucose (5%) was also given. The sacrifice was performed 10, 20 or 30 min after the latter to determine in a spectrophotometer the gastric empty. In another experimental setting, glibenclamide (3 or 10 mg/Kg, *v.o.*) or capsazepine (10 mg/kg, *i.p.*) were injected 1h previously to the L-cysteine (50 mg/kg, *p.o.*) or H<sub>2</sub>S donors (NaHS 150 μmol/kg or Lawesson's reagent 27μmol/kg, *p.o.*) instillation. In order to study the role of capsaicin-sensitive afferent neurons, high neurotoxic doses of capsaicin was instilled into the animals. On the 8<sup>th</sup> day post capsaicin injection, NaHS or Lawesson's reagent was administered. The protocol for ethanol administration, sacrifice, and dosages were repeated for these conditions as described previously. Finally, the spontaneous contraction of isolated gastric fundus to KCl (control contraction) and growing doses of NaHS was determined *in vitro* through and isometric force transducer connected to an acquisition system. **RESULTS:** L-cysteine, NaHS and Lawesson's reagent prevented, in a dose dependent manner, the ethanol-induced gastric injury. Besides, high and low levels of GSH and MDA were found respectively in comparison to the control group given only ethanol. Glibenclamide (10 mg/kg) and capsazepine completely reversed the protective effect of the H<sub>2</sub>S donors. The animals that undergone afferent neuronal ablation also developed gastric lesions despite the injection of L-cysteine and H<sub>2</sub>S donors. NaHS, Lawesson's reagent and L-cysteine all accelerated gastric empty in comparison to the control group and in a dose-dependent manner. Such prokinetic effect was abolished in glibenclamide and capsazepine pre-treated mice. The NaHS was also able to induce an increase in gastric fundus basal tonus *in vitro* presenting a ceiling effect in the concentration of 300μM when compared with the standard KCl contraction. **CONCLUSIONS:** The H<sub>2</sub>S prevented the ethanol-induced gastric damage, GSH consumption, and lipid peroxidation processes in the stomach mucosa of mice. The H<sub>2</sub>S also revealed a prokinetic effect leading to a higher liquid gastric empty in mice. Such results seem to be dependent on K<sub>ATP</sub> channels, sensory afferent neurons, and TRPV1 receptors activation.

**Keywords:** *Hydrogen sulfide. gastric damage. Ethanol. gastric emptying. K<sub>ATP</sub> channels; TRPV1.*

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AINEs** – Antiinflamatórios não esteroidais
- AMPc** – Monofosfato cíclico de adenosina
- AP1** – Fator transcricional do tipo AP1
- GMPc** – Monofosfato cíclico de guanosina
- CBS** - Cistationina  $\beta$ -sintetase
- CGRP** - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- cNOS** – NO sintase constitutiva
- CO** – Monóxido de carbono
- COX** – Ciclooxigenase
- COX1** – Ciclooxigenase do tipo 1
- COX2** – Ciclooxigenase do tipo 2
- CSE** - Cistationina  $\gamma$ -lyase
- DMSO** – Dimetil sulfóxido
- DO** – Densidade óptica
- ECL** – Células enterocromafins
- EDRF** – Fator de crescimento derivado do endotélio
- EGF** – Fator de crescimento epidérmico
- eNOS** – NO sintase endotelial
- K<sub>ATP</sub>** – Canais de potássio sensíveis ao ATP
- KDa** – Kilo dáltons
- Kg** – Kilograma
- FDA** – Food and Drug Administration

**GABA<sub>A</sub>** – Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GC** – Guanilato ciclase

**GI** - Gastrintestinal

**GSH** – Glutathiona reduzida

**GSPA** - Neurônios primários sensíveis á capsaicina

**iNOS** – NO sintase induzível

**LPS** – Lipopolissacarídeo bacteriano

**MDA** - Malondialdeído

**NANC** – Não-adrenérgicos não-colinérgicos

**NF- $\kappa$ B** – Fator nuclear kappa B

**NMDA** - *N*-metil-D-aspartato

**NO** – Óxido nítrico

**NOS** – enzima NO sintase

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PAG** - Propargilglicina

**PKA** – Proteína quinase A

**PKC** – Proteína quinase C

**PGE<sub>2</sub>** – Prostaglandina E2

**ROS** – Espécies reativas do oxigênio

**rpm** – Rotações por minuto

**SH-NP** - Grupos sulfidrílicos não-protéicos

**SNC** – Sistema nervoso central

**SP** – Substância P

**TGI** – Trato gastrintestinal

**TGF- $\alpha$**  – Fator de crescimento tumoral

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

**TRPV1** - Receptor potencial transiente de vanilóide do tipo 1

**VIP** – Polipeptídio intestinal vasoativo

**VSPA** - Neurônios aferentes primários sensíveis a vanilóides

**5-HT<sub>3</sub>** - Serotonina

## LISTA DE FIGURAS

1.	Esquema representativo dos efeitos do consumo agudo e crônico de etanol no estômago.....	27
2.	Principais vias endógenas de produção do sulfeto de hidrogênio.....	36
3.	Esquema representativo das etapas na síntese de glutathiona.....	41
4.	Esquema representativo do estômago de roedores, mostrando a região do fundo e corpo gástrico e evidenciando lesões lineares no corpo típico do etanol.....	54
5.	Efeito do sulfeto de hidrogênio na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....	66
6.	Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos (100x).....	68
7.	Imunohistoquímica para cistationina- $\gamma$ -liase (CSE) e cistationina- $\beta$ -sintetase (CBS) na mucosa gástrica de camundongos normais ou tratados com etanol 50%.....	69
8.	Efeito do sulfeto de hidrogênio sobre os níveis de glutathiona presentes na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol.....	70
9.	Efeito do sulfeto de hidrogênio sobre a concentração de MDA na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol.....	71
10.	Efeito do sulfeto de hidrogênio na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos pré-tratados com glibenclamida.....	74
11.	Determinação dos níveis de glutathiona presentes na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com glibenclamida.....	75
12.	Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) camundongos pré-tratados com glibenclamida no curso da lesão gástrica por etanol.....	76
13.	O efeito protetor do H <sub>2</sub> S na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos é mediado por fibras aferentes sensoriais.....	77
14.	O efeito protetor do H <sub>2</sub> S na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos é mediado por receptores TRPV1.....	78
15.	O efeito protetor do H <sub>2</sub> S sobre os níveis gástricos de GSH em camundongos é mediado por fibras aferentes sensoriais.....	79

16.	O efeito protetor do H <sub>2</sub> S sobre os níveis gástricos de GSH em camundongos é mediado por receptores TRPV1.....	80
17.	O efeito protetor do H <sub>2</sub> S sobre os níveis gástricos de MDA em camundongos é mediado por fibras aferentes sensoriais.....	81
18.	O efeito protetor do H <sub>2</sub> S sobre os níveis gástricos de MDA em camundongos é mediado por receptores TRPV1.....	82
19.	L-cisteína e doadores de H <sub>2</sub> S (NaHS e reagente de Lawesson's) aceleram o esvaziamento gástrico em camundongos.....	84
20.	Retenção gástrica de vermelho de fenol obtida em intervalos de 10, 20 e 30 minutos em camundongos acordados e tratados com L-cisteína ou doadores de H <sub>2</sub> S (NaHS e reagente de Lawesson's).....	85
21.	Glibenclamida inibe o efeito dos doadores de H <sub>2</sub> S (NaHS e reagente de Lawesson's) na aceleração do esvaziamento gástrico em camundongos.....	88
22.	Capsazepina inibe o efeito dos doadores de H <sub>2</sub> S (NaHS e reagente de Lawesson's) na aceleração do esvaziamento gástrico em camundongos.....	89
23.	Efeito do NaHS (doador de H <sub>2</sub> S) na contratilidade do fundo gástrico em camundongos.....	90
24.	Modelo hipotético dos efeitos do H <sub>2</sub> S no estômago.....	102



## LISTA DE TABELAS

1. Efeito dos doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS e reagente de Lawesson's), ou L-cisteína sozinha, ou com DL-propargilglicina (PAG) na lesão gástrica microscópica induzida por etanol 50%..... 67
2. Efeitos da L-cisteína ou doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS ou reagente de Lawesson's) na secreção gástrica após 4 horas de ligadura do piloro em camundongos..... 86

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Aspectos Históricos do Consumo de Álcool.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Úlcera Gástrica.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>Álcool e a Lesão Gástrica.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4</b>	<b>Fisiologia Gástrica: motilidade e secreção ácida gástrica.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5</b>	<b>Neurotransmissores Gasosos (Gasotransmissores).....</b>	<b>33</b>
<b>2.6</b>	<b>Sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S): Química, Toxicidade e Síntese.....</b>	<b>34</b>
<b>2.7</b>	<b>Sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S): Ações Fisiológicas.....</b>	<b>37</b>
<b>2.8</b>	<b>Mecanismos de Proteção Gástrica.....</b>	<b>39</b>
<b>2.9</b>	<b>Mecanismos de Proteção Gástrica: Glutathione Reduzida.....</b>	<b>40</b>
<b>2.10</b>	<b>Canais de Potássio Sensíveis ao ATP e a Proteção Gástrica.....</b>	<b>42</b>
<b>2.11</b>	<b>Neurônios Aferentes Sensíveis à Capsaicina e a Proteção Gástrica.....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2</b>	<b>Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais .....</b>	<b>48</b>
<b>4.3</b>	<b>Drogas Utilizadas .....</b>	<b>49</b>
<b>4.4</b>	<b>Corantes .....</b>	<b>50</b>
<b>4.5</b>	<b>Soluções .....</b>	<b>50</b>
<b>4.6</b>	<b>Estudo da atividade gastroprotetora.....</b>	<b>53</b>
<b>4.6.1</b>	<b>Efeito Protetor do Sulfeto de Hidrogênio na Lesão Gástrica Induzida por Etanol em Camundongos: Curva Dose-Resposta.....</b>	<b>53</b>
<b>4.7</b>	<b>Papel dos Canais de Potássio Sensíveis ao ATP (K<sub>atp</sub>) no Efeito Gastroprotetor do Sulfeto de Hidrogênio.....</b>	<b>54</b>

4.8	<b>Participação dos Neurônios Aferentes Sensíveis à Capsaicina na Proteção do Sulfeto de Hidrogênio Sobre a Lesão Gástrica Induzida por Etanol em Camundongos.....</b>	<b>55</b>
4.9	<b>Participação dos Receptores TRPV1 na Proteção do Sulfeto de Hidrogênio Sobre a Lesão Gástrica Induzida por Etanol em Camundongos.....</b>	<b>56</b>
4.10	<b>Avaliação Histopatológica da Mucosa Gástrica de Camundongos.....</b>	<b>56</b>
4.11	<b>Imunohistoquímica para Cistationina-<math>\gamma</math>-Liase (CSE) e Cistationina-<math>\beta</math>-Sintetase (CBS).....</b>	<b>57</b>
4.12	<b>Determinação dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) na Mucosa Gástrica de Camundongos.....</b>	<b>58</b>
4.13	<b>Determinação da Concentração de Malondialdeído (MDA) na Mucosa Gástrica de Camundongos.....</b>	<b>58</b>
4.14	<b>Avaliação da motilidade e secreção gástrica.....</b>	<b>59</b>
4.14.1	Efeito do Sulfeto de Hidrogênio no Esvaziamento Gástrico de Camundongos Acordados.....	59
4.15	<b>Papel dos Canais de Potássio Sensíveis ao ATP (<math>K_{atp}</math>) na Aceleração do Esvaziamento Gástrico do Sulfeto de Hidrogênio.....</b>	<b>60</b>
4.16	<b>Participação dos Receptores TRPV1 na Aceleração do Esvaziamento Gástrico Do Sulfeto de Hidrogênio.....</b>	<b>60</b>
4.17	<b>Efeito do Sulfeto de Hidrogênio na Secreção Gástrica de Camundongos</b>	<b>61</b>
4.18	<b>Avaliação da Contratilidade Gástrica Espontânea <i>In Vitro</i>.....</b>	<b>61</b>
4.19	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>62</b>
5	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
5.1	<b>Estudo da atividade gastroprotetora.....</b>	<b>63</b>
5.1.1	Efeito Protetor do Sulfeto de Hidrogênio na Lesão Gástrica Induzida por Etanol em Camundongos: Curva Dose-Resposta.....	63
5.2	<b>Avaliação Histopatológica da Mucosa Gástrica de Camundongos Tratados com L-Cisteína, Doadores de <math>H_2S</math> e/ou Etanol.....</b>	<b>63</b>
5.3	<b>Avaliação Imunohistoquímica para Cistationina-<math>\gamma</math>-Liase (CSE) e Cistationina-<math>\beta</math>-Sintetase (CBS) na Mucosa Gástrica de Camundongos Tratados Salina ou Etanol.....</b>	<b>64</b>

<b>5.4</b>	<b>Determinação dos Níveis de Glutathiona (GSH) na Mucosa Gástrica de Camundongos Pré-Tratados com L-Cisteína ou Doadores de H<sub>2</sub>S no Curso da Lesão Gástrica Induzida por Etanol.....</b>	<b>64</b>
<b>5.5</b>	<b>Determinação da Concentração de Malondialdeído (MDA) na Mucosa Gástrica de Camundongos Tratados com L-Cisteína ou Doadores de H<sub>2</sub>S no Curso da Lesão Gástrica Induzida por Etanol.....</b>	<b>65</b>
<b>5.6</b>	<b>Papel dos Canais de Potássio Sensíveis ao ATP (K<sub>atp</sub>) no Efeito Gastroprotetor do Sulfeto de Hidrogênio.....</b>	<b>72</b>
<b>5.7</b>	<b>Participação dos Neurônios Aferentes Sensíveis á Capsaicina e Papel dos Receptores TRPV1 na Proteção do Sulfeto de Hidrogênio Sobre a Lesão Gástrica Induzida por Etanol em Camundongos.....</b>	<b>72</b>
<b>5.8</b>	<b>Avaliação da motilidade e secreção gástrica.....</b>	<b>83</b>
<b>5.8.1</b>	<b>Efeito do Sulfeto de Hidrogênio no Esvaziamento Gástrico de Camundongos Acordados.....</b>	<b>83</b>
<b>5.9</b>	<b>Efeito do Sulfeto de Hidrogênio na Secreção Gástrica de Camundongos</b>	<b>83</b>
<b>5.10</b>	<b>Papel dos Canais de Potássio Sensíveis ao ATP (K<sub>atp</sub>) na Aceleração do Esvaziamento Gástrico do Sulfeto de Hidrogênio em Camundongos.....</b>	<b>87</b>
<b>5.11</b>	<b>Participação dos Receptores TRPV1 na Aceleração do Esvaziamento Gástrico do Sulfeto de Hidrogênio.....</b>	<b>87</b>
<b>5.12</b>	<b>Efeito do NaHS (Doador de H<sub>2</sub>S) na Contratilidade no Fundo Gástrico de Camundongos.....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>103</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>104</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>121</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O álcool é atualmente uma das poucas drogas psicotrópicas que tem seu consumo admitido e até incentivado pela sociedade. O impacto do etanol na sociedade é imenso. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) apresentado através de um indicador de saúde, designado DALYs (*Disability Adjusted Life Years*) o consumo excessivo de álcool é um dos principais responsáveis pelo percentual de anos perdidos no trabalho em razão de doença ou mortalidade precoce (WORLD AND HEALTH ORGANIZATION, 2002). Esse mesmo órgão divulgou na 60ª Assembléia Mundial de Saúde em Genebra que o consumo de etanol era responsável por 4,4% de todos os problemas de saúde no mundo, representando a quinta causa de morte prematura (WHO, 2002). No Brasil esse problema é ainda mais grave, com o consumo do álcool sendo responsável por mais de 10% dos problemas de saúde (MELONI; LARANJEIRA, 2004).

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

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

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

É conhecido que os processos de modulação neuronal, tais como a liberação de mediadores vasoativos, são cruciais para a resistência da mucosa gástrica a agentes agressivos (YONEI *et al.*, 1990). Vários achados têm sugerido que há interações entre mediadores vasodilatadores derivados do endotélio podendo regular a microcirculação e a integridade da mucosa gástrica (WHITTLE *et al.*, 1990). Similarmente a outros mediadores gasosos, como o óxido nítrico (NO), cuja função gastroprotetora já é bem estabelecida, estudos recentes sugerem que o sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) contribui para a defesa da mucosa gástrica contra a lesão induzida por antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs). O H<sub>2</sub>S parece ter um importante papel na regulação do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, onde medeia o relaxamento vascular induzido por estimulação vagal, causando, em baixas concentrações, proteção contra a injúria celular no endotélio (FIORUCCI *et al.*, 2006).

Nas células dos mamíferos, o H<sub>2</sub>S é gerado durante o metabolismo da L-cisteína (GUIDOTTI, 1996), sendo formado, principalmente, pela ação de duas enzimas: cistationina  $\gamma$ -lyase (CSE) and cistationina  $\beta$ -sintetase (CBS) (MOORE *et al.*, 2003). A mucosa gástrica expressa tanto a CSE quanto a CBS, que são responsáveis pela síntese de H<sub>2</sub>S, onde essa molécula parece ser importante na regulação do fluxo sanguíneo gástrico, manutenção da integridade da mucosa (FIORUCCI *et al.*, 2005) e cicatrização da úlcera gástrica (WALLACE *et al.*, 2007). Assim, o desenvolvimento de drogas que aumentam a atividade de CSE ou CBS e, conseqüentemente, a liberação de H<sub>2</sub>S pode ter um importante papel antiinflamatório e de defesa da mucosa contra injúrias diversas.

Considerando o número limitado de informações sobre os processos patológicos e fisiológicos do H<sub>2</sub>S na lesão gástrica, nós pretendemos estudar as hipóteses de que drogas que aumentam a concentração de H<sub>2</sub>S podem aumentar a defesa da mucosa gástrica contra os danos causados pelo etanol, pois as ações bioquímicas e farmacológicas desse mediador gasoso ainda são pouco conhecidas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos históricos do consumo de álcool

Toda a história da humanidade está permeada pelo consumo de álcool. Registros arqueológicos recentes revelam que o etanol, principal componente das bebidas alcoólicas, está presente na humanidade desde a era pré-histórica. Recentemente foram encontrados resíduos de etanol em uma olaria de aproximadamente 9000 anos e os primeiros indícios sobre o consumo de álcool pelo ser humano datam de aproximadamente 6000 a.C., sendo, portanto um costume extremamente antigo e que tem persistido por milhares de anos (MASUR; JORGE, 1986). A noção de álcool como uma substância divina, por exemplo, pode ser encontrada em inúmeros exemplos na mitologia, sendo talvez um dos fatores responsáveis pela manutenção do hábito de beber ao longo do tempo (CEBRID, 2009).

Nas bebidas utilizadas pelo homem, está contido o álcool etanol ou álcool etílico que foi descrito pela primeira vez em 1300, na Idade Média, tendo sua síntese ocorrida em 1854. Pertence ao subgrupo das funções oxigenadas denominado alcoóis, que, por definição, são compostos orgânicos que possuem uma ou mais hidroxilas (OH) ligadas diretamente ao átomo de carbono alifático (REGINATO; MORAES-FILHO, 1986).

Inicialmente, as bebidas tinham conteúdo alcoólico relativamente baixo, como por exemplo, o vinho e a cerveja, já que dependiam exclusivamente do processo de fermentação. Com o advento do processo de destilação, introduzido na Europa pelos árabes na Idade Média, surgiram novos tipos de bebidas alcoólicas, que passaram a ser utilizadas na sua forma destilada. Nesta época, este tipo de bebida passou a ser considerado como um remédio para todas as doenças, pois “dissipavam as preocupações mais rapidamente do que o vinho e a cerveja, além de produzirem um alívio mais eficiente da dor”, surgindo então a palavra whisky (do gálico “usquebaugh”, que significa “água da vida”) (CEBRID, 2009).

A partir da Revolução Industrial, registrou-se um grande aumento na oferta deste tipo de bebida, contribuindo para um maior consumo e, conseqüentemente, gerando um

aumento no número de pessoas que passaram a apresentar algum tipo de problema devido ao uso excessivo de álcool (CEBRID, 2009).

## 2.2 Úlcera gástrica

A úlcera gástrica pode ser definida como solução de continuidade na mucosa do trato digestivo, que se estende desde a mucosa até a submucosa, passando pela muscular da mucosa ou ainda mais profundamente (CONTRAN *et al.*, 1996). É uma doença comum do trato gastrointestinal e a sua patogênese é multifatorial, incluindo infecções pelo *Helicobacter pylori*, aumento da concentração de ácido gástrico, de pepsina, alterações na motilidade gastroduodenal, hábitos de vida como o tabagismo e ingestão de bebida alcoólica (EASTWOOD, 1997).

Existem relatos comprovando que a humanidade tem convivido com úlcera gástrica desde o século IV antes de Cristo. Para o tratamento destes distúrbios era recomendada, há mais de doze séculos, a neutralização ácida. Desta época até os dias atuais houve grandes avanços na terapêutica e no entendimento da patogênese, advindo assim o conhecimento a respeito dos inibidores da bomba de prótons e do *Helicobacter pylori* (HOOGERWERF; PASRICHA, 2001).

As úlceras ocorrem mais freqüentemente no duodeno, onde mais de 95% ocorrem na sua primeira porção. No estômago, as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo, na pequena curvatura (25%). Na úlcera gástrica, as lesões ocorrem pela ação do HCl sobre a mucosa (CHAPADEIRO *et al.*, 1987; VANDER *et al.*, 2001), como resultado de um desequilíbrio entre os fatores agressores e os mecanismos de defesa da mucosa gástrica (HOLZER, 2000; NATALE *et al.*, 2004). Estas lesões podem ser desencadeadas e agravadas pelo estresse, consumo excessivo de álcool, tabagismo, uso de AINEs e pela presença de *Helicobacter pylori* no trato gastrintestinal (WALLACE; GRANGER, 1996; MAITY *et al.*, 2003).



### 2.3 Etanol e a lesão gástrica

Pacientes com doenças relacionadas ao álcool possui um importante papel na medicina clínica, onde aproximadamente 29% dos homens e 9% das mulheres são hospitalizados devido a doenças relacionadas ao álcool, afetando os órgãos internos (GERKE *et al.*, 1997). Nos Estados Unidos, o alcoolismo e o abuso de álcool constituem o principal problema de saúde em termos de custos econômicos, pois estima-se que 25 a 40% dos leitos de hospitais gerais estejam ocupados por pacientes vítimas das complicações do alcoolismo (HOLDEN, 1987). Fridman e Pellegrini (1994), confirmam a importância do problema também no Brasil, evidenciando o alcoolismo como terceiro motivo de absenteísmo no trabalho e oitava causa de concessão de auxílio-doença pela Previdência Social.

O etanol é uma substância de efeitos complexos, sendo a causa mais comum de ulceração gástrica em homens. É conhecido como uma substância necrosante que causa injúria na mucosa gástrica, e a ingestão excessiva de etanol pode resultar em gastrite, caracterizada por edema na mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (GUSLANDI, 1987).

Os efeitos do etanol no trato gastrintestinal são bastante diversificados. No estômago, o álcool promove rapidamente a formação de úlceras, que é devido essencialmente a uma reação inflamatória (SZABO *et al.*, 1985). Essa injúria é causada, inicialmente, pela liberação de mediadores inflamatórios que induzem vasoconstrição, isquemia e morte celular (DUFFIN *et al.*, 2008). No esôfago, o consumo de etanol está relacionado à gênese de diversas doenças no homem como disfunções motoras, refluxo gastro-esofágico e câncer de esôfago (SIEGMUND *et al.*, 2002). No intestino o efeito do etanol sobre a musculatura e a absorção de nutrientes contribui para a diarreia que é frequentemente observada em alcoólatras. Esses efeitos no intestino são, provavelmente, devidos a uma estase microvascular, aumento do fluido transcapilar, perda de proteínas, edema epitelial e ruptura das junções intra-epiteliais (BECK *et al.*, 1986), além de haver estresse oxidativo induzido por leucócitos, e influências negativas na retomada de nutrientes, água e eletrólitos, contribuindo para uma desnutrição que é frequentemente observada no alcoolismo crônico (DINDA *et al.*, 1996; BODE, 1980). Também foi relatado que a maioria dos pacientes com

pancreatite crônica apresenta um histórico de consumo excessivo de álcool. Embora os mecanismos fisiopatológicos desse último efeito permaneçam desconhecidos, foi verificado que o álcool promove uma grande redução do fluxo sanguíneo pancreático (PITCHUMONI, 2001). O etanol também afeta seriamente o sistema nervoso central (SNC), envolvendo diversos tipos celulares e sistemas de sinalização (CHARNESS *et al.*, 1989). Muitos receptores parecem estar envolvidos nos efeitos agudos do álcool no SNC, entre eles os receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico do tipo A (GABA<sub>A</sub>), da serotonina-3 (5-HT<sub>3</sub>) e do *N*-metil-D-aspartato (NMDA). Adicionalmente, muitos efeitos diretos e indiretos do etanol no SNC podem também ser mediados por moléculas sinalizadoras como as proteínas quinases (PKA e PKC) e fosfatases (MORROW *et al.*, 2004).

No estômago o etanol também interfere na secreção de ácido gástrico, um efeito possivelmente mediado pela histamina e gastrina. A barreira da mucosa é a principal proteção do estômago 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<sup>+</sup> (DAVENPORT, 1967; DAVENPORT, 1969). Nesse órgão o etanol também causa depleção dos grupos sulfidrilas, que são necessários para estabilização das membranas celulares, bem como na eliminação de radicais livres. Ainda no estômago, o etanol influencia a atividade da musculatura e reduz o fluxo sanguíneo, provocando estase gástrica, congestão capilar e aumento da permeabilidade vascular, aumentando os riscos de hemorragias e ulcerações, associados às injúrias macroscópicas e histológicas na mucosa (BODE; BODE, 1997; MaCMATH, 1990; SANTOS; RAO, 2001). A congestão capilar é quase sempre acompanhada de estase circulatória que não está associada somente com a constrição de vênulas na submucosa, mas também com a dilatação de arteríolas (BOU-ABBOUD *et al.*, 1988; OATES; HAKKINEN, 1988).

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 álcool podem ser mediadas ou

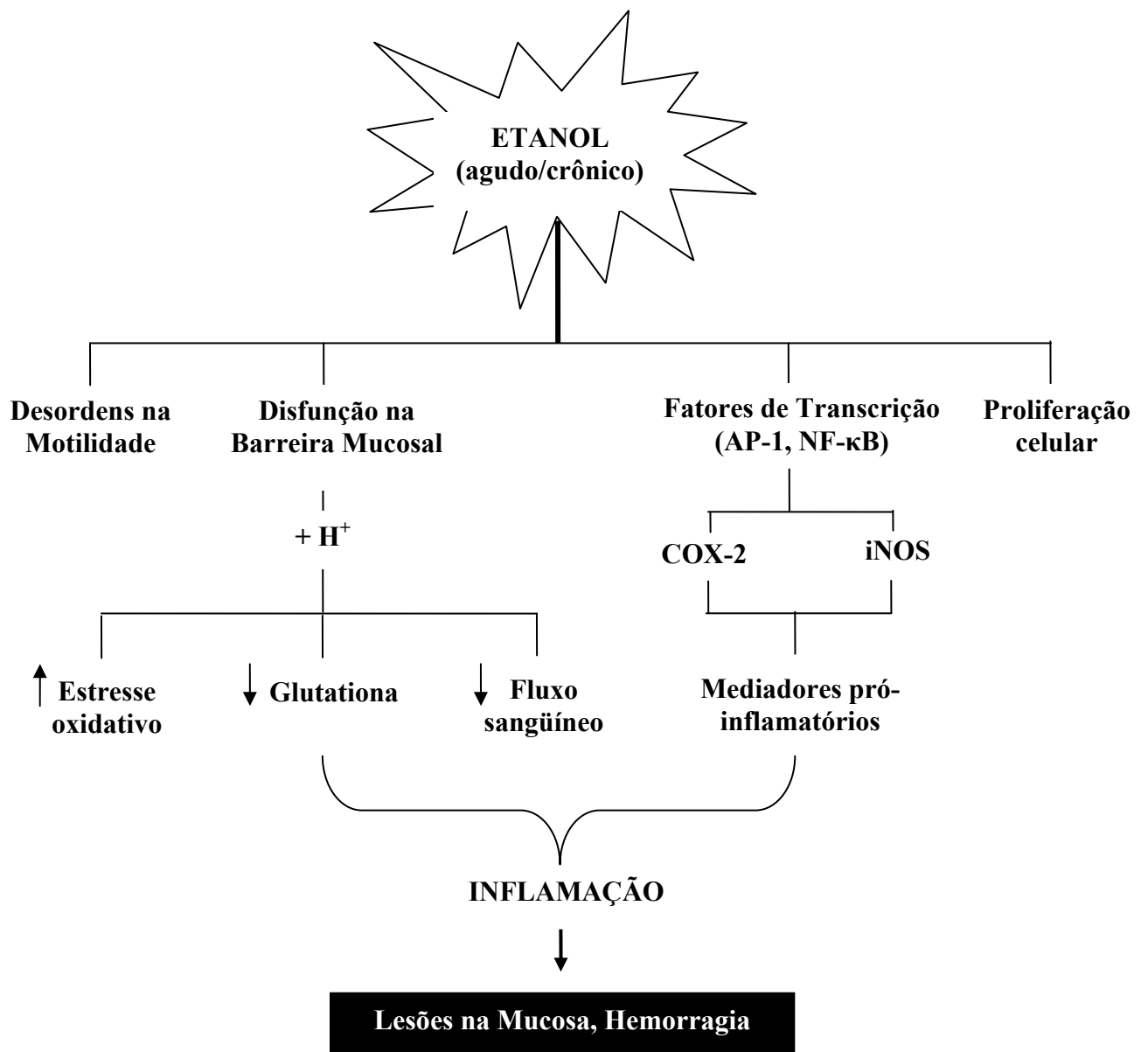
moduladas, diretamente ou indiretamente, por várias moléculas celulares, tais como as ciclooxigenases (COX), lipoxigenases, diversas citocinas, citocromo P450 2E1, tromboxanos e espécies reativas do oxigênio (TARNAWSKI *et al.*, 1988; ROBERT *et al.*, 1979). Foi verificado que o etanol, de maneira crônica, 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, como é observado em lesões agudas (MEDEIROS *et al.*, 2008). Este último efeito deve-se a lesões nos microvasos e diminuição do fluxo sanguíneo gástrico (KVIETYS *et al.*, 1990; SZABO *et al.*, 1985).

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

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 1). A COX é uma enzima chave na biosíntese das prostaglandinas. A isoforma constitutiva da COX (COX-1) é responsável pela manutenção da proteção gastrintestinal, 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 fisiopatológicas (LEE *et al.*, 2005). Segundo Lee *et al.* (2005) o etanol promove a ativação dos dois mais importantes 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 etanol causa fosforilação da MAPK p38, que está relacionada a mudanças na transcrição de genes relacionados à inflamação (figura 1). Outros investigadores demonstraram que COX-2 e caspase-3 estão envolvidas nas lesões gástricas provocadas pelo etanol (WU; CEDERBAUM, 2003; KISHORE *et al.*, 2002; SIMONYI *et al.*, 2002; NANJI *et al.*, 2003). Ao contrário do que se imaginava, a 16,16 – dimetilprostaglandina E<sub>2</sub> (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  $PGE_2$  possui efeitos citoprotetores contra o etanol, especialmente nas células parietais. (LACY; ITO, 1982; SCHMIDT; MILLER, 1988; GUTH *et al.*, 1984).

Com base nos conhecimentos produzidos, criamos um esquema adaptado de Siegmund *et al.* (2002) e Lee *et al.* (2005) 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 sobre a mucosa gástrica

Fonte: Siegmund *et al.* (2002) e Lee *et al.* (2005)

O consumo crônico *ad libitum* de etanol desencadeia uma significativa hipertrofia da mucosa gástrica. Esta hipertrofia pode ser devido a um aumento na expressão de fatores de crescimento epidérmico (EGF) e fatores de crescimento tumoral (TNF- $\alpha$ ), 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).

A biodisponibilidade do etanol consumido oralmente é incompleta, uma vez que os níveis de etanol no sangue são menores. Esse metabolismo de primeira passagem do etanol possui grande importância prática, visto que, os fatores que impedem esse metabolismo no estômago aumentam a concentração de etanol na circulação sistêmica. Um grande número de estudos tem evidenciado que a mucosa gástrica contribui substancialmente para esse primeiro passo do metabolismo do álcool (CABALLERIA *et al.*, 1987; CABALLERIA *et al.*, 1989; LIM *et al.*, 1993). Uma fração significativa do etanol ingerido é metabolizado na mucosa gástrica, que contém uma álcool-dehidrogenase (ADH, EC 1.1.1.1). Em mamíferos, a álcool-dehidrogenase compreende uma grande família de enzimas divididas em seis classes de acordo com a estrutura e função. As enzimas de classe IV são extra-hepáticas, sendo encontradas principalmente na mucosa gástrica, sendo responsáveis pela metabolização do etanol no estômago (ESTONIUS *et al.*, 1996). Portanto, a fração de etanol ingerido que chega ao fígado é maior quando administrada intravenosamente do que por via oral (BATTISTON *et al.*, 1996). Foi demonstrado também que o etanol em baixas doses (20%) provoca citoproteção adaptativa, com participação dos componentes do sistema nervoso autônomo, reduzindo o dano macroscópico provocado por doses mais altas de etanol no estômago, mas não havendo melhora microscópica (KO; CHO, 1998).

## 2.4 Fisiologia gástrica – Motilidade e Secreção Ácida Gástrica:

O trato gastrointestinal (TGI) é de importância fundamental para o organismo, visto que exerce a função de prover o mesmo de água, eletrólitos e nutrientes (GUYTON; HALL, 2006). As suas funções dependem de propriedades inerentes à musculatura lisa intestinal, reflexos de neurônios intrínsecos no intestino e do sistema nervoso central (SNC), além de efeitos parácrinos de mediadores químicos e hormônios gastrointestinais (GANOG, 2003). Porém, as principais funções do estômago são as autônomas e as controladas predominantemente pelo sistema nervoso entérico (SNE) (HOOGERWERF; PASRICHA, 2001).

O SNE está presente na parede do TGI, do esôfago até o ânus, e é formado por aproximadamente 100 milhões de neurônios, o equivalente ao total de neurônios presentes na medula espinhal. Está envolvido no controle da motilidade e secreção do TGI, sendo composto basicamente por dois plexos: (1) plexo mioentérico (Auerbach): localizado entre a camada muscular longitudinal e circular da parede intestinal, e responsável pelo controle motor; (2) plexo submucoso (Meissner): localizado na submucosa da parede intestinal, e regula a secreção, transporte de líquidos e o fluxo vascular. Fibras extrínsecas do simpático e parassimpático são responsáveis pela conexão entre estes plexos (GUYTON; HALL, 2006).

A parede do estômago é delgada na região do fundo e do corpo e se espessa em direção à junção gastroduodenal. Como em outros territórios do trato gastrointestinal, as fibras musculares lisas estão arranjadas em camada circular e longitudinal (BOYCE, 2008). Na região do corpo, nas paredes anterior e posterior as fibras também se dispõem em camada oblíqua. O piloro não é um esfíncter anatomicamente definido, porém o comportamento contrátil das camadas musculares na região se distingue das camadas adjacentes. Há, pois, uma região diferenciada que, fisiologicamente, é um esfíncter. Entre o estômago e o bulbo duodenal há um anel conjuntivo, interrompendo a continuidade de fibras musculares. Apenas algumas fibras da camada longitudinal passam pela junção, de um para outro órgão (UCHIDA; KAMIKAWA, 2007; SCHEMANN *et al.*, 2008).

A inervação extrínseca parassimpática tem as fibras pré-ganglionares no vago. As fibras pós-ganglionares do simpático integram o plexo celiaco. A ação do parassimpático, via plexo intrínseco, é excitatória da motilidade e da secreção. Por outro lado, a do simpático é inibitória. Na junção gastroduodenal a inervação adrenérgica, por receptores alfa, é constrictora. O parassimpático tem efeito duplo: terminações colinérgicas estimulam a contração enquanto que outras, provavelmente utilizando VIP como mediador, são inibitórias da contração. Neurônios sensoriais para o estiramento, quimiorreceptores (principalmente para pH) e para dor geram e conduzem a informação aferente para os reflexos locais e para os reflexos envolvendo o sistema nervoso central (PARKMAN; JONES, 2009; TACK, 2008; McCONALOGUE; FURNESS, 1994).

O estômago possui quatro funções motoras principais: a acomodação do bolo alimentar; a mistura do bolo alimentar com a secreção gástrica; a redução do tamanho das partículas ingeridas e o esvaziamento gástrico. Cada uma dessas funções apresenta o esvaziamento gástrico como um denominador comum (MEYER, 1994; TRONCON, 2008). À onda peristáltica que percorre o esôfago na deglutição segue-se o relaxamento das camadas musculares do fundo e do corpo do estômago (relaxamento gástrico receptivo). Receptores de estiramento produzem as informações aferentes e fibras parassimpáticas, com o VIP como mediador, inibem a contração (LU; OWYANG, 2009). A região do estômago proximal é responsável pela acomodação do bolo alimentar e pela sua transferência para as porções mais distais do estômago. A acomodação constitui um relaxamento reflexo do estômago proximal, de modo a permitir que receba o volume ingerido sem que haja aumento apreciável da sua pressão interna (TRONCON, 2008).

O estômago distal, que é formado em grande parte pelo antro gástrico, responde pela trituração do alimento ingerido, o que acarreta diminuição do tamanho das suas partículas; a atividade motora desta região ocasiona, também, a mistura do alimento ingerido com a secreção gástrica e, em última instância, a propulsão do quimo ao duodeno. Isto é feito, basicamente, pelas contrações peristálticas antrais fásicas. Por sua vez, o piloro e o duodeno proximal oferecem resistência ao influxo de material proveniente do estômago, contribuindo para que o esvaziamento gástrico ocorra de forma regular, ao longo do tempo (TRONCON, 2008; SCHEMANN *et al.*, 2008). O duodeno distal e o jejuno têm, também, função importante na inibição do esvaziamento gástrico. Isto se dá em resposta a vários estímulos,

como a distensão mecânica ou a presença de determinadas substâncias ingeridas, como ácidos, gorduras e substâncias osmoticamente ativas, que desencadeiam estímulos que irão, por sua vez, modular essas funções motoras fazendo com que o esvaziamento gástrico seja inibido. A distensão do estômago ativa mecanorreceptores gástricos. Os ácidos e os nutrientes ativam quimiorreceptores duodenais, o que gera estímulos neurais e humorais que vão modular a função motora gastroduodenal. A motilidade do corpo e do antro é controlada por uma região de marcapasso localizada próximo ao meio do corpo. Esse marcapasso desencadeia ondas lentas no músculo longitudinal (cerca de três por segundo) que se difundem para a camada de músculo circular e passam pelo antro em direção ao piloro. Em determinadas circunstâncias, ocorre o acoplamento eletromecânico que implica em uma situação em que, para cada onda elétrica haja uma onda contrátil correspondente. Esse acoplamento gera então as contrações fásicas que compõe o peristaltismo do antro gástrico. A consequência é uma onda peristáltica ou de propulsão. Ao aproximar do piloro, essa onda peristáltica alcança e ultrapassa o conteúdo que está sendo impelido adiante (SCHEMANN *et al.*, 2008). Quando a onda chega no piloro, o antro e o piloro contraem-se, fechando o esfíncter pilórico. Alguns mililitros de material podem escapar pelo esfíncter, mas a maior parte do conteúdo gástrico é forçada a voltar para o antro (retropulsão). Ao chegar ao estômago, o alimento forma uma massa densa. A propulsão é fraca, de modo que pouco material chega até o duodeno. O conteúdo torna-se mais líquido nas horas que se seguem, devido à adição de secreções, e tanto a propulsão como a retropulsão aumentam. O esvaziamento gástrico acelera gradualmente, mas o esvaziamento total do conteúdo gástrico após uma refeição requer um pouco mais de tempo, por ser a motilidade gástrica inibida por sinais que se originam do intestino (SCHEMANN *et al.*, 2008; BORNSTEIN *et al.*, 2004).

O controle da função motora do estômago é realizado por meio de componentes anatômicos e funcionais, como a própria musculatura lisa gastrintestinal, o sistema nervoso central e o entérico, a ação de hormônios sistêmicos e gastrintestinais, além da homeostase local que envolve a acidez, o nível glicêmico e de eletrólitos, além de outros fatores. Modificações desses componentes podem gerar alterações da função, sendo todos eles, portanto, elementos de interesse na fisiopatologia (SCHEMANN *et al.*, 2008; BORNSTEIN *et al.*, 2004).



Uma das mais importantes funções do estômago é a produção de ácido. O ácido gástrico facilita a digestão de proteínas e a absorção de ferro, cálcio e vitamina B12. Ele também impede a entrada de bactérias no organismo. Quando os mecanismos homeostáticos estão prejudicados, o volume e a acidez gástrica podem aumentar desproporcionalmente, superando assim as defesas da mucosa gástrica, levando a formação de úlcera duodenal, úlcera gástrica e doença do refluxo gastro-esofágico (SCHUBERT, 2004).

As células parietais são as principais células secretoras de ácido na mucosa gástrica. Esta secreção é regulada por mecanismos neurais, hormonais, parácrinos e autócrinos em níveis central e periférico (KONTUREK *et al.*, 2004), os quais convergem para a etapa final da secreção que é a atividade da  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase (HORN, 2000)

A  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase é a enzima responsável pela secreção ácida gástrica. A subunidade  $\alpha$  é a responsável pela troca de  $H^+$  por  $K^+$  com gasto energético fornecido pela catalisação do ATP. Nas células parietais em repouso, a bomba de  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase é armazenada em tubulovesículas citoplasmáticas. Quando os receptores das células parietais são estimulados por seus agonistas, são gerados segundos mensageiros, que através de cascatas de fosforilação permitirão com que as tubulovesículas contendo as enzimas se fundam com a membrana apical, permitindo com que a enzima transmembranica se torne ativa. Na ausência do estímulo, as bombas são recicladas de volta para o compartimento citoplasmático. Inibidores das bombas de próton são pró-drogas que sofrem catalisação ácida com um rearranjo químico nos canalículos secretórios, permitindo, assim, a inibição da  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase através da ligação covalente a resíduos de cisteína na subunidade  $\alpha$  (Revisado por SCHUBERT, 2004).

O sistema nervoso central é considerado o principal responsável pelo início da secreção gástrica em resposta a uma antecipação do alimento através da liberação de acetilcolina pelos neurônios eferentes vagais. A acetilcolina liga-se diretamente a receptores M3 na membrana basolateral das células parietais e indiretamente estimula a liberação de histamina das células do tipo enterocromafins (ECL) no fundo gástrico e a liberação de gastrina das células G do antro gástrico (ROBERTS *et al.*, 2003; BRUNTON *et al.*, 2006). A histamina liberada pelas células ECL ativa as células parietais de maneira parácrina através da interação com receptores H2. A gastrina liberada das células G estimula as células parietais

diretamente através da ligação com receptores CCK 2 (CCK B) presentes na membrana da célula ou indiretamente estimulando a liberação de histamina das ECL (McCONALOGUE; FURNESS, 1994). Além dos estímulos centrais, a gastrina pode ser liberada através da distensão local do estômago e composição química do conteúdo gástrico. A ligação da acetilcolina, gastrina e histamina com seus respectivos receptores acoplados a proteína G ativam segundos mensageiros. A ativação das vias que dependem do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pela gastrina e acetilcolina e/ou de AMPc pela histamina, ativam a  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase nas células parietais, resultando na secreção ácida estomacal (BRUNTON *et al.*, 2006).

## **2.5 Neurotransmissores gasosos de baixo peso molecular (gaso-transmissores)**

Nos anos 90 iniciou-se um novo paradigma da transdução de sinais célula-célula com a descoberta de que um gás, o óxido nítrico (NO), poderia ser liberado especificamente dos nervos e atuar como transmissor na estimulação neural (KASPAREK *et al.*, 2008). Logo em seguida, o monóxido de carbono (CO) foi reconhecido como o segundo neurotransmissor gasoso, agindo de forma semelhante ao NO. Recentemente com a descoberta do sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) como o terceiro neurotransmissor gasoso (ABE; KIMURA, 1996), o termo gasotransmissor foi introduzido para caracterizar gases que podem atuar como neurotransmissores neuronais (WANG, 2002).

Além de atuar como gasotransmissores, o NO, CO e o  $\text{H}_2\text{S}$  possuem outras propriedades em comum como o fato de serem moléculas gasosas pequenas, sendo facilmente permeável entre as membranas plasmáticas das células, não atuam sobre receptores específicos de membrana, são sintetizados enzimaticamente sob demanda, e sua produção ocorre sob regulação, além de possuírem efeitos fisiológicos importantes. Devido a sua reatividade, essas moléculas não são armazenadas em vesículas pré-sinápticas nas células, mas são sintetizadas e liberadas sob demanda. Também são rapidamente degradadas com uma meia-vida na ordem de segundos (KASPAREK *et al.*, 2008).

Uma propriedade adicional desses três mediadores gasosos é sua toxicidade sistêmica em condições supra-fisiológicas, que levou esses gases a serem inicialmente

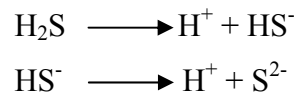
conhecidos como poluentes ambientais ou toxinas, antes de terem suas funções orgânicas reconhecidas (WU *et al.*, 2005; BECKMAN *et al.*, 1993).

## 2.6 Sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S): Química, Toxicidade e Síntese

O sulfeto de hidrogênio é um gás incolor com um odor forte de ovo podre. Há muito tempo essa molécula tem sido largamente estudada no contexto da poluição industrial e atmosférica, estando associadas com as indústrias de celulose e papel, refinarias de petróleo e mineração (MILBY; BASELT, 1999). Contudo, estudos recentes demonstram que, assim como o NO e o CO, o H<sub>2</sub>S está envolvido em inúmeras funções fisiológicas, sendo produzido em muitos tecidos de mamíferos (FIORUCCI *et al.*, 2006).

A toxicidade do H<sub>2</sub>S é vista em concentrações muito superiores àquelas produzidas de forma endógena e geralmente está associada à presença dessas altas concentrações no pulmão. O H<sub>2</sub>S é um potente inibidor da citocromo c-oxidase (LI *et al.*, 2006). Exposições contínuas ao H<sub>2</sub>S (15 – 20 ppm) geralmente causa irritação das membranas da mucosa e conjuntiva dos olhos. Em concentrações de 250 ppm, o H<sub>2</sub>S pode causar edema pulmonar e acima de 1000 ppm pode resultar em coma e morte (MILBY; BASELT, 1999). O H<sub>2</sub>S está presente em concentrações micromolares no sangue (ZHAO *et al.*, 2001; HOSOKI *et al.*, 1997). Devido ao alto potencial de toxicidade deste gás, no organismo existem sistemas eficientes para metabolizar e eliminar esse gás. O H<sub>2</sub>S pode ser metabolizado por oxidação na mitocôndria ou por metilação no citosol, podendo ser eliminado por metahemoglobina ou glutathione oxidada, sendo excretado pelo rim na forma de sulfato livre ou conjugado (WANG, 2002). O fato do H<sub>2</sub>S interagir com a hemoglobina, assim como os outros dois gasotransmissores pode sugerir uma possível interação entre esses três mediadores (FIORUCCI *et al.*, 2006). Interessante é que o envenenamento de animais por H<sub>2</sub>S é prevenido pela administração de nitrito, sugerindo que a metahemoglobinemia provocada induzida por nitrito tem sido um antídoto eficaz contra a intoxicação por H<sub>2</sub>S (HUANG; CHU, 1987).

O H<sub>2</sub>S é um ácido fraco que se dissocia, em solução, em duas etapas:

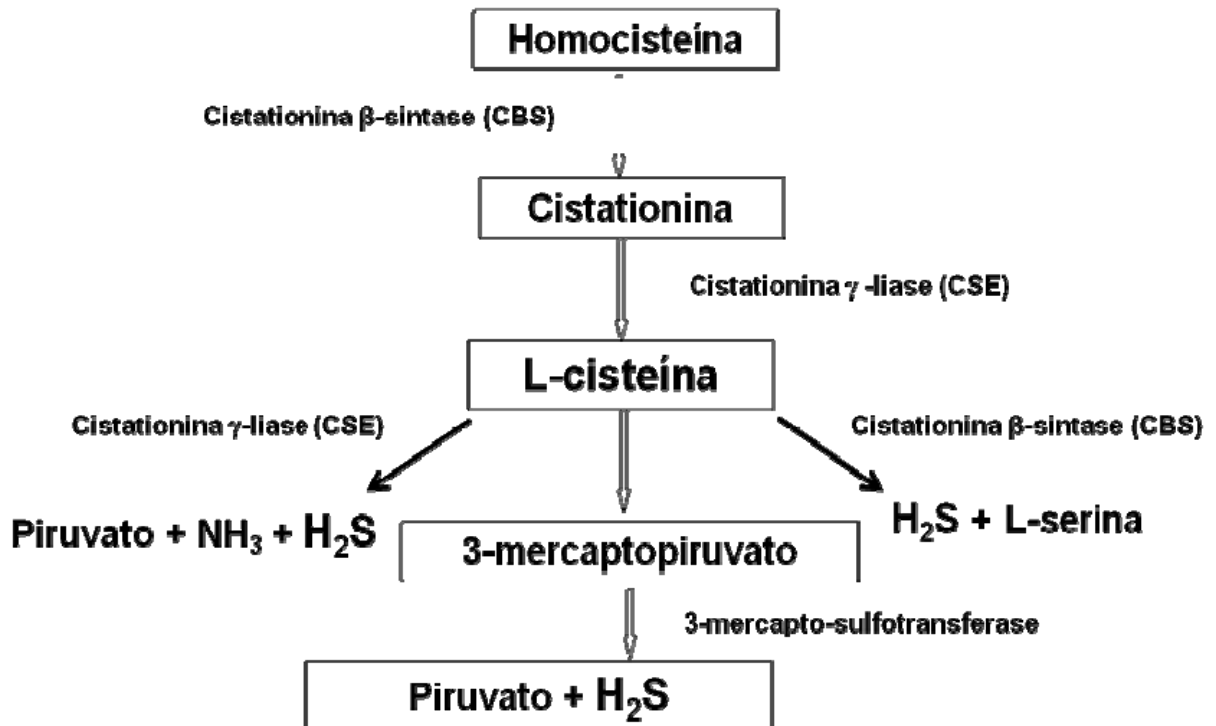


Em soluções aquosas alcalinas (pH 7,2), aproximadamente um terço do gás encontra-se na sua forma não-dissociada. O H<sub>2</sub>S também é permeável à membrana plasmática, pois sua solubilidade em solventes lipofílicos é cinco vezes maior do que na água (MOORE *et al.*, 2003; SEARCY; LEE, 1998). O H<sub>2</sub>S queima numa ampla faixa de inflamabilidade com o ar e é perigosamente reativo quando misturado com ácido nítrico ou outros fortes oxidantes como o ácido sulfúrico. Esse gás é ligeiramente mais pesado do que o ar e se condensa na forma líquida a temperatura de -62°C (MAINIER; VIOLA, 2005).

Apesar da atividade tóxica do H<sub>2</sub>S exógeno, recentemente foi demonstrado que esse gás também é formado naturalmente no corpo e preenche uma série de funções. Essa molécula é formada extensamente nas células de mamíferos, necessitando de enxofre (S) como o elemento químico e biologicamente ativo. Os compostos contendo enxofre nos tecidos podem estar presentes na sua forma estável ou lábil. Os principais compostos doadores de enxofre nos tecidos são a metionina, cisteína e taurina (UBUKA, 2002).

A L-cisteína é o substrato para duas enzimas piridoxal 5'-fosfato dependentes: cistationina  $\gamma$ -lyase (CSE; EC 4.4.1.1) e cistationina  $\beta$ -sintetase (CBS; EC 4.2.1.22) (MOORE *et al.*, 2003). Essas enzimas são responsáveis pela maior parte da produção do H<sub>2</sub>S endógeno nas células de mamíferos (figura 2). Outras vias enzimáticas também são capazes de formar naturalmente H<sub>2</sub>S no corpo, mas até o momento, essas vias não têm sido estudadas em profundidade e parecem ter uma importância biológica mais limitada (LI *et al.*, 2006).

CBS e CSE são enzimas importantes para o metabolismo dos aminoácidos contendo enxofre, bem como para produção de H<sub>2</sub>S, amônia e piruvato, usando como substrato a L-cisteína. A CBS é predominante no sistema nervoso central (SNC), enquanto a atividade da CSE é maior nos tecidos periféricos (WANG, 2002).



**Figura 2:** Principais vias endógenas de produção do sulfeto de hidrogênio

A CBS é um polipeptídeo de 63 kilodaltons contendo três domínios: um domínio de ligação do heme, um núcleo catalisador e um domínio regulatório, compreendendo, respectivamente, 70 resíduos da extremidade N-terminal, 340 resíduos da região central e 140 resíduos da extremidade C-terminal (MEIER *et al.*, 2001). A forma catalítica da CBS é uma proteína tetramérica que é dependente de piridoxal fosfato. Em humanos essa enzima é regulada pela S-adenosilmetionina, gerado durante o metabolismo da metionina (RATNAM *et al.*, 2002).

A CBS catalisa a reação de substituição do piridoxal 5'-fosfato dependente em que o tiolato da L-homocisteína é substituído pelo grupo hidroxila da L-serina, ou seja, é responsável pela produção da cistationina pela adição de serina à homocisteína (FIORUCCI *et al.*, 2006). A cistationina formada pode então ser convertida em L-cisteína através da CSE. A L-cisteína pode então ser convertida em amônia, piruvato ou H<sub>2</sub>S via CBS e CSE (Figura 2). Em humanos, a expressão do gene que codifica a CBS é regulada através de um mecanismo ligado ao estado de proliferação da célula. A regulação transcricional e pós-traducional da CBS de mamíferos é consistente com a conexão metabólica entre L-homocisteína e glutatona, que é um composto importante derivado da L-cisteína (MEIER *et al.*, 2001).

A CSE é uma proteína de 43 kilodaltons sendo expressa em grande quantidade nos tecidos periféricos como fígado, rim e estômago e expressa em pequenas quantidades no sistema nervoso central (AWATA *et al.*, 1993). É a principal enzima envolvida na produção de H<sub>2</sub>S nestes tecidos.

## 2.7 Sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S): Ações Fisiológicas

Estudos recentes têm mostrado que o H<sub>2</sub>S está implicado em muitas funções fisiológicas que incluem as respostas imunes e inflamatórias, percepção e mediação da dor, bem como o controle da integridade da mucosa gástrica, do tônus vascular e o controle da motilidade gastrointestinal (FIORUCCI *et al.*, 2006).

Relativamente, altas concentrações de H<sub>2</sub>S (50 – 160 µmol/L) foram detectadas no cérebro de diversas espécies, incluindo camundongos, ratos, bovinos e humanos (GOODWIN *et al.*, 1989; SAVAGE; GOULD, 1990). As duas enzimas, CBS e CSE podem ser encontradas no SNC, mas a atividade da CBS é cerca de 30 vezes maior do que a CSE nos neurônios (AWATA *et al.*, 1995). O H<sub>2</sub>S tem sido implicado em várias funções neuronais como na indução da liberação do hormônio de liberação de corticotropina do hipotálamo (RUSSO *et al.*, 2000) e na indução da potenciação a longo prazo no hipocampo, sendo importante no aprendizado, memória e hiperalgesia (ABE; KIMURA, 1996). Os mecanismos através dos quais o H<sub>2</sub>S modula as funções neuronais ainda são parcialmente conhecidos. O H<sub>2</sub>S aumenta os níveis de cAMP nos neurônios e também hiperpolariza os neurônios primários por ativar os canais de potássio ATP-dependentes (K<sub>ATP</sub>) (MOORE *et al.*, 2003). Além disso, potencializa a potenciação a longo prazo do hipocampo aumentando a sensibilidade do *N*-metil-D-aspartato (NMDA) por uma via mediado por cAMP (KIMURA, 2000).

Além da possibilidade de modulação da musculatura lisa através de seus efeitos neuromoduladores, o H<sub>2</sub>S também pode alterar diretamente o tônus do músculo liso (HOSOKI *et al.*, 1997). As ações do H<sub>2</sub>S têm sido muito estudadas em tecidos vasculares apresentando relaxamento como efeito predominante. Similarmente, foi recentemente

demonstrado que o NaHS, que é um doador de H<sub>2</sub>S, também induz relaxamento no íleo de coelhos e vasos deferentes de ratos (TEAGUE *et al.*, 2002). O mecanismo pela qual o H<sub>2</sub>S exerce efeitos relaxantes ainda não está bem compreendido, embora seja provável que esse efeito deva ser mediado pela abertura dos canais de K<sub>ATP</sub> (QUAYLE *et al.*, 1997). Estes canais estão relacionados com a atividade elétrica celular e nas células musculares lisas, a abertura dos canais de K<sub>ATP</sub> leva a uma hiperpolarização da membrana celular e inativação dos canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L, levando a um relaxamento em virtude da diminuição da concentração intracelular de cálcio livre (NELSON; QUAYLE, 1995). Assim, foi demonstrado que os efeitos relaxantes do H<sub>2</sub>S cólon, por exemplo, é devido à estimulação dos K<sub>ATP</sub>, e que a administração de glibenclamida (antagonista dos K<sub>ATP</sub>) inibe seu efeito relaxante (DISTRUTTI *et al.*, 2006).

Embora o principal efeito do H<sub>2</sub>S no músculo liso seja a produção de relaxamento, em alguns tecidos e em algumas espécies de animais o H<sub>2</sub>S pode exercer efeitos contráteis. Foi demonstrado que o H<sub>2</sub>S produz respostas contráteis na bexiga urinária de ratos por ativação dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina (PATACCHINI *et al.*, 2004). Entretanto, no trato gastrointestinal, foi demonstrado que o H<sub>2</sub>S pode exercer tanto efeito excitatórios produzindo contração tônica, quanto efeito inibitório na contratilidade espontânea (ZHAO *et al.*, 2009).

Assim como outros mediadores gasosos, o H<sub>2</sub>S pode exercer ações antiinflamatórias ou contribuir para injúria tecidual e inflamação (FIORUCCI *et al.*, 2006). O H<sub>2</sub>S é um potente inibidor da aderência de leucócitos no endotélio vascular (WALLACE *et al.*, 1993). Além disso, possui efeitos analgésicos e antioxidantes (DISTRUTTI *et al.*, 2006). O mecanismo através dos quais o H<sub>2</sub>S exerce efeitos antiinflamatórios ainda não está completamente compreendido, contudo, mais uma vez, parece que os canais de K<sub>ATP</sub> devem estar envolvidos, uma vez que foi demonstrado que o H<sub>2</sub>S reduz a infiltração de leucócitos e a formação de edema, via ativação dos canais de K<sub>ATP</sub> (ZANARDO *et al.*, 2006). Em contraste, Wallace *et al.* (2007) mostrou que a melhora da cicatrização da úlcera gástrica em ratos promovida pelo H<sub>2</sub>S não está associada com os canais de K<sub>ATP</sub>, uma vez que a glibenclamida (antagonista dos canais de K<sub>ATP</sub>) ou o pinacidil (ativador dos K<sub>ATP</sub>) não afetaram a cicatrização da úlcera.

Estudos recentes sugerem que o H<sub>2</sub>S também pode contribuir para a defesa da mucosa gástrica. No estômago ocorre expressão de CSE e CBS que são responsáveis pela síntese de H<sub>2</sub>S, sendo a CSE a principal responsável pela formação de H<sub>2</sub>S na mucosa gástrica (FIORUCCI *et al.*, 2005). O sulfeto de hidrogênio possui um importante papel na regulação do fluxo sanguíneo gástrico e está envolvido na manutenção da integridade da mucosa gástrica em roedores tratados do AINEs (FIORUCCI *et al.*, 2006). Assim, considerando um número limitado de informações a respeito do papel fisiopatológico do H<sub>2</sub>S na lesão gástrica, nós resolvemos investigar a ação gastroprotetora do H<sub>2</sub>S frente a lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

Há evidências de que o H<sub>2</sub>S também é um importante mediador da motilidade gastrointestinal. Hosoki *et al.* (1997) demonstrou que em íleo isolado de ratos expressa tanto a enzima CSE quanto CBS. Além disso, foi demonstrado que o NaHS (doador de H<sub>2</sub>S) produz inibição da contração espontânea no íleo isolado de coelhos (TEAGUE *et al.*, 2002) e no cólon de ratos (DISTRUTTI *et al.*, 2006). Em contraste com estes efeitos, o H<sub>2</sub>S também produz respostas contráteis no músculo liso da bexiga urinária (PATACCHINI *et al.*, 2005). Face a grande limitação de conhecimento a respeito da influência do H<sub>2</sub>S na motilidade gástrica e o fato de que o trânsito GI resulta de um interface entre o tônus gástrico, a atividade fásica distal do estômago e a resistência oferecida pelo intestino delgado (MALAGELADA; ALBEROZ, 1989), nós também decidimos neste trabalho investigar a influência dos doadores de H<sub>2</sub>S no esvaziamento gástrico de líquidos em camundongos acordados e seu possível mecanismo.

## **2.8 Mecanismos de proteção gástrica**

Em condições fisiológicas, existe no estômago um balanço entre os fatores agressores (HCl, pepsina, bile e enzimas pancreáticas) e os mecanismos gastroprotetores (muco-bicarbonato, NO, prostaglandinas e glutathione). Esses últimos podem ser classificados, pelo local de ação, em mecanismos de proteção pré-epitelial, epitelial ou subepitelial. O primeiro nível de defesa do estômago consiste de fatores secretados no lúmen incluindo ácido gástrico, bicarbonato, muco, imunoglobulinas e outras substâncias

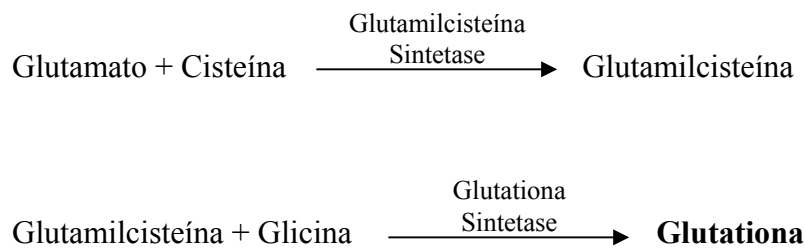


antibacterianas (WALLACE; GRANGER, 1996). O ácido pode ser visto como a primeira linha de defesa da mucosa, por causa de sua importância na redução da possibilidade de colonização bacteriana no estômago. A barreira muco-bicarbonato, que cria um gradiente de pH necessário para manter neutra a superfície das células epiteliais contra a acidez gástrica. A proteção epitelial é dada pelos surfactantes (fosfolípidios anfóteros) que aumentam a hidrofobicidade das membranas biológicas, tornando-as resistentes aos agentes hidrofílicos agressores, tais como a aspirina. Juntamente com os surfactantes, os compostos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH, glutathione) constituem fatores importantes da proteção epitelial contra radicais livres. O epitélio também é capaz de se reparar rapidamente caso sofra uma agressão, devido a rápida proliferação que essas células possuem (WALLACE; GRANGER, 1996). A proteção subepitelial é dada pelo fluxo sanguíneo que suplementa nutrientes e oxigênio, além de remover íons hidrogênio e outros agentes nocivos. A microcirculação da mucosa gástrica é alterada por mediadores secretados pelos nervos sensoriais aferentes, localizados na mucosa e submucosa gástrica. A difusão de ácido ou toxinas para a mucosa gástrica resulta em uma elevação do fluxo sanguíneo, que é essencial para limitar os danos e facilitar a reparação celular (WALLACE; GRANGER, 1996).

## **2.9 Mecanismos de proteção gástrica – Glutathione Reduzida**

O metabolismo celular normal envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Porém, a geração excessiva de ROS pode prejudicar o funcionamento celular. As ROS causam inflamação e morte celular, através da modulação das vias de transdução do sinal, por afetar as enzimas redox-sensíveis e fatores de transcrição, por auxiliar a atividade de proteases, e por estimular a expressão de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão (UZUN *et al.*, 2005). As ROS são produzidas como consequência da respiração aeróbica e da oxidação de substratos, e causam danos oxidativos nos tecidos. As ROS incluem radicais livres como os radicais hidroxilas ( $\bullet\text{OH}$ ), ou superóxidos ( $\bullet\text{O}^{2-}$ ) e espécies de radicais não livres, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O papel das ROS na patogênese das lesões gástricas experimentais agudas induzidas por estresse, etanol e AINES é bem conhecido. Causam peroxidação lipídica nas membranas, por atacar ácidos graxos insaturados. Quando atacam o DNA celular, pode promover a formação de câncer como consequência de uma mutação (BAYIR *et al.*, 2006).

Organismos aeróbicos possuem sistemas de defesa antioxidantes, incluindo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos contra efeitos tóxicos das ROS. Um importante antioxidante no contexto do trato GI é a glutathiona reduzida (GSH), que é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína, existente em praticamente todas as células de mamíferos (figura 3). Ele exibe um grande número de funções essenciais para a célula, incluindo transporte de aminoácidos, catálise enzimática e proteção contra os efeitos deletérios de radicais livres endógenos e metabólitos tóxicos (MEISTER, 1991; ROSS, 1988). É relatado que o ciclo redox da GSH está especificamente envolvido na proteção das células epiteliais gástricas contra a lesão causada por etanol (NATALE *et al.*, 2004). A atividade antioxidante do GSH é mediada por dois mecanismos: primeiro, o GSH pode diretamente remover radicais livres; segundo, o GSH pode funcionar como um substrato para a glutathiona peroxidase (GPX), eliminando peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos no citosol e mitocôndrias (REED; FARISS, 1984).



**Figura 3:** Esquema representativo das etapas na síntese de glutathiona  
 Fonte: Smith *et al.* (1996)

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

## 2.10 Canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) e a proteção gástrica

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

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

Tem sido postulado que os canais de  $K_{ATP}$  estão envolvidos em uma variedade de funções fisiopatológicas do estômago tais como: regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido gástrico e contratilidade do estômago (TOROUDI *et al.*, 1999). Entretanto, os efeitos diretos sobre os canais de potássio sensíveis ao ATP na modulação dos eventos gastroprotetores não foram ainda completamente investigados.

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

## **2.11 Neurônios aferentes sensíveis à capsaicina e a proteção gástrica**

Após o descobrimento das propriedades farmacológicas da capsaicina as funções eferentes dos neurônios primários passaram a ser intensamente estudadas. A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonamida) é uma substância irritante extraída de pimentas vermelhas presentes em plantas do gênero *Capsicum* (MAGA, 1975). A capsaicina é um estimulante de alguns neurônios aferentes de mamíferos, entretanto em altas doses produz dessensibilização desses neurônios (ABDEL SALAM *et al.*, 1994).

Para denotar uma subpopulação de neurônios aferentes primários suscetíveis à ação excitatória ou inibitória da capsaicina, estes foram denominados neurônios primários sensíveis à capsaicina (CSPA) (SZOLCSANYI, 1977; BUCK; BURCKS, 1986). Posteriormente, foi proposto uma nova denominação, neurônios aferentes primários sensíveis a vanilóides (VSPA), tendo em vista que, além da capsaicina, outras substâncias são capazes de atuar nos mesmos receptores da capsaicina, os chamados receptores de vanilóides (SZALLASI; BLOOMBERG, 1999).

Os neurônios CSPA são neurônios bipolares com o corpo no gânglio da raiz dorsal ou no gânglio trigeminal. Com relação a seu diâmetro e à modalidade sensorial, os mesmos são divididos em dois tipos: neurônios de pequeno diâmetro, amielinizados, do tipo C, com funções nociceptoras polimodais, e neurônios de grande diâmetro mielinizados do tipo A $\delta$ , com funções nociceptoras térmicas e mecânicas (HOLZER, 1988). Os terminais periféricos dos neurônios CSPA são os locais de liberação de diversos neuropeptídeos pró-inflamatórios como a substância P (SP), as neurocininas (taquicininas) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) que, por sua vez, darão início a uma cascata bioquímica coletivamente conhecida como inflamação neurogênica (SZALLASI *et al.*, 2007).

No estômago, o CGRP está presente nos terminais periféricos dos nervos aferentes sensíveis à capsaicina e exerce ação protetora. Estas terminações nervosas e os mediadores estão envolvidos com a resposta protetora da mucosa ao ácido luminal, incluindo aumento do fluxo sanguíneo da mucosa e da secreção de muco e bicarbonato (DEMBINSKI *et al.*, 2005). O CGRP mostrou efeitos gastroprotetores quando foram induzidas lesões por etanol, indometacina e aspirina. Em estômago de ratos, seu efeito gastroprotetor é mediado principalmente pelo aumento do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica através do aumento da produção de NO (KAWASHIMA *et al.*, 2002).

O papel dos neurônios aferentes primários no acompanhamento real ou ameaças potenciais para a mucosa gastrintestinal é de relevância fisiológica para a homeostase do corpo. Os neurônios CSPA são agora reconhecidos por reforçar a defesa da mucosa gastrintestinal através de vários mecanismos, entre os quais os reflexos autônomos e o início de proteção tecidual local frente a agressões (HOLZER, 2007). A importância do papel dos neurônios sensoriais sensíveis à

capsaicina na manutenção da integridade da mucosa gástrica origina-se em estudos mostrando a capsaicina sistêmica (GRAY *et al.*, 1994; HOLZER; LIPPE, 1988) ou a capsaicina injetada em altas concentrações no estômago (ABDEL-SALAM *et al.*, 1995; SZOLCSÁNYI, 1990) e em pata de ratos para dessensibilizar os neurônios aferentes, resultando em exacerbação dos efeitos lesivos de agentes ulcerogênicos. Entretanto, a capsaicina em concentração que estimulam os neurônios periféricos tem ação protetora da mucosa gástrica (ABDEL-SALAM *et al.*, 1994).

A sensibilidade dos CSPA à capsaicina é devida principalmente à expressão do receptor potencial transiente de vanilóide do tipo 1 (TRPV1) (CATERINA *et al.*, 1997). TRPV1 foi confirmado como um canal iônico não seletivo, depois de ser clonado em ratos (CATERINA *et al.*, 1997) e em humanos (HAYES *et al.*, 2000; MCINTYRE *et al.*, 2001). Estudos “*in vitro*” têm demonstrado que, além da capsaicina, o TRPV1 pode ser ativado por calor nocivo (CATERINA *et al.*, 1997), baixo pH (TOMINAGA, 2008), substâncias endógenas pró-inflamatórias (SZALLASI; BLUMBERG, 1999) e produtos da lipoxigenase (CATERINA; JULIUS, 2001).

Uma vez sensibilizado, o receptor TRPV1 possibilita o influxo de íons, predominantemente íons cálcio (MARSH *et al.*, 1987; WOOD *et al.*, 1988), e esse influxo é propagado através da fibra e pode ser traduzido como dor pelo sistema nervoso central (HOLZER, 1991). De fato, esse não é o único mecanismo pelo qual a informação nociceptiva é transmitida do neurônio de primeira para o de segunda ordem, no corno dorsal da medula espinhal. Provavelmente, neurotransmissores tais como glutamato, ATP, e uma variedade de outros neuropeptídeos estão envolvidos nesse processo (HOLZER, 1991; LUNDBERG, 1996).

A capsazepina, um antagonista TRPV1, tem sido usada para reverter a hiperalgesia em modelos de dor crônica e inflamatória (WALKER *et al.*, 2003). Kwak *et al.* (1998) demonstraram que a administração de capsazepina, reduz a expressão de neuropeptídeos inflamatórios induzida pela capsaicina, agonista TRPV1, e pela formalina e, ainda, que a redução dos neuropeptídeos inflamatórios induzida pela formalina é menor. Recentemente, foi demonstrado que o etanol estimula os receptores TRPV1 em neurônios sensoriais aferentes primários, promovendo uma inflamação neurogênica, incluindo

extravasamento de plasma e dilatação coronária mediada pelo CGRP (NICOLETTI *et al.*, 2008).

A manutenção da integridade da mucosa gastrintestinal depende de mecanismos de proteção em face de um possível agente agressor e os neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina (CSPA) participam da gastroproteção através de diferentes mecanismos. As respostas de proteção desencadeada por CSPA compreendem alterações no trato GI como o fluxo de sangue, secreção e motilidade, bem como alterações na função imune (HOLZER, 2007). No entanto, existem poucos relatos de correlação entre H<sub>2</sub>S e CSPA bem como seu envolvimento nas funções gastrintestinais. Patacchini *et al* (2004) demonstraram que o H<sub>2</sub>S estimula os neurônios CSPA na bexiga urinária de ratos e Trevisani *et al.* (2005) apontaram para um papel de H<sub>2</sub>S na ativação de taquicininas induzindo respostas inflamatórias neurogênicas nas vias aéreas de porcos da Guiné e que este efeito é mediado pela estimulação dos receptores TRPV1.

Assim, considerando o número limitado de informações sobre o papel fisiopatológico do H<sub>2</sub>S na lesão gástrica, nosso objetivo foi avaliar o efeito protetor do H<sub>2</sub>S na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos e a influência dos canais K<sub>ATP</sub>, dos neurônios sensíveis à capsaicina e dos receptores TRPV1.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- ✓ Avaliar o papel do sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) na defesa da mucosa e no controle da motilidade gástrica em camundongos, bem como estudar a participação dos canais de  $K_{ATP}$ , dos neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina e dos receptores TRPV1 neste efeito.

#### 3.2 Específicos

- ✓ Testar a ação da L-cisteína (substrato para síntese de  $H_2S$ ) ou de doadores de  $H_2S$  (reagente de Lawesson's e NaHS) na lesão gástrica, consumo de glutatona e aumento da peroxidação lipídica na mucosa gástrica, induzidos pela administração de etanol 50%;
- ✓ Avaliar o efeito tratamento com glibenclamida (antagonista seletivo dos  $K_{ATP}$ ), com doses neurotóxicas de capsaicina (para ablação dos neurônios aferentes) ou com capsazepina (antagonista dos receptores TRPV1) sobre o efeito gastroprotetor do  $H_2S$ ;
- ✓ Estudar o efeito da L-cisteína (substrato para síntese de  $H_2S$ ) ou de doadores de  $H_2S$  (reagente de Lawesson's e NaHS) no esvaziamento gástrico de líquidos em camundongos acordados, na secreção gástrica ácida basal e contratilidade espontânea do fundo gástrico;
- ✓ Investigar o papel dos canais de  $K_{ATP}$  e dos receptores TRPV1 nas alterações do esvaziamento gástrico induzidas por doadores de  $H_2S$  (reagente de Lawesson's e NaHS).



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

No presente trabalho, foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando entre 25 e 30 gramas. Os animais foram colocados em caixas, num ambiente com temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  num ciclo de 12h luz/12h escuro. Os animais foram privados de alimento por 18-24h antes dos experimentos, mas tiveram acesso livre a água. Os grupos experimentais consistiram de 5-8 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 da Faculdade de Medicina da UFC. Os protocolos experimentais estão de acordo com os padrões de uso de animais experimentais e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa animal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (protocolo N° 63/07).

### **4.2 Aparelhos e instrumentos laboratoriais**

- ✓ Agitador de tubos tipo Vortex certomart® MV
- ✓ Aquecedor com temperatura controlada (banho-maria)
- ✓ Alicates para deslocamento cervical
- ✓ Balança Analítica Ohaus AS2600
- ✓ Balança Analítica Marte AI200
- ✓ Béquers
- ✓ Centrífuga Eppendorf 5804R
- ✓ Centrífuga de eppendorf Revan, ciclo I
- ✓ Cânula para gavagem
- ✓ ELISA ELX 800 - Biotek

- ✓ Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys
- ✓ Homogeneizador de tecidos Ultra-turraz T8 e Dispergiestation T8.10 da Ika Labortechnik
- ✓ Lâmina lisa para microscopia 26x76 mm
- ✓ Lamínula 24x32 mm
- ✓ Máquina fotográfica digital (Sony Cybershoot, 7.2 mpx)
- ✓ Material cirúrgico
- ✓ Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N
- ✓ Micropipetas Gilson de 10, 20, 100, 200 e 1000  $\mu\text{L}$
- ✓ Microscópio Óptico binocular Nikon Alphaphot 2 VS2
- ✓ Microscópio Leica acoplado a computador
- ✓ Micrótomo Olympus
- ✓ Ponteiras para pipetas automáticas Sigma
- ✓ Seringas (B-D Plastipak)
- ✓ Sonicador
- ✓ Tubos de ensaio

#### **4.3 Drogas utilizadas**

- ✓ L-cisteína (Sigma- Aldrich), diluído em solução salina;
- ✓ DL-propargilglicina (Sigma- Aldrich), diluído em solução de NaOH 0,05 N;
- ✓ Reagente de Lawesson's (Fluka-India), diluído em solução salina;
- ✓ NaHS (Sintetizado pelo laboratório de química da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto), diluído em solução salina;
- ✓ Etanol Absoluto (Sigma- Aldrich);

- ✓ Glibenclamida (Sigma- Aldrich), diluída em solução de NaOH 0,01 N com 4% de glicose;
- ✓ Capsaicina (Sigma- Aldrich), diluída em solução salina;
- ✓ Capsazepina (Sigma- Aldrich), diluído em solução salina;
- ✓ Teofilina
- ✓ Anticorpo anti-CBS (ABNOVA, Taipei, Taiwan)
- ✓ Anticorpo anti-CSE (ABNOVA, Taipei, Taiwan)

#### 4.4 Corantes

- ✓ Eosina (Merck)
- ✓ Hematoxilina (Reagen)

#### 4.5 Soluções

- ✓ Solução Salina

Cloreto de Sódio a 0,9% estéril

- ✓ Formol 10 %

Formol Absoluto ----- 10 ml

Água destilada ----- 90 ml

- ✓ Ácido tricloroacético (TCA) 50%

TCA ----- 50 g

- Água destilada ----- 100 ml
- ✓ Tribromoetanol 2,5%
- 2,2,2-tribromoetanol 99% ----- 25 g
- Salina ----- 1000 ml
- ✓ Dimetil sulfóxido (DMSO) 100%
- ✓ Glicose 4%
- Glicose ----- 4 g
- Salina 0,9% ----- 100 ml
- ✓ Solução de NaOH 0,01N
- NaOH ----- 4 g
- Água destilada ----- 1000 ml
- ✓ Solução de NaOH 0,05N
- NaOH ----- 20 g
- Água destilada ----- 1 L
- ✓ Tampão Tris
- Hidroximetil aminometano (Tris) ----- 6,1 g
- Água destilada ----- 500 ml
- O pH do tampão foi acertado para 8,0

## ✓ EDTA 0,2 M

EDTA ----- 1,737 g  
H<sub>2</sub>O destilada ----- 23,3 ml

## ✓ EDTA 0,02 M

Solução de EDTA 0,2 M ----- 10,0 ml  
H<sub>2</sub>O ----- 90,0 ml

## ✓ Tris 0,4 M pH 8,9

Tris ----- 4,84 g  
EDTA 0,2 M ----- 10,0 ml  
H<sub>2</sub>O destilada ----- 90,0 ml

## ✓ DTNB 0,01 M

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

## ✓ Solução de KCl 1,15%

KCl ----- 1,15 g  
Água destilada ----- 100 ml

✓ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ----- 1 g  
Água destilada ----- 100 ml

## ✓ Solução de Ácido Tiobarbitúrico 0,02 M 0,6%

Ácido tiobarbitúrico ----- 2,882 g  
 Água destilada ----- 1000 ml

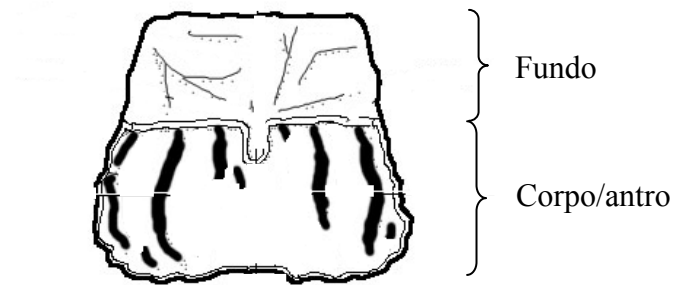
✓ Fenolftaleína 2%

Fenolftaleína ----- 2 g  
 Etanol 50% ----- 100 ml

#### 4.6 Estudo da atividade gastroprotetora

##### 4.6.1 Efeito protetor do sulfeto de hidrogênio na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos: curva dose-resposta

Os camundongos foram tratados, por gavagem, com L-cisteína (precursor da síntese de H<sub>2</sub>S, 25, 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup>) sozinha ou com DL-propargilglicina (inibidor da síntese de CSE, 15, 50 and 150 mg kg<sup>-1</sup>, v.o), NaHS (doador de H<sub>2</sub>S, 75, 150 ou 300 μmol kg<sup>-1</sup>) ou regente de Lawesson's (doador de H<sub>2</sub>S, 3, 9, 27 ou 81 μmol kg<sup>-1</sup>). Após 30 min, a lesão gástrica foi induzida pela administração de etanol 50% (0.5 ml 25g<sup>-1</sup>), também por gavagem, de acordo com a adaptação de ROBERT, 1979. O grupo controle recebeu apenas solução salina ou salina + etanol 50%. Os animais foram sacrificados 1 hora após a aplicação do etanol por deslocamento cervical e os estômagos foram rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura para o estudo dos efeitos das drogas (KO; CHO, 1998). Os estômagos foram então estirados e fotografados com câmera digital para posterior análise e medições das alterações macroscópicas com uso de um programa de planimetria computadorizada (*ImageJ*). Uma amostra da região do corpo de cada estômago foi fixado, imediatamente após a retirada, em formal 10%, e após 24 horas foram transferidas para álcool etílico 70% para subseqüentes análises histopatológicas. Outras amostras, também do corpo gástrico, foram retiradas, pesadas e congeladas a -80°C para posterior dosagem de glutathione reduzida (GSH; SEDLAK; LINDSAY, 1968) e ensaio de malondialdeído (MIHARA; UCHIYAMA, 1978).



**Figura 4.** Esquema representativo do estômago de roedores, mostrando a região do fundo e corpo gástrico e evidenciando lesões lineares no corpo típico do etanol. As amostras utilizadas no respectivo trabalho foram retiradas da região do corpo gástrico.

#### **4.7 Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor do sulfeto de hidrogênio**

Para identificar a participação dos canais de potássio ATP-dependentes no efeito gastroprotetor da L-cisteína ou de doadores de  $H_2S$ , os camundongos foram pré-tratados, por via intraperitoneal, com glibenclamida (droga bloqueadora seletiva dos canais de potássio sensíveis ao ATP) nas doses de 3 ou 10 mg  $kg^{-1}$ . Após 1 hora, os animais receberam L-cisteína (50 mg  $kg^{-1}$ , v.o), NaHS (150  $\mu mol kg^{-1}$ ) ou reagente de Lawesson's (27  $\mu mol kg^{-1}$ ). Trinta minutos depois, a lesão gástrica foi induzida pela administração de etanol 50% (0.5 ml  $25g^{-1}$ , v.o). Os grupos controles receberam apenas solução salina ou salina + etanol 50%. Em outro grupo controle foi também administrado glibenclamida (10 mg  $kg^{-1}$ , i.p) antes do etanol 50%, sem L-cisteína ou doadores de  $H_2S$ . A intensidade gastroprotetora foi avaliada como descrito anteriormente e uma amostra do corpo gástrico de cada animal foi retirada, pesada e congelada a  $-80^{\circ}C$  para a determinação dos níveis de glutathione e malondialdeído, seguindo a técnica citada anteriormente e descrita por Sedlak e Lindsay (1968) ou Mihara e Uchiyama (1978). Outra amostra de tecido foi retirada e colocada em formol a 10% e, após 24 horas, em álcool a 70% para análises microscópicas.

#### **4.8 Participação dos neurônios aferentes sensíveis a capsaicina na proteção do sulfeto de hidrogênio sobre a lesão gástrica induzida por etanol em camundongos**

Para avaliar o envolvimento dos neurônios aferentes sensoriais nos efeitos gastroprotetores da L-cisteína ou dos doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS ou reagente de Lawesson's), os animais foram tratados com doses neurotóxicas de capsaicina, sendo inicialmente uma dose única de 25 mg kg<sup>-1</sup> e posteriormente duas doses de 50 mg kg<sup>-1</sup> por dia, todas por gavagem, com um intervalo de 12 horas entre cada dose, como descrito por Maggi *et al.* (1988) ou Ehrlich *et al.* (2004) e adaptado para nossas condições experimentais. Para evitar insuficiência respiratória, os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5% (250 mg kg<sup>-1</sup>, i.p) e em seguida receberam teofilina (20 mg kg<sup>-1</sup>, i.m.), antes da administração de capsaicina.

Depois de 8 dias de tratamento com capsaicina, uma ou duas gotas de uma solução de capsaicina (10 µg ml<sup>-1</sup>) foram instiladas no globo ocular dos animais, para descobrir se os animais foram dessensibilizados. A ausência de reflexo significou uma efetiva ablação dos neurônios sensoriais aferentes primários. Os animais dessensibilizados foram tratados, por gavagem, com L-cisteína (50 mg kg<sup>-1</sup>), NaHS (150 µmol kg<sup>-1</sup>) ou reagente de Lawesson's (27 µmol kg<sup>-1</sup>). Trinta minutos depois foi administrado etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). Os grupos controles receberam somente salina + etanol (sem capsaicina) ou salina + etanol (dessensibilizados por capsaicina). A área de lesão gástrica foi determinada 1 hora após o etanol. A intensidade gastroprotetora foi aferida como descrito anteriormente e uma amostra do corpo gástrico de cada animal foi retirada, pesada e congelada a -80°C para a determinação dos níveis de glutatona e malondialdeído, seguindo a técnica citada anteriormente e descrita por Sedlak e Lindsay (1968) ou Mihara E Uchiyama (1978). Outra amostra de tecido foi retirada e colocada em formol a 10% e, após 24 horas, em álcool a 70% para análises microscópicas.



#### **4.9 Participação dos receptores TRPV1 na proteção do sulfeto de hidrogênio sobre a lesão gástrica induzida por etanol em camundongos**

Para determinar se os receptores de vanilóides do tipo TRPV1 participam da gastroproteção conferida pela L-cisteína ou pelos doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS ou reagente de Lawesson's), os camundongos foram pré-tratados com capsazepina (antagonista do receptor TRPV1, 5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p) de acordo com Campos *et al.* (2008). Após 30 minutos os animais receberam L-cisteína (50 mg kg<sup>-1</sup>, v.o), NaHS (150 µmol kg<sup>-1</sup>, v.o) ou reagente de Lawesson's (27 µmol kg<sup>-1</sup>, v.o). Trinta minutos depois foi administrado etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). Os grupos controles receberam somente salina + etanol (sem capsazepina) ou salina + etanol (com capsazepina). A área de lesão gástrica foi determinada 1 hora após o etanol. A intensidade gastroprotetora foi aferida como descrito anteriormente e uma amostra do corpo gástrico de cada animal foi retirada, pesada e congelada a -80°C para a determinação dos níveis de glutathione e malondialdeído, seguindo a técnica citada anteriormente e descrita por Sedlak e Lindsay (1968) ou Mihara e Uchiyama, (1978). Outra amostra de tecido foi retirada e colocada em formol a 10% e, após 24 horas, em álcool a 70% para análises microscópicas.

#### **4.10 Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos**

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

#### 4.11 Imunohistoquímica para cistationina- $\gamma$ -liase (CSE) e cistationina- $\beta$ -sintetase (CBS)

As amostras da mucosa gástrica foram retiradas e posteriormente feitas à fixação do tecido em formol tamponado a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70% e em seguida parafinizados. A seguir, foram realizados cortes histológicos de 3 a 4 micras de espessura e as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C por 15 min. Após a desparafinização do tecido, seguida de hidratação, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% diluída em metanol. Posteriormente, foi realizada a lavagem das lâminas com PBS 0,01M (5 min.), seguido por glicina 0,1M em PBS (5 min.) e PBS 0,01M (5 min.). As lâminas foram então mergulhadas numa solução de PBS com albumina bovina (BSA) a 1%, durante 30 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário para detecção da CSE (anti-CSE de coelho, 1:1000) ou detecção da CBS (anti-CBS de rato, 1:500) diluídos em PBS-BSA 1%, em temperatura de 4°C, durante uma noite. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS-BSA 1% e incubadas com o anticorpo secundário marcado com biotina (anticorpo anti- Ig-G de camundongo), na diluição de 1:100, por 1 hora, à temperatura ambiente. Após a remoção do excesso de anticorpo, o material foi incubado com o complexo streptoavidina- biotina- peroxidase diluído em PBS, por 35 minutos, à temperatura ambiente. Após a lavagem com PBS, a reação foi revelada utilizando diamino- benzidina- peróxido de hidrogênio em PBS, à temperatura ambiente, por 5 min., no escuro. Após controle da intensidade, a reação foi interrompida pela lavagem com água corrente por 5 min. A contra- coloração foi feita com hematoxilina de Mayer, por 45 segundos, sendo o excesso retirado com água corrente. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em hidróxido de amônia a 0,5%, por 10 segundos e lavadas novamente em água destilada. Finalmente, as mesmas foram submetidas à desidratação com álcool 95%, álcool absoluto, xilol e montadas com lamínulas em Entellan (RIBEIRO *et al.*, 2002).

#### **4.12 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (gsh) na mucosa gástrica de camundongos**

Uma amostra de tecido do estômago foi utilizada para determinar a concentração de glutathiona reduzida (GSH) de acordo com o método de Sedlak e Lindsay (1968). A determinação de GSH neste método baseia-se na reação do reagente de Ellman, o DTNB, com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido, o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A lesão gástrica foi induzida pela administração por via oral de etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). Transcorrido 1 hora após a aplicação do etanol, os animais foram sacrificados e as amostras retiradas. Um segmento de tecido da mucosa gástrica pesando entre 50-100mg foi homogeneizado em EDTA 0.02 M (1 mL/100g de tecido) gelado. À uma alíquota de 400 µL de tecido homogeneizado foi adicionado 320 µL de água destilada e 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50%. Em seguida o material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, seguido de agitação e filtração. Depois de centrifugado, 400 µL do sobrenadante foram misturados a 800 µL de tampão Tris 0.4 M (pH 8.9). Por fim, foi adicionado 20 µL de DTNB (5,5'-dithio-bis (2- nitrobenzoico ácido) 0,01M). O material foi então agitado durante 3 minutos e a absorbância foi mensurada a 412 nm em espectrofotômetro. A concentração de glutathiona/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.

#### **4.13 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica de camundongos**

Os níveis de malondialdeído na mucosa gástrica foram determinados usando o método de Mihara e Uchiyama (1978) que se baseia na determinação do precursor de MDA pelo teste do tiobarbitúrico. Fragmentos da mucosa gástrica pesando entre 100 e 150 mg foram homogeneizados com KCl gelado 1,15% para preparar 10% de homogenato. A seguir, 250 µl desse homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrífuga de 10 ml, onde foi adicionado 1,5 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1%) e 0,5 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0.6%). Posteriormente, os tubos foram aquecidos por 45 minutos em um banho de água fervendo e a mistura reacional foi resfriada imediatamente em um banho de água gelada, seguida da adição de 4ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 40 segundos com um misturador "vortex", centrifugados a 1200 x g por 10 minutos e a absorbância da camada

orgânica foi mensurada em 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em nmol/g de tecido a partir de uma curva-padrão.

#### 4.14 Avaliação da motilidade e secreção gástrica

##### 4.14.1 Efeito do sulfeto de hidrogênio no esvaziamento gástrico de camundongos acordados

O esvaziamento gástrico foi aferido através da técnica de Reynell e Spray (1978) modificada. Inicialmente, os camundongos foram tratados com salina, L-cisteína (50 e 100 mg kg<sup>-1</sup>, i.p), NaHS (5, 15 e 50 µmol kg<sup>-1</sup>, i.p) ou reagente de Lawesson's (9, 27 e 81 µmol kg<sup>-1</sup>, i.p). Outro grupo foi pré-tratado com DL-propargilglicina (50 mg kg<sup>-1</sup>, i.p) antes da administração de L-cisteína. Após 30 minutos os animais receberam, por gavagem, 300 µL de uma refeição teste que consiste de um marcador não absorvível (0,75 mg/mL de solução de fenol vermelho em 5% de glicose). Decorridos 10, 20 ou 30 minutos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Após a laparotomia, o estômago e o intestino delgado foram expostos, rapidamente isolados por ligaduras nas junções gastro- duodenal, esôfago-gástrica e ileo-cecal, sendo finalmente removidos. Depois de sua retirada, o estômago e intestino delgado foram colocados em uma mesa e divididos nos seguintes segmentos: estômago e intestino. Cada um destes segmentos foi introduzido em um cilindro graduado e o volume total foi aferido através da adição de 10 ml de 0,1 N NaOH. A seguir, os segmentos foram cortados em pequenos fragmentos e homogeneizados por 30 s. Após 20 minutos da homogeneização, foi retirado 1 mL do sobrenadante e centrifugado por 10 min à 2800 rpm. As proteínas no homogeneizado foram precipitadas através da adição de ácido tricloroacético (20%), e novamente centrifugadas por 20 min à 2800 rpm. A seguir, foram retirados 150 µL do sobrenadante e adicionados a 200 mL de 0,5 N de NaOH. A absorbância das amostras foi estabelecida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540nm e expresso em densidade óptica (D.O.). A curva padrão foi obtida da medida por espectrofotômetro à 540 nM de uma concentração conhecida de vermelho de fenol diluída em 0,1 N NaOH. Após a determinação do coeficiente linear ( $\alpha$ ) da curva padrão, a concentração da solução ( $C=D.O.$ ) e a quantidade de fenol vermelho ( $m$ ) por cada segmento ( $m = C \times \text{volume}$ ) foram determinados. A retenção gástrica ( $x$ ) foi expressa pela % de acordo com a seguinte fórmula:

Retenção de corante em no estômago  $x = (\text{quantidade de fenol vermelho no estômago} / \text{total de fenol vermelho em no estômago} + \text{intestino})$ .

#### **4.15 Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) na aceleração do esvaziamento gástrico do sulfeto de hidrogênio**

Para estudar o papel dos  $K_{ATP}$  na aceleração do esvaziamento gástrico de líquido por drogas doadoras de  $H_2S$  (NaHS ou reagente de Lawesson's), os camundongos foram pré-tratados com glibenclamida  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.. Depois de uma hora, os animais receberam NaHS ( $50 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ , i.p) ou reagente de Lawesson's ( $81 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ , i.p). Após 30 minutos, foi administrado, por gavagem,  $300 \text{ } \mu\text{l}$  de uma solução contendo um marcador não absorvível ( $0,75 \text{ mg/mL}$  de solução de fenol vermelho em 5% de glicose). Depois de 20 minutos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o esvaziamento gástrico determinado como previamente descrito acima.

#### **4.16 Participação dos receptores $trpv1$ na aceleração do esvaziamento gástrico do sulfeto de hidrogênio**

Para avaliar o envolvimento dos receptores TRPV1 na aceleração do esvaziamento gástrico de líquidos por drogas doadoras de (NaHS ou reagente de Lawesson's), os camundongos foram pré-tratados com capsazepina  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p. Depois de 30 minutos, os animais receberam NaHS ( $50 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ , i.p) ou reagente de Lawesson's ( $81 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ , i.p). Após 30 minutos, foi administrado, por gavagem,  $300 \text{ } \mu\text{l}$  de uma solução contendo um marcador não absorvível ( $0,75 \text{ mg/mL}$  de solução de fenol vermelho em 5% de glicose). Depois de 20 minutos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o esvaziamento gástrico determinado como previamente descrito acima.

#### 4.17 Efeito do sulfeto de hidrogênio na secreção gástrica de camundongos

Este modelo, descrito por Vissher *et al.* (1954), permite estudar o efeito de drogas na secreção gástrica. O conteúdo gástrico foi acumulado durante 4 horas e avaliado em termos de volume secretado, pH e acidez total. Os animais foram anestesiados com éter, fixados em decúbito dorsal em uma placa de cortiça onde foi realizada a tricotomia da parede abdominal. Com uma incisão de 2 cm na região epigástrica, o estômago foi localizado e o piloro amarrado com linha cordonê. Após esse procedimento, os camundongos foram tratados com L-cisteína ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ), NaHS ( $50 \text{ } \mu\text{mo kg}^{-1}$ ) ou reagente de Lawesson's ( $81 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) via intraperitoneal, em cada grupo correspondente. Os grupos controle foram tratados com salina, histamina ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ou ranitidina ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) também por via intraperitoneal. Após a administração das drogas, a parede abdominal foi então suturada e aguardou-se a recuperação anestésica. Transcorridas 4 horas da cirurgia, os animais foram sacrificados sob anestesia etérea profunda. Após o sacrifício o esôfago foi rapidamente pinçado para evitar perda de material secretado e os estômagos removidos, lavados com água destilada, secados com papel de filtro e mantidos sobre placa de gelo. Em seguida o estômago foi seccionado ao longo da pequena curvatura, e a mucosa foi lavada com 2 mL de soro, recolhendo-se o suco gástrico e o lavado em tubos de ensaio imersos em gelo. O pH e o total de acidez do suco gástrico foi determinado através de titulação, usando fenolftaleína 2% como indicador.

#### 4.18 Avaliação da contratilidade gástrica espontânea *in vitro*

Para determinação da contratilidade gástrica foram utilizados tiras longitudinais do fundo gástrico de camundongos normais. Essas tiras foram então lavadas para limpeza e retirada de resíduos utilizando uma solução nutritora de Tyrode. A seguir, as tiras isoladas foram montadas em uma câmara orgânica com volume de 5 ml, contendo solução fisiológica de tyrode, a temperatura de  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7.4$ , oxigenadas com mistura de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de  $\text{O}_2$  (AUBÉ *et al.*, 1996). Após a montagem na câmara, uma das extremidades da tira foi presa a uma base fixa e a outra a um transdutor de força isométrico acoplado a um sistema de aquisição de dados (Chart 4.2). Foi aplicada aos tecidos uma tensão de 1g por um período de equilíbrio de 60 minutos. Para avaliar a responsividade dos tecidos utilizou-se como protocolo experimental, uma solução contraturante de KCl (controle, contração correspondente a

100%). O passo seguinte se procedeu com a lavagem do tecido, novamente utilizado-se solução Tyrode. Por fim, o NaHS foi adicionado cumulativamente na concentração de 1 até 1000 $\mu$ M.

#### **4.19 Análise estatística**

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

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Estudo da atividade gastroprotetora

#### 5.1.1 Efeito protetor do sulfeto de hidrogênio na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos: curva dose-resposta

Na figura 5 podemos observar que os animais tratados com etanol apresentaram lesões macroscópicas na mucosa gástrica. Ainda na figura 5 observa-se que o tratamento com doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS, *painel B*, ou o reagente de Lawesson's, *painel C*) ou com o precursor da síntese de H<sub>2</sub>S (L-cisteína, *painel A*) reduziram, de maneira dose-dependente, as lesões macroscópicas causadas por etanol 50% na mucosa gástrica. A L-cisteína (50 mg kg<sup>-1</sup>), o (NaHS 150 μmol kg<sup>-1</sup>) e o reagente de Lawesson's (27 μmol kg<sup>-1</sup>), reduziram a lesão em 53,8%, 79% e 84%, respectivamente. No *painel A* da figura 5 também foi verificado que a administração de PAG, que bloqueia a atividade da CSE, reverteu a proteção gástrica induzida por L-cisteína (*painel A*).

Também foi verificado o efeito tempo-depedente do reagente de Lawesson's na dose de 27 umol kg<sup>-1</sup>, com o seu efeito protetor persistindo durante 6 horas, mas sendo completamente abolido após 24 horas (dados não mostrados).

### 5.2 Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos tratados com L-cisteína, doadores DE H<sub>2</sub>S e/ou etanol

Na tabela 1 e figura 6 (*painel B*) observa-se que a administração de etanol 50% nos camundongos provocou graves lesões microscópicas, caracterizada por hemorragia, edema e perda de células epiteliais. Entretanto, o pré-tratamento dos animais com doadores de H<sub>2</sub>S (reagente de Lawesson's 27 μmol kg<sup>-1</sup> e NaHS 150 μmol kg<sup>-1</sup>) diminuíram de forma significativa (p<0,05) esses danos microscópicos provocados pelo álcool. Da mesma forma, o pré-tratamento com o substrato para síntese de H<sub>2</sub>S (L-cisteína 50 mg kg<sup>-1</sup>) diminuiu



principalmente a hemorragia causada pela administração de etanol, mas não apresentou diferenças significantes nos outros parâmetros. Foi observado também que nos animais tratados com etanol não houve infiltrado inflamatório, não apresentando diferenças quando comparado com o controle (salina).

Na figura 6 ainda podemos observar que a administração de etanol 50% causou lesão na região superficial glandular gástrica com perda de células epiteliais e intensa hemorragia (*painel B*). No entanto, essas alterações não foram observadas em camundongos tratados com L-cisteína (*painel C*), NaHS (*painel D*) ou reagente de Lawesson's (*painel E*). Contudo, o efeito gastroprotetor da L-cisteína foi abolido quando os animais foram pré-tratados com PAG (tabela 1 e figura 7, *painel F*).

### **5.3 Avaliação imunohistoquímica para cistationina- $\gamma$ -LIASE (CSE) E cistationina- $\beta$ -sintetase (CBS) na mucosa gástrica de camundongos tratados salina ou etanol**

Na figura 7 podemos observar que nos animais normais, tratados apenas com salina, houve imunomarcção para CBS especialmente nas células principais, mas também foi observada alguma marcação nas células da mucosa (*painel B*). No entanto, quando os animais foram tratados com etanol 50% a marcação foi mais generalizada, incluindo também as células parietais (*painel C*). Diferentemente da CBS, não houve imunomarcção significativa da CSE nos animais normais (*painel D*), contudo quanto administrado etanol foi observado marcação para CSE nas células parietais e em algumas células da mucosa (*painel E*).

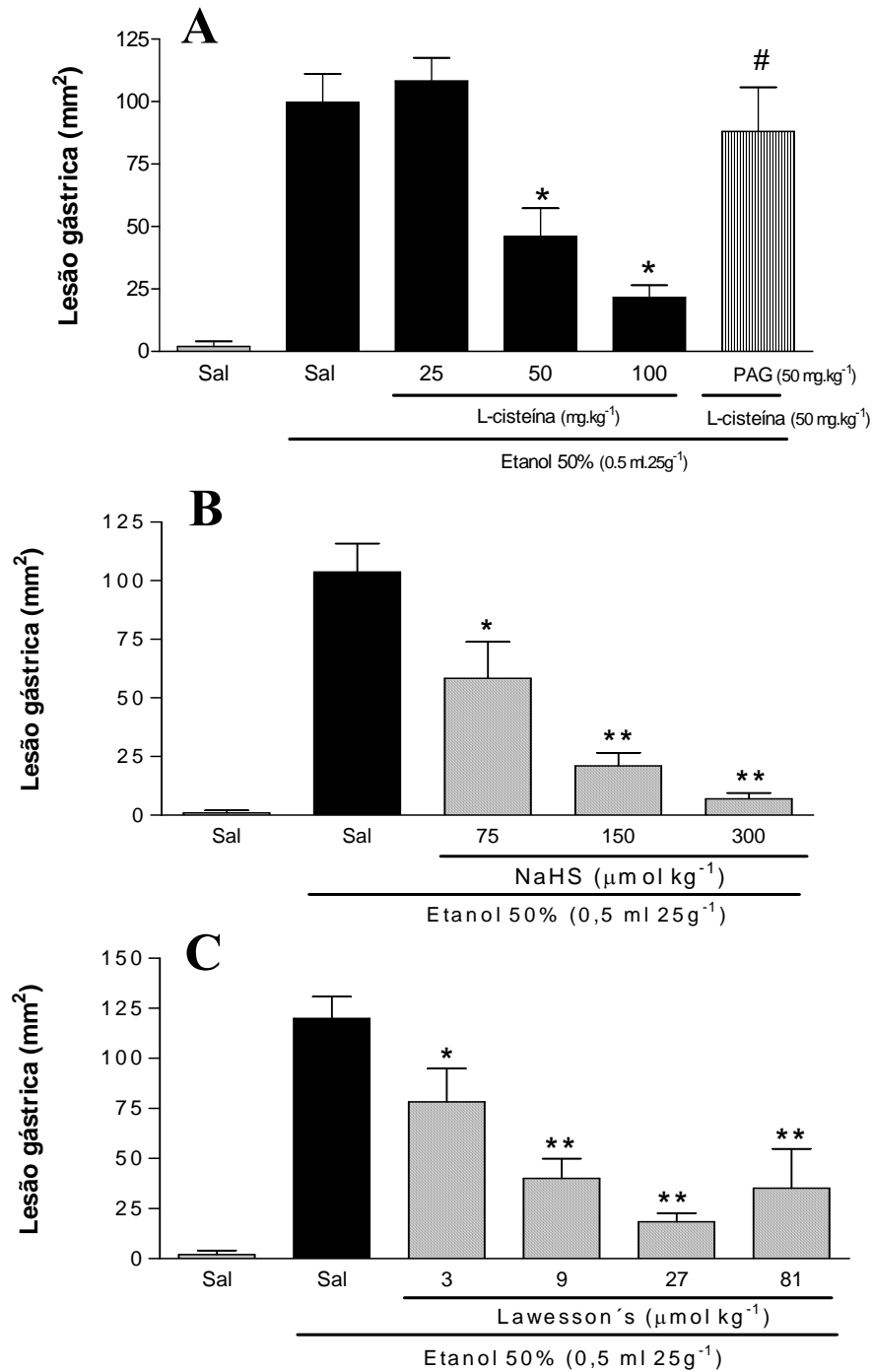
### **5.4 Determinação dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com l-cisteína ou doadores de H<sub>2</sub>S no curso da lesão gástrica induzida por etanol**

A determinação dos grupos sulfidrílicos não protéicos na mucosa gástrica de camundongos mostrou que a administração de etanol diminuiu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o nível gástrico de glutathiona reduzida quando comparado com o grupo controle

(apenas salina). Entretanto, o pré-tratamento dos animais com L-cisteína (*painel A*), NaHS (*painel B*) ou reagente de Lawesson's (*painel C*) aumentou os níveis de glutathione até os valores semelhantes aos normais (figura 8). Da mesma forma que os dados macroscópicos de lesão, a administração de PAG ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) reverteu o efeito protetor da L-cisteína ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) sobre os níveis gástricos de GSH no curso da lesão induzida por etanol (figura 8, *painel A*).

### **5.5 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica de camundongos tratados com l-cisteína, doadores de H<sub>2</sub>S no curso da lesão gástrica induzida por etanol**

Na figura 09 podemos observar que a administração de etanol 50% provocou um aumento de 41,5% nos níveis de MDA na mucosa gástrica quando comparado ao grupo controle (apenas salina), indicando que houve peroxidação de lipídios por espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pelo álcool. Entretanto, quando os animais foram pré-tratados com L-cisteína (50 e 100  $\text{mg kg}^{-1}$ , *painel A*), NaHS (150 e 300  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ , *painel B*) ou reagente de Lawesson's (9 e 27  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ , *painel C*), observa-se uma redução significativa dos níveis gástricos de MDA quando comparado ao grupo recebeu somente etanol 50%. Por outro lado, a administração de PAG antes da L-cisteína 50  $\text{mg kg}^{-1}$  foi capaz de reverter a gastroproteção e diminuição de MDA promovido pela L-cisteína. Assim, esses dados sugerem que o sulfeto de hidrogênio reduz o efeito do álcool e das ROS sobre a peroxidação de lipídeos nas células da mucosa gástrica.



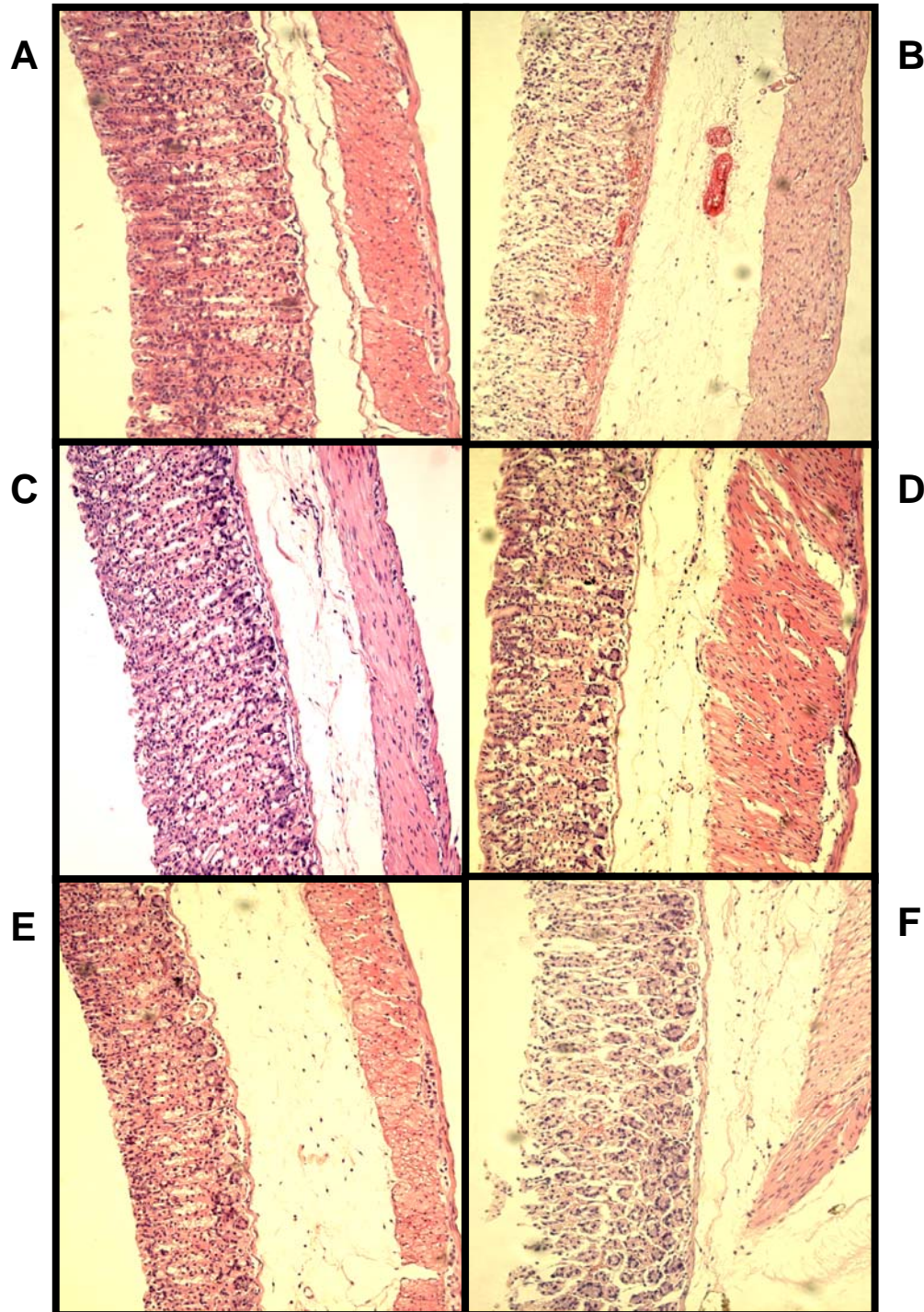
**Figura 5: Efeito do sulfeto de hidrogênio na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.** Os animais foram tratados, por gavagem, com L-cisteína sozinha ou com PAG (painel A), NaHS (painel B) ou reagente de Lawesson's (painel C) 30 minutos antes da administração de etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). O grupo controle recebeu somente salina. O índice de lesão gástrica foi determinado 1 hora após o etanol. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 6 animais por grupo. (\*) p<0,05 e (\*\*) p<0,01 quando comparado ao grupo tratado com etanol; (#) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com L-cisteína ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

**Tabela 1.** Efeito dos doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS e reagente de Lawesson's), ou L-cisteína ou L-cisteína + DL-propargilglicina (PAG) na lesão gástrica microscópica induzida por etanol 50%. Avaliação medida em escores de acordo com os critérios de Laine *et al.*, 1988.

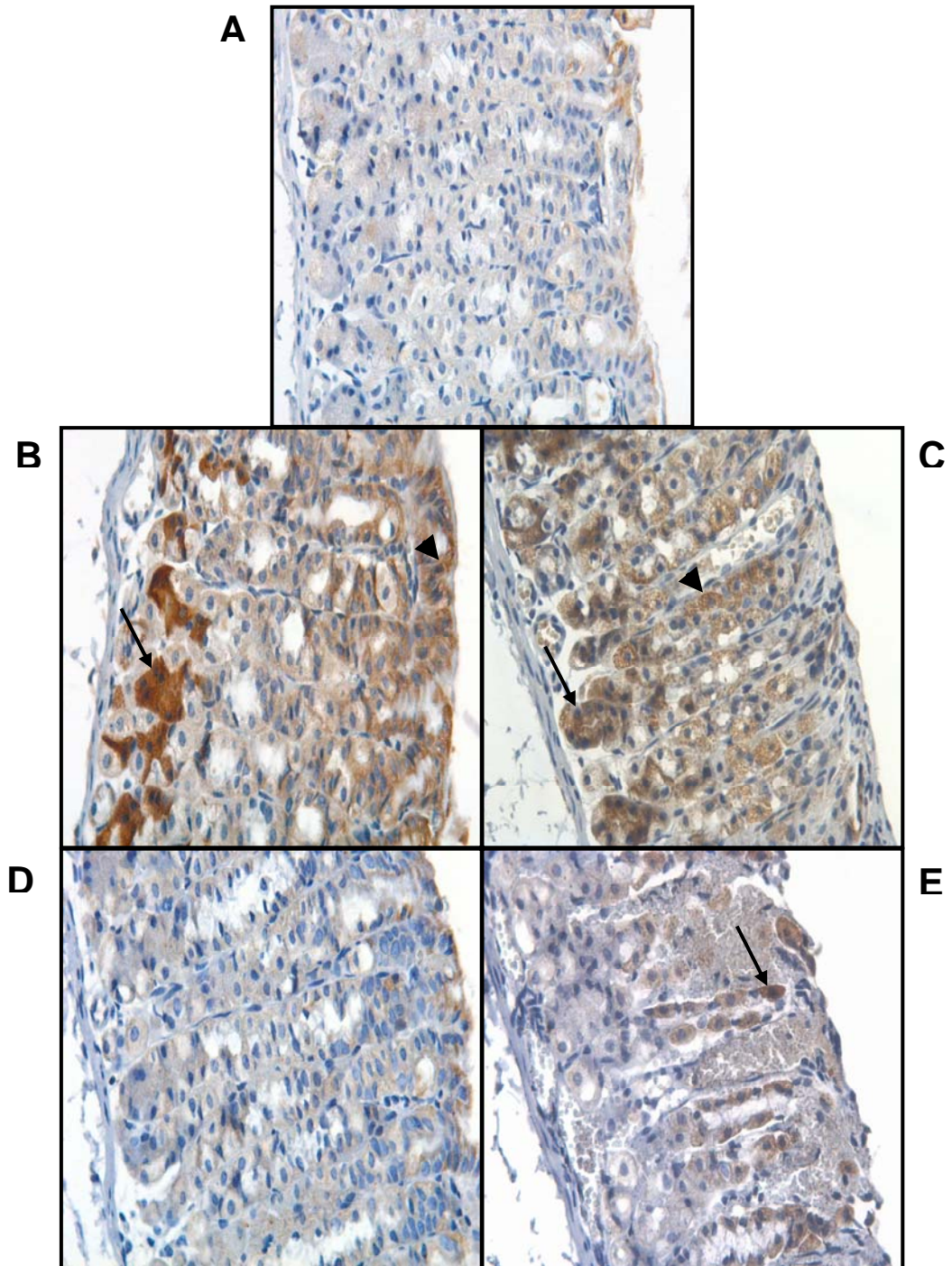
<b>Grupo Experimental (N=6)</b>	<b>Hemorragia (0 – 4 escores)</b>	<b>Edema (0 – 4 escores)</b>	<b>Perda de células (0 – 4 escores)</b>	<b>Infiltrado Inflamatório (0 – 4 escores)</b>
Saline	0	0	0	0
Etanol	3.5 (3 – 4)	4 (3 – 4)	3 (2 – 3)	0
Etanol + Lawesson's (27 µmol kg <sup>-1</sup> )	1 (0 – 1)*	1 (0 – 1)*	0 (0 – 1)*	0
Etanol + NaHS (150 µmol kg <sup>-1</sup> )	1 (0 – 2)*	1 (1 – 0)*	1 (1 – 2)*	0
Etanol + L-cisteína (50 mg kg <sup>-1</sup> )	1 (0 – 3)*	2 (1 – 2)	1 (1 – 3)	0
Etanol + L-cisteína + PAG (50 mg kg <sup>-1</sup> )	4 (3 – 4) <sup>#</sup>	4 (2 – 4) <sup>#</sup>	2 (2 – 3)	0

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente.

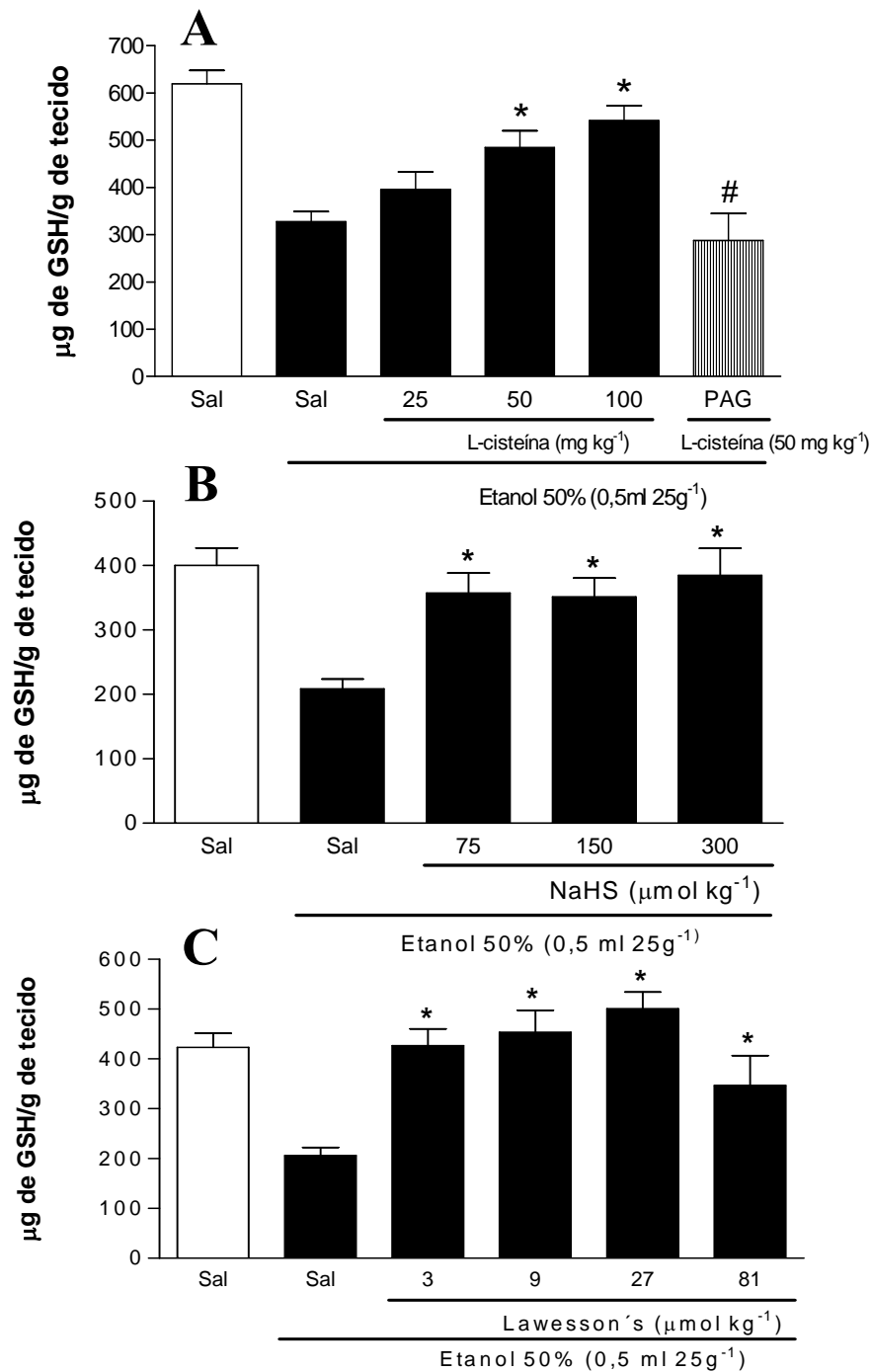
\* $P < 0.05$ , vs grupo do etanol; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , vs grupo do Etanol + L-cisteína + PAG. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's.



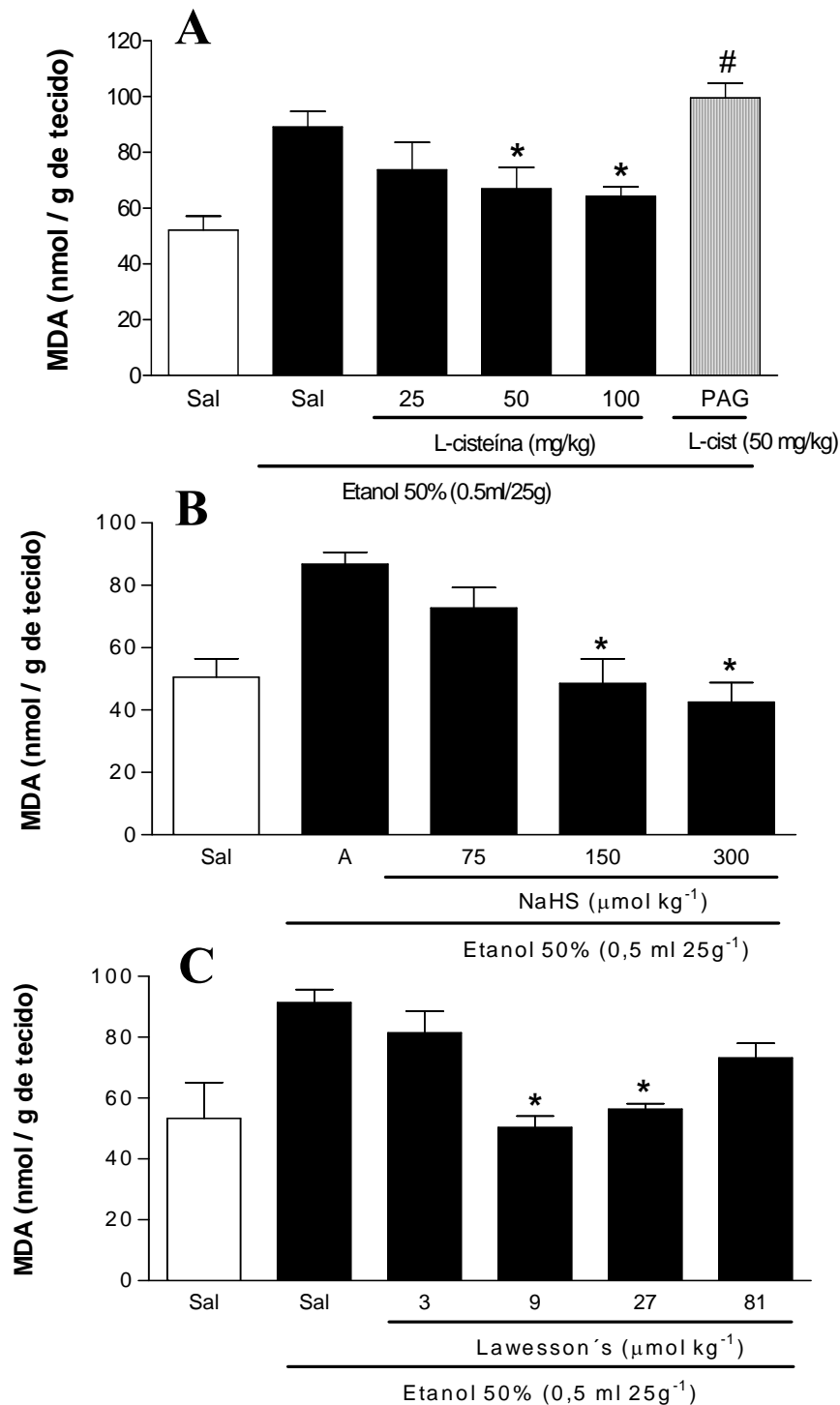
**Figura 6: Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos (100x).** Grupo controle (salina, *painel A*); efeito do etanol 50% na mucosa gástrica, mostrando lesão na região superficial glandular gástrica com perda de células epiteliais e intensa hemorragia (*painel B*); Pré-tratamento com NaHS  $150 \mu\text{mol kg}^{-1}$  (*painel C*) ou reagente de Lawesson's  $27 \mu\text{mol kg}^{-1}$  (*painel D*) ou L-cisteína  $50 \text{mg kg}^{-1}$  (*painel E*), mostrando uma diminuição nos efeitos microscópicos provocados pelo álcool; A administração de PAG abole os efeitos gastroprotetores da L-cisteína (*painel F*).



**Figura 7: Imunohistoquímica para cistationina- $\gamma$ -liase (CSE) e cistationina- $\beta$ -sintetase (CBS) na mucosa gástrica de camundongos normais ou tratados com etanol 50%. Controle negativo (sem o anticorpo primário, *painel A*); Imunomarcção para CBS no estômago de animal tratado apenas com salina (*painel B*) ou tratado com etanol 50% (*painel C*) com as setas indicando marcação nas células principais e as cabeças de seta indicando marcação nas células da mucosa (*painel B*) ou parietais (*painel C*). Marcação imunohistoquímica para CSE no estômago de animal tratado apenas com salina (*painel D*) ou tratado com etanol 50% (*painel E*) com as setas indicando marcação nas células parietais. (aumento de 400x).**



**Figura 8: Efeito do sulfeto de hidrogênio sobre os níveis de glutatona presentes na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol.** Os animais foram tratados, por gavagem, com L-cisteína sozinha ou com PAG (*painel A*), NaHS (*painel B*) ou reagente de Lawesson's (*painel C*) 30 minutos antes da administração de etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). O grupo controle recebeu somente salina. A administração de etanol diminuiu de forma significativa o nível gástrico de glutatona reduzida. Drogas que aumentam a produção de H<sub>2</sub>S reverteram esse efeito do etanol. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 6 animais por grupo. (\*) p<0,05 quando comparado ao grupo do etanol sozinho; (#) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com L-cisteína ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.



**Figura 9: Efeito do sulfeto de hidrogênio sobre a concentração de MDA na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol.** Os animais foram tratados, por gavagem, com L-cisteína sozinha ou com PAG (*painel A*), NaHS (*painel B*) ou reagente de Lawesson's (*painel C*) 30 minutos antes da administração de etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). O grupo controle recebeu somente salina. A administração de etanol aumentou de forma significativa o nível gástrico de MDA. Drogas que aumentam a produção de H<sub>2</sub>S reverteram esse efeito do etanol. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  EPM de pelo menos 6 animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo do etanol sozinho; (#)  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com L-cisteína ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.



## 5.6 Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) no efeito gastroprotetor do sulfeto de hidrogênio

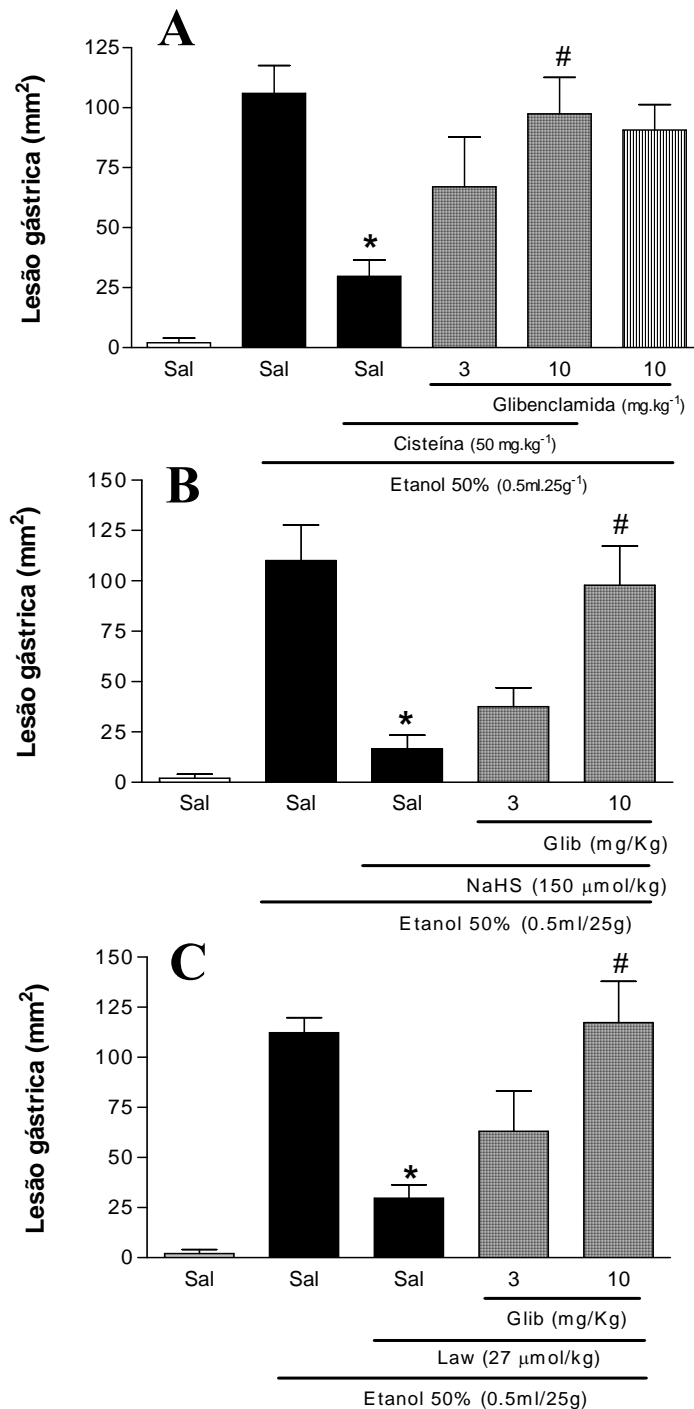
Para avaliar o envolvimento do  $K_{ATP}$  no efeito protetor da L-cisteína ou de doadores de  $H_2S$ , os animais foram pré-tratados com glibenclamida. Na figura 10, observamos que o pré-tratamento dos animais com glibenclamida (3 e 10 mg  $kg^{-1}$ ), aboliu, de maneira dose-dependente, os efeitos protetores da L-cisteína 50 mg  $kg^{-1}$  (*painel A*), NaHS 150  $\mu mol kg^{-1}$  (*painel B*) ou reagente de Lawesson's 27  $\mu mol kg^{-1}$  (*painel C*) na lesão gástrica macroscópica induzida por etanol 50%.

Na figura 11 observa-se que a administração de glibenclamida (10 mg  $kg^{-1}$ ) aboliu o efeito do NaHS 150  $\mu mol kg^{-1}$  (*painel A*) e do reagente de Lawesson's 27  $\mu mol kg^{-1}$  (*painel B*) sobre os níveis de glutathiona na mucosa gástrica. Efeito semelhante foi observado na figura 12, onde a glibenclamida (10 mg  $kg^{-1}$ ) também suprimiu o efeito das drogas doadoras de  $H_2S$  sobre a concentração de MDA no curso da lesão gástrica por etanol.

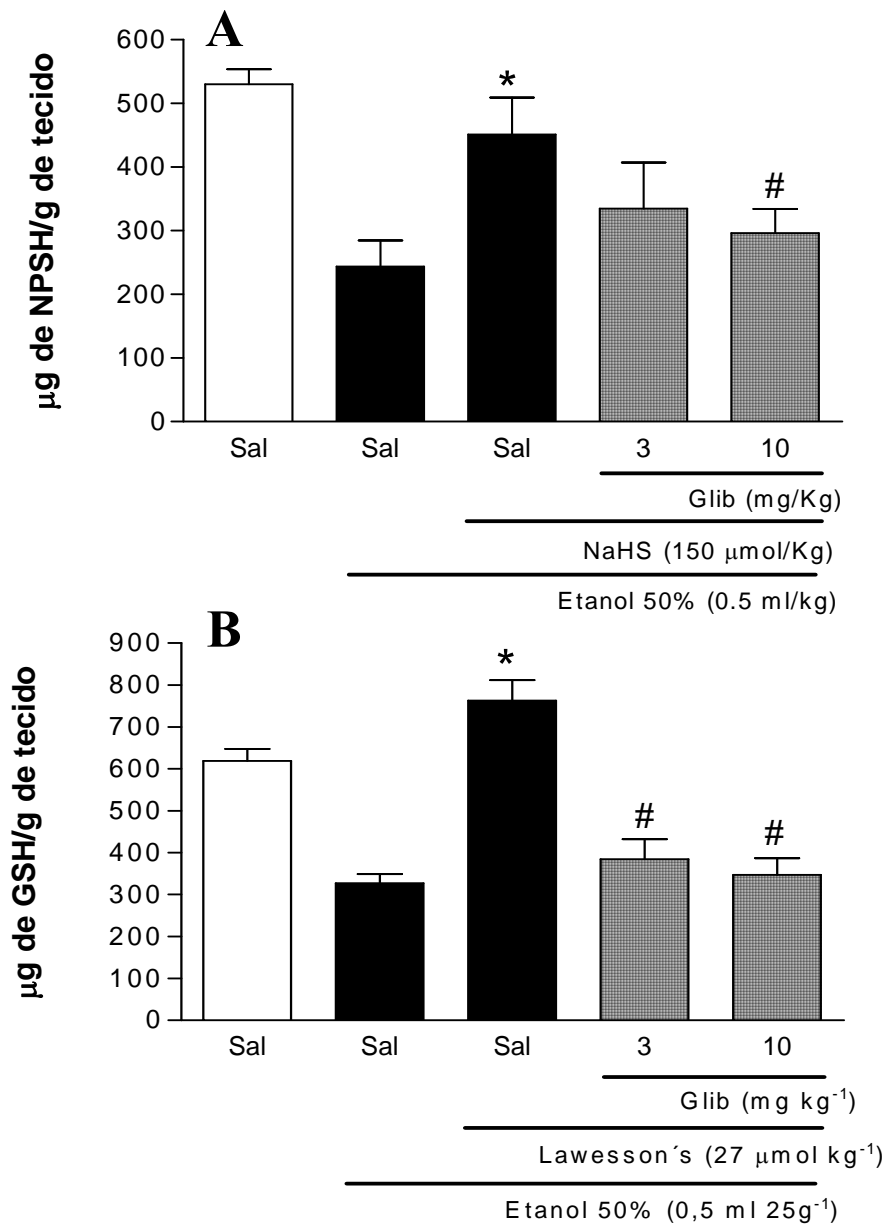
## 5.7 Participação dos neurônios aferentes sensíveis à capsaicina e papel dos receptores TRPV1 na proteção do sulfeto de hidrogênio sobre a lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

A figura 13 mostra que a dessensibilização dos neurônios aferentes por doses neurotóxicas de capsaicina suprimiu os efeitos gastroprotetores da L-cisteína ou dos doadores de  $H_2S$  (NaHS e reagente de Lawesson's) na lesão induzida por etanol. Da mesma forma, o pré-tratamento dos animais com capsazepina, um antagonista dos receptores TRPV1, aboliu os efeitos gastroprotetores da L-cisteína, do NaHS e do reagente de Lawesson's na lesão gástrica macroscópica induzida por etanol em camundongos (figura 14) indicando a importância dos neurônios aferentes e, em particular, dos receptores TRPV1 na gastroproteção do sulfeto de hidrogênio.

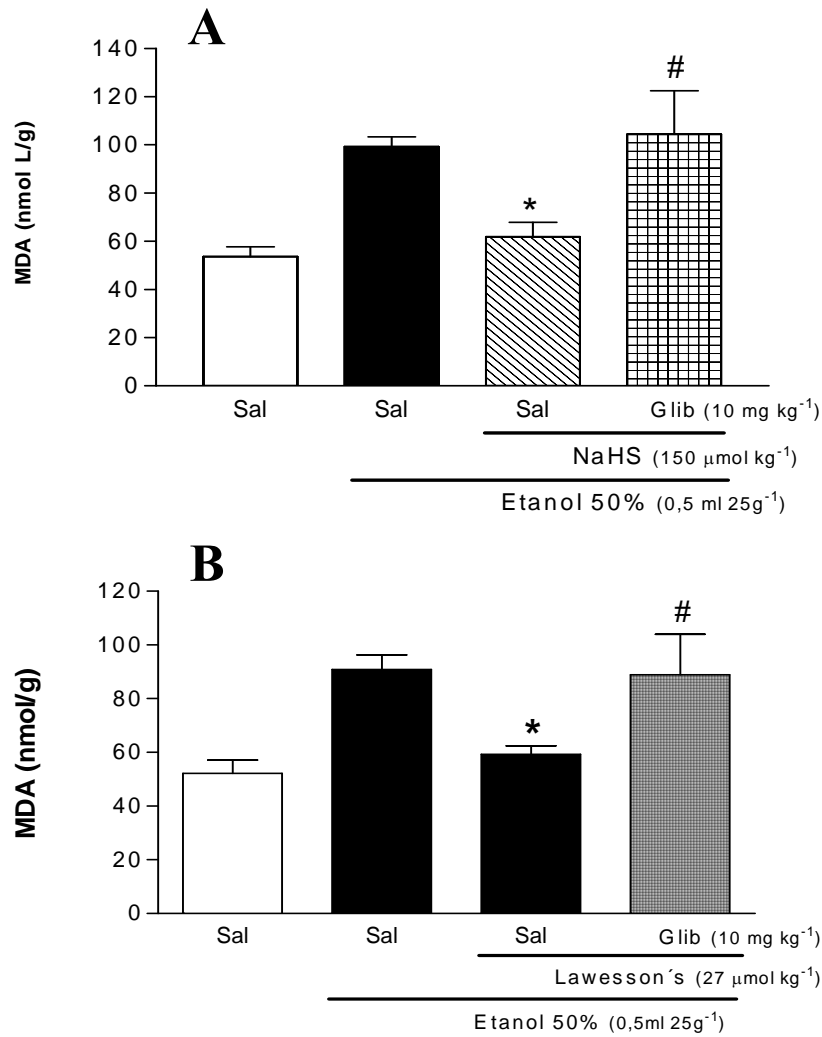
Na figura 15 observa-se que a ablação dos neurônios aferentes por capsaicina aboliu o efeito protetor da L-cisteína ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ), do NaHS ( $150 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) e do reagente de Lawesson's ( $27 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) sobre os níveis de glutathione na mucosa gástrica. Efeito semelhante foi observado na figura 16, na qual os animais tratados com de capsazepina ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) apresentou tendência de diminuição dos níveis de GSH, embora os dados não sejam significativos. Efeito semelhante foi observado sobre a concentração de malondialdeído, onde o NaHS ( $150 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) e o reagente de Lawesson's ( $27 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) reverteram o efeito lesivo do álcool sobre os níveis de MDA (figura 17, *painéis A e B*). Entretanto, esses doadores de  $\text{H}_2\text{S}$  não foram capaz de reverter o efeito da capsazepina sobre os níveis de MDA (figura 18).



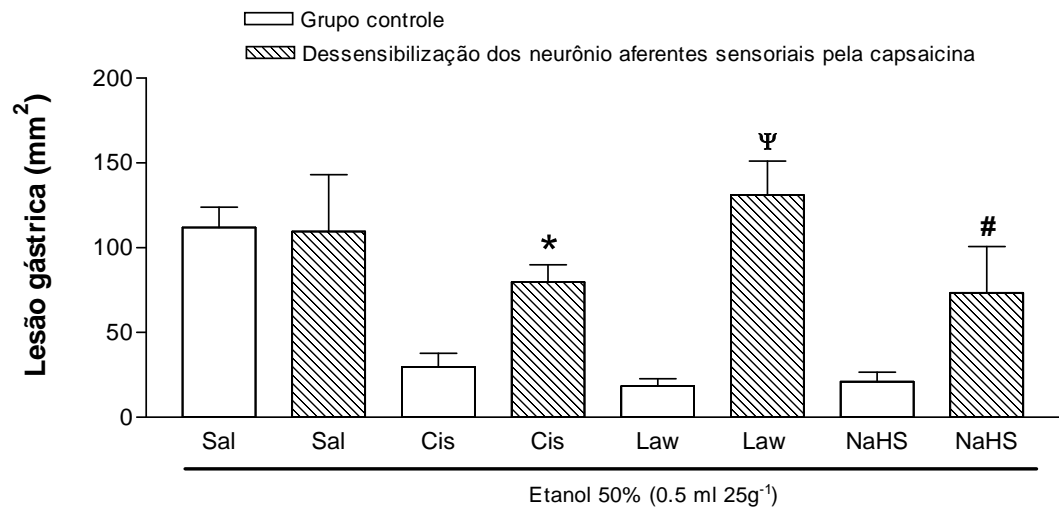
**Figura 10: Efeito do sulfeto de hidrogênio na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos pré-tratados com glibenclamida.** Os animais receberam, por via oral, glibenclamida nas doses de 3 e 10 mg kg<sup>-1</sup>. Após 1 hora os animais foram tratados com NaHS (*painel A*) ou reagente de Lawesson's (*painel B*). Trinta minutos depois foi administrado etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). O grupo controle recebeu somente salina. O índice de lesão gástrica foi determinado 1 hora após o etanol. A administração de glibenclamida reverteu o efeito protetor das drogas doadoras de H<sub>2</sub>S e da L-cisteína. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 6 animais por grupo. (\*) p<0,05 quando comparado ou grupo do etanol sozinho; (#) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com NaHS (*painel A*) ou reagente de Lawesson's (*painel B*). ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.



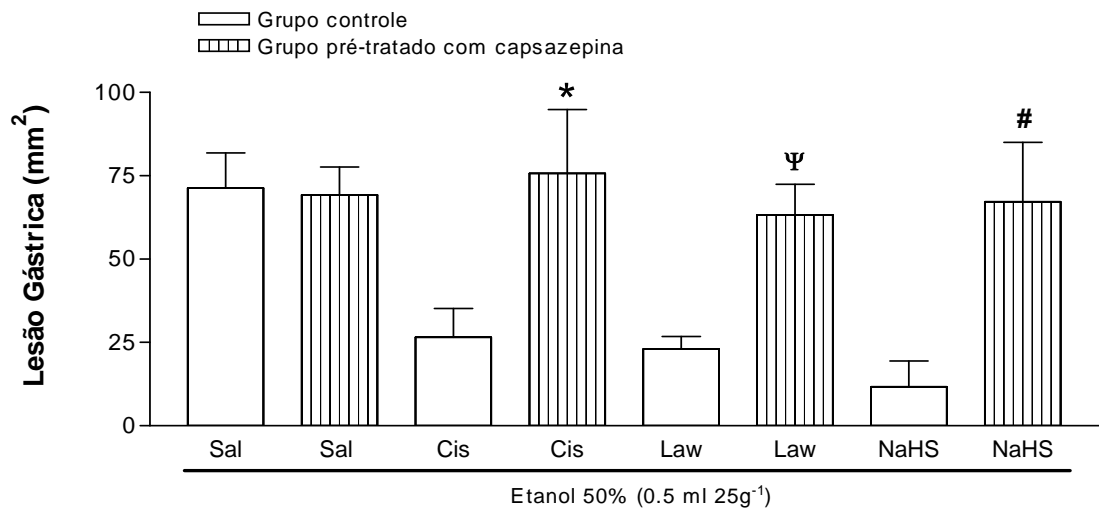
**Figura 11: Determinação dos níveis de glutathiona presentes na mucosa gástrica de camundongos pré-tratados com glibenclamida.** Os animais receberam, por via oral, glibenclamida nas doses de 3 e 10 mg kg<sup>-1</sup>. Após 1 hora os animais foram tratados com NaHS (*painel A*) ou reagente de Lawesson's (*painel B*). Trinta minutos depois foi administrado etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). O grupo controle recebeu somente salina. A administração de glibenclamida reverteu o efeito protetor das drogas doadoras de H<sub>2</sub>S sobre o nível gástrico de glutathiona. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 6 animais por grupo. (\*) p<0,05 quando comparado ou grupo do etanol sozinho; (#) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com NaHS (*painel A*) ou reagente de Lawesson's (*painel B*). ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.



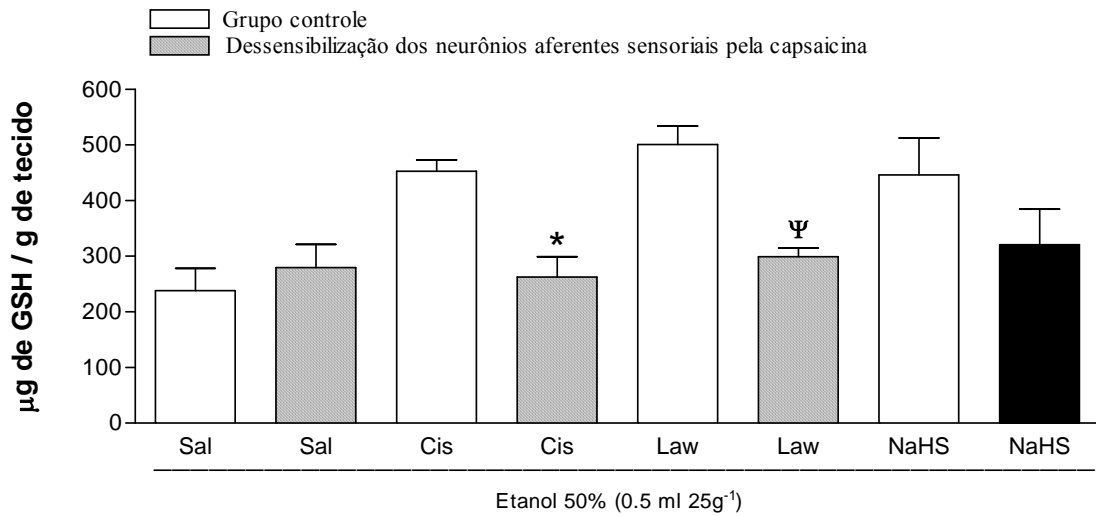
**Figura 12: Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) camundongos pré-tratados com glibenclamida no curso da lesão gástrica por etanol.** Os animais receberam, por via oral, glibenclamida na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup>. Após 1 hora os animais foram tratados com NaHS (*painel A*) ou reagente de Lawesson's (*painel B*). Trinta minutos depois foi administrado etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). O grupo controle recebeu somente salina. A administração de glibenclamida reverteu o efeito protetor das drogas doadoras de H<sub>2</sub>S sobre o nível gástrico de MDA. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 6 animais por grupo. (\*) p<0,05 quando comparado ou grupo do etanol sozinho; (#) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com NaHS (*painel A*) ou reagente de Lawesson's (*painel B*). ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.



**Figura 13: O efeito protetor do H<sub>2</sub>S na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos é mediado por fibras aferentes sensoriais.** Os animais foram tratados com doses neurotóxicas de capsaicina. Após 8 dias, os animais dessensibilizados foram tratados, por gavagem, com L-cisteína (50 mg kg<sup>-1</sup>), NaHS (150 μmol kg<sup>-1</sup>) ou reagente de Lawesson's (27 μmol kg<sup>-1</sup>). Trinta minutos depois foi administrado etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). O grupo controle recebeu somente salina. A área de lesão gástrica foi determinada 1 hora após o etanol. O efeito gastroprotetor da L-cisteine, NaHS, ou reagente de Lawesson's foi inibido pela dessensibilização das fibras aferentes sensoriais pela capsaicina. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 8 animais por grupo. (\*) p<0,05 quando comparado ou grupo tratado com L-cisteína; (Ψ) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com reagente de Lawesson's; (#) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com NaHS. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

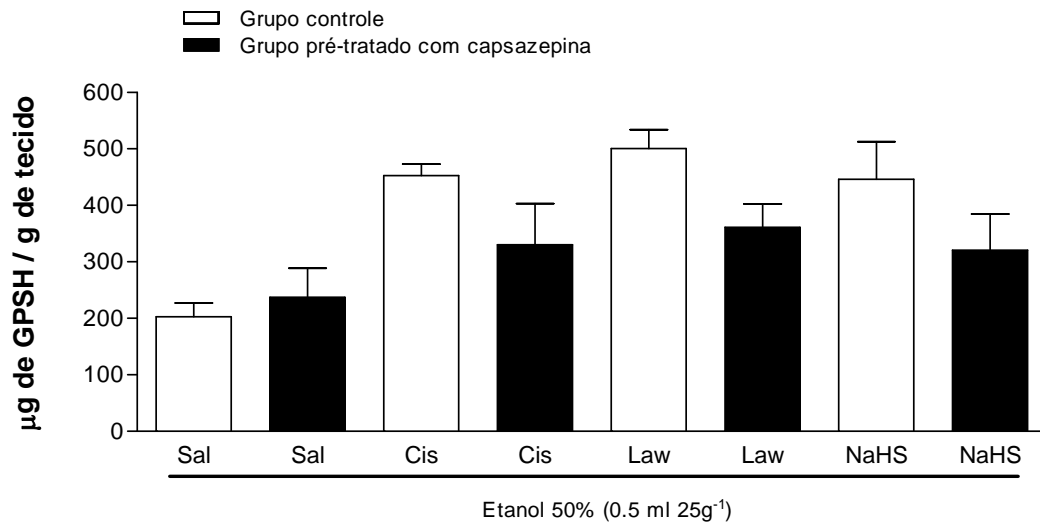


**Figura 14: O efeito protetor do H<sub>2</sub>S na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos é mediado por receptores TRPV1.** Os animais foram pré-tratados com capsazepina (10 mg kg<sup>-1</sup>, i.p). Após 30 minutos, os animais foram tratados, por gavagem, com L-cisteína (50 mg kg<sup>-1</sup>), NaHS (150 μmol kg<sup>-1</sup>) ou reagente de Lawesson's (27 μmol kg<sup>-1</sup>). Trinta minutos depois foi administrado etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). O grupo controle recebeu somente salina. A área de lesão gástrica foi determinada 1 hora após o etanol. O efeito gastroprotetor da L-cisteine, NaHS, ou reagente de Lawesson's foi inibido pela capsazepina. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 8 animais por grupo. (\*) p<0,05 quando comparado ou grupo tratado com L-cisteína; (Ψ) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com reagente de Lawesson's; (#) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com NaHS. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

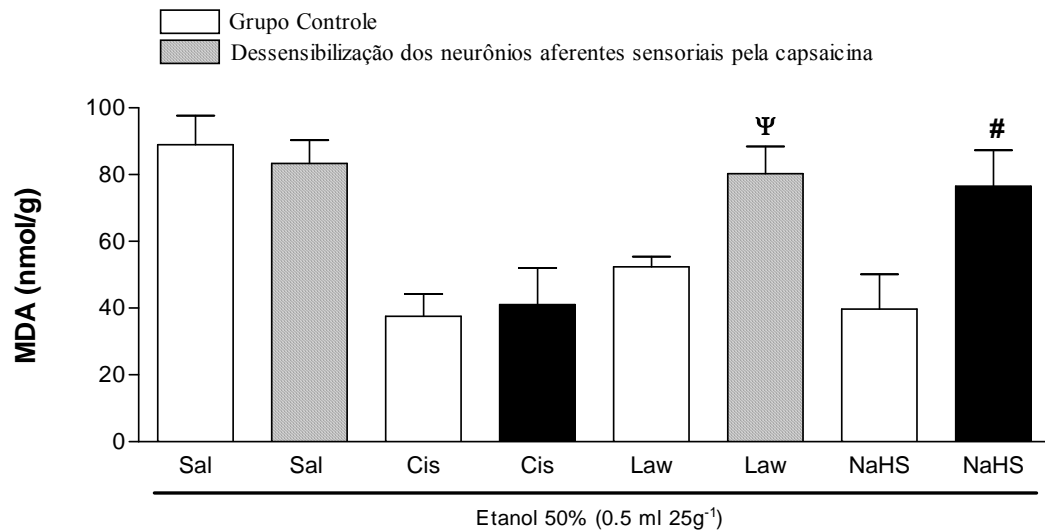


**Figura 15: O efeito protetor do H<sub>2</sub>S sobre os níveis gástricos de GSH em camundongos é mediado por fibras aferentes sensoriais.** Os animais foram tratados com doses neurotóxicas de capsaicina. Após 8 dias, os animais dessensibilizados foram tratados, por gavagem, com L-cisteína (50 mg kg<sup>-1</sup>), NaHS (150 µmol kg<sup>-1</sup>) ou reagente de Lawesson's (27 µmol kg<sup>-1</sup>). Trinta minutos depois foi administrado etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). O grupo controle recebeu somente salina. As amostras foram removidas 1 hora após o etanol. O efeito protetor da L-cisteína ou reagente de Lawesson's sobre o nível da glutatona foi inibido pela dessensibilização das fibras aferentes sensoriais pela capsaicina. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 8 animais por grupo. (\*) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com L-cisteína; (Ψ) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com reagente de Lawesson's. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

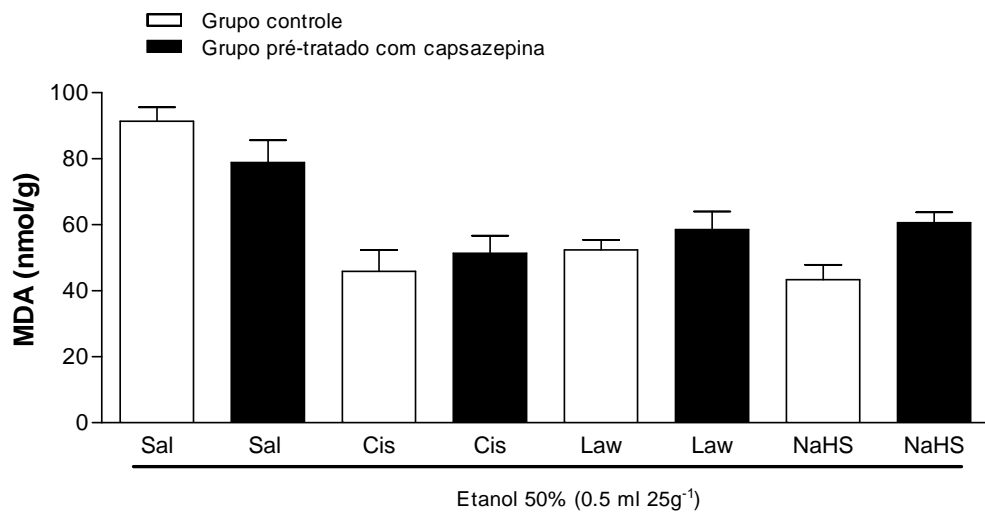




**Figura 16: O efeito protetor do H<sub>2</sub>S sobre os níveis gástricos de GSH em camundongos é mediado por receptores TRPV1.** Os animais foram pré-tratados com capsazepina (10 mg kg<sup>-1</sup>, i.p). Após 30 minutos, os animais foram tratados, por gavagem, com L-cisteína (50 mg kg<sup>-1</sup>), NaHS (150 µmol kg<sup>-1</sup>) ou reagente de Lawesson's (27 µmol kg<sup>-1</sup>). Trinta minutos depois foi administrado etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). O grupo controle recebeu somente salina. As amostras foram removidas 1 hora após o etanol. O efeito protetor da L-cisteine, NaHS ou reagente de Lawesson's sobre os níveis de GSH não foram afetados, de forma significativa, pela capsazepina. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 8 animais por grupo. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.



**Figura 17: O efeito protetor do H<sub>2</sub>S sobre os níveis gástricos de MDA em camundongos é mediado por fibras aferentes sensoriais.** Os animais foram tratados com doses neurotóxicas de capsaicina. Após 8 dias, os animais dessensibilizados foram tratados, por gavagem, com L-cisteína (50 mg kg<sup>-1</sup>), NaHS (150 μmol kg<sup>-1</sup>) ou reagente de Lawesson's (27 μmol kg<sup>-1</sup>). Trinta minutos depois foi administrado etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). O grupo controle recebeu somente salina. As amostras foram removidas 1 hora após o etanol. O efeito protetor da L-cisteine ou reagente de Lawesson's sobre o nível da glutathione foi inibido pela dessensibilização das fibras aferentes sensoriais pela capsaicina. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 8 animais por grupo. (Ψ) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com reagente de Lawesson's; (#) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com NaHS. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.



**Figura 18: O efeito protetor do H<sub>2</sub>S sobre os níveis gástricos de MDA em camundongos é mediado por receptores TRPV1.** Os animais foram pré-tratados com capsazepina (10 mg kg<sup>-1</sup>, i.p). Após 30 minutos, os animais foram tratados, por gavagem, com L-cisteína (50 mg kg<sup>-1</sup>), NaHS (150 μmol kg<sup>-1</sup>) ou reagente de Lawesson's (27 μmol kg<sup>-1</sup>). Trinta minutos depois foi administrado etanol 50% (0,5 ml 25g<sup>-1</sup>, v.o). O grupo controle recebeu somente salina. As amostras foram removidas 1 hora após o etanol. O efeito protetor da L-cisteine, NaHS ou reagente de Lawesson's sobre o a cocentração de MDA não foi afetado de forma significativa pela capsazepina. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 8 animais por grupo. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

## 5.8 Avaliação da motilidade e secreção gástrica

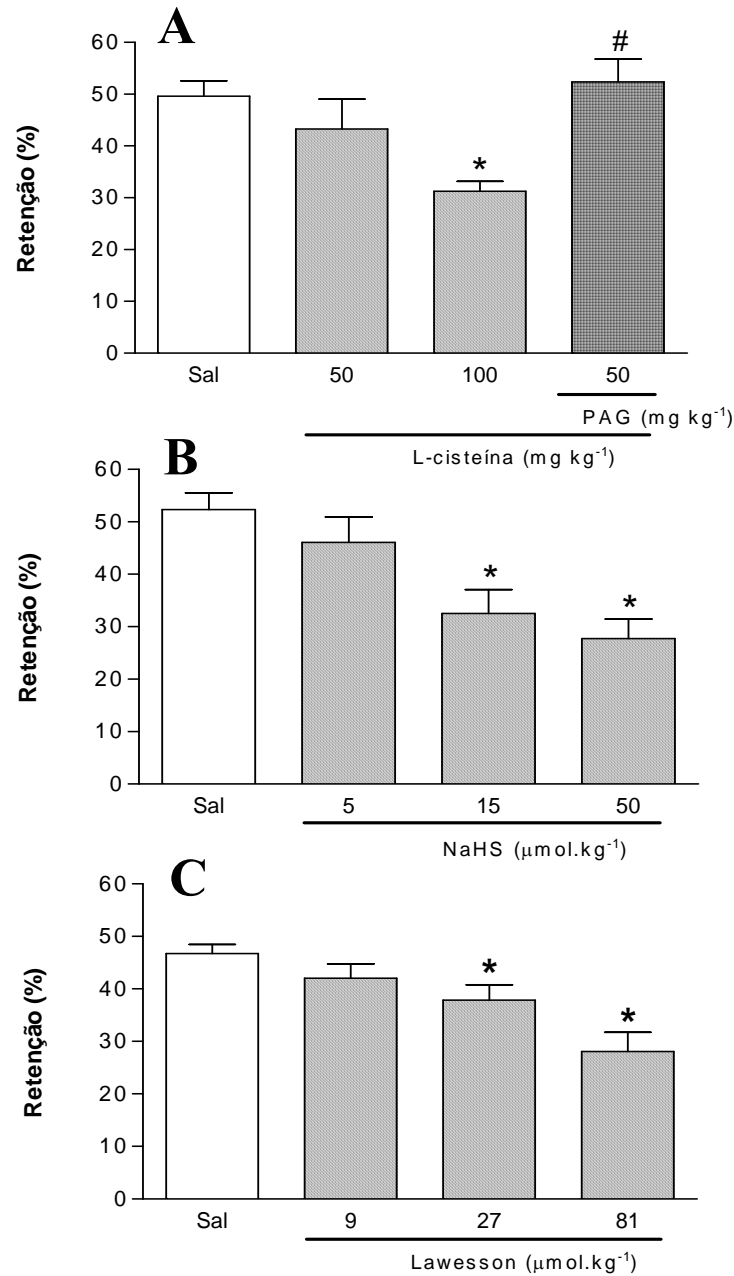
### 5.8.1 Efeito do sulfeto de hidrogênio no esvaziamento gástrico de camundongos acordados

A figura 19 mostra o efeito do tratamento da L-cisteína (painel A), NaHS (painel B) ou reagente de Lawesson's (painel C) na retenção gástrica em camundongos acordados. Podemos observar que houve uma diminuição da retenção, de forma dose-dependente, em 36,9% quando os animais foram tratados com L-cisteína ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ), 47.1% quando tratados com NaHS ( $50 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) e 39.9% quando tratados com reagente de Lawesson's ( $81 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ ). A administração de PAG, um inibidor da síntese de  $\text{H}_2\text{S}$  que bloqueia a atividade da CSE, reverte a aceleração do esvaziamento induzida por L-cisteína (figura 19, painel A).

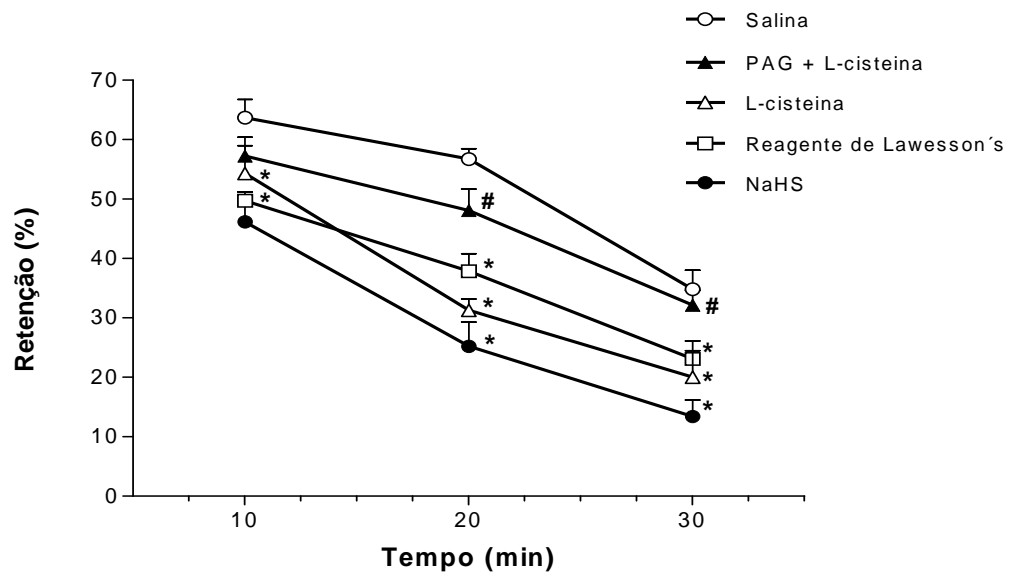
A figura 20 mostra que os doadores de  $\text{H}_2\text{S}$  (NaHS  $50 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$  ou reagente de Lawesson's  $81 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) e o precursor da síntese de  $\text{H}_2\text{S}$  (L-cisteína  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ), também diminuem a retenção gástrica em intervalos pós-prandiais de 10, 20 e 30 minutos, quando comparado com o grupo controle (apenas salina). Entretanto, a administração de PAG, reverteu o efeito da L-cisteína nos tempos de 10 e 20 minutos.

## 5.9 Efeito do sulfeto de hidrogênio na secreção gástrica de camundongos

Na tabela 2 observa-se que o tratamento com drogas que aumentam a produção de  $\text{H}_2\text{S}$  (L-cisteína, NaHS ou reagente de Lawesson's) em camundongos após 4 horas de ligadura do piloro, não ocorre alterações significativas no volume de suco gástrico, pH e total de acidez quando comparado ao grupo tratado apenas com solução salina. Por outro lado, quando pré-tratado com histamina houve um aumento do volume ( $1190 \pm 163.6$ ) e do total de acidez ( $12 \pm 0.9$ ) quando comparado com o grupo controle (salina,  $618 \pm 76.6$  e  $5.2 \pm 0.5$ , respectivamente).



**Figura 19. L-cisteína e doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS e reagente de Lawesson's) aceleram o esvaziamento gástrico em camundongos.** Os animais foram tratados com L-cisteína sozinha ou L-cisteína + PAG (painel A), NaHS (50  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ , i.p) (painel B) ou reagente de Lawesson's (81  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ , i.p) (painel C). Trinta minutos depois, os animais receberam uma refeição teste contendo um marcador não absorvível (vermelho de fenol, v.o). Após 20 minutos, os animais foram sacrificados e a avaliação do esvaziamento foi realizada por espectrofotometria. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  quando comparado ou grupo tratado apenas com salina; (#)  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com L-cisteína 100  $\text{mg kg}^{-1}$ . ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.



**Figura 20. Retenção gástrica de vermelho de fenol obtida em intervalos de 10, 20 e 30 minutos em camundongos acordados e tratados com L-cisteína ou doadores de  $H_2S$  (NaHS e reagente de Lawesson's).** Os animais foram tratados com L-cisteína ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p) sozinha ou L-cisteína + PAG (painel A), NaHS ( $50 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ , i.p) (painel B) ou reagente de Lawesson's ( $81 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ , i.p) (painel C). Trinta minutos depois, os animais receberam uma refeição teste contendo um marcador não absorvível (vermelho de fenol, v.o). Após 10, 20 ou 30 minutos, os animais foram sacrificados e a avaliação do esvaziamento foi realizada por espectrofotometria. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (\*)  $p < 0,05$  quando comparado ou grupo tratado apenas com salina; (#)  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com L-cisteína  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ . ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

**Tabela 2. Efeitos da L-cisteína ou doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS ou reagente de Lawesson's) na secreção gástrica após 4 horas de ligadura do piloro em camundongos.**

Grupo Experimental (N=6)	Volume ( $\mu$ l)	pH	Total de Acidez (mEq[H <sup>+</sup> ]/l/4 h)
Salina	618 $\pm$ 76.6	1.9 $\pm$ 0.3	5.2 $\pm$ 0.5
L-cisteína (100 mg kg <sup>-1</sup> )	565 $\pm$ 67.7	1.8 $\pm$ 0.2	6.9 $\pm$ 1.1
NaHS (50 $\mu$ mol kg <sup>-1</sup> )	492.5 $\pm$ 44.2	1.9 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 1.1
Lawesson's (81 $\mu$ mol kg <sup>-1</sup> )	594.3 $\pm$ 69.9	2.0 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.9
Histamina (5 mg kg <sup>-1</sup> )	1190 $\pm$ 163.6*	1.9 $\pm$ 0.03	12 $\pm$ 0.9*
Ranitidina	347.5 $\pm$ 91.3#	2.3 $\pm$ 0.03	3.7 $\pm$ 0.5#

Resultados expressos como média  $\pm$  e.p.m. \* $P$ <0.05, vs grupo salina; # $P$ <0.05, vs grupo salina. ANOVA e teste de Newman-Keuls.

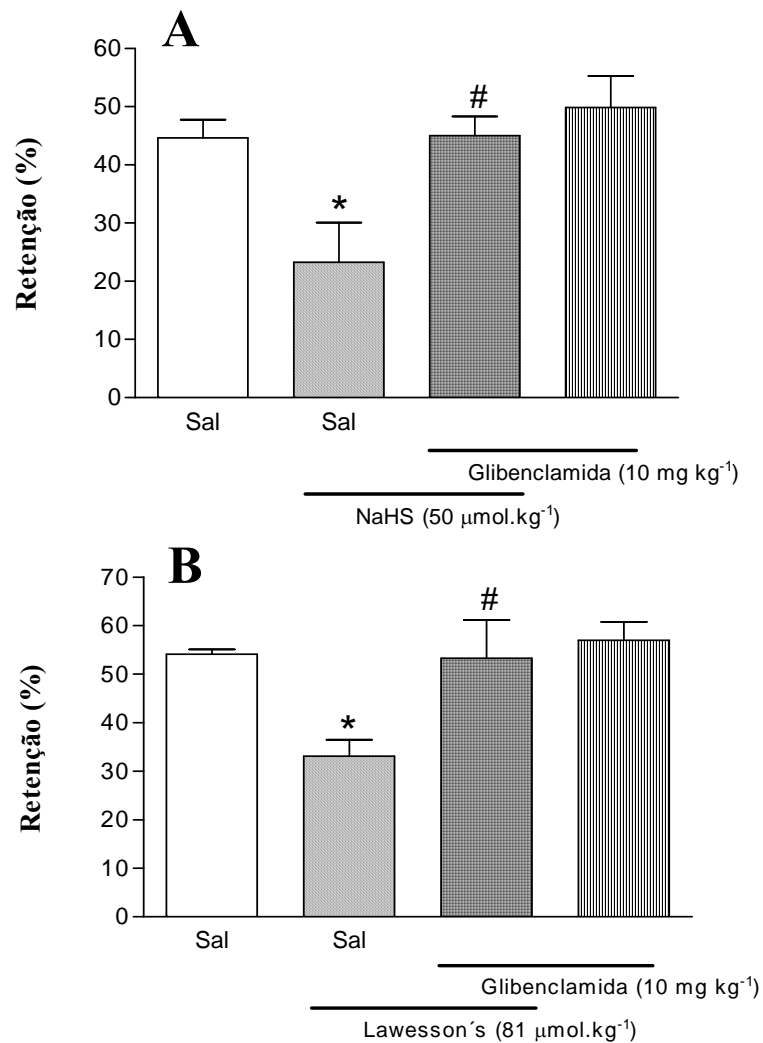
### **5.10 Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) na aceleração do esvaziamento gástrico do sulfeto de hidrogênio em camundongos**

Para avaliar o envolvimento do  $K_{ATP}$  no efeito de doadores de  $H_2S$  (NaHS ou reagente de Lawesson's) na aceleração do esvaziamento gástrico, os animais foram pré-tratados com glibenclamida ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Na figura 21, observamos que o pré-tratamento dos animais com glibenclamida, aboliu os efeitos pró-cinéticos do NaHS  $150 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$  (*painel A*) ou reagente de Lawesson's  $27 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$  (*painel B*).

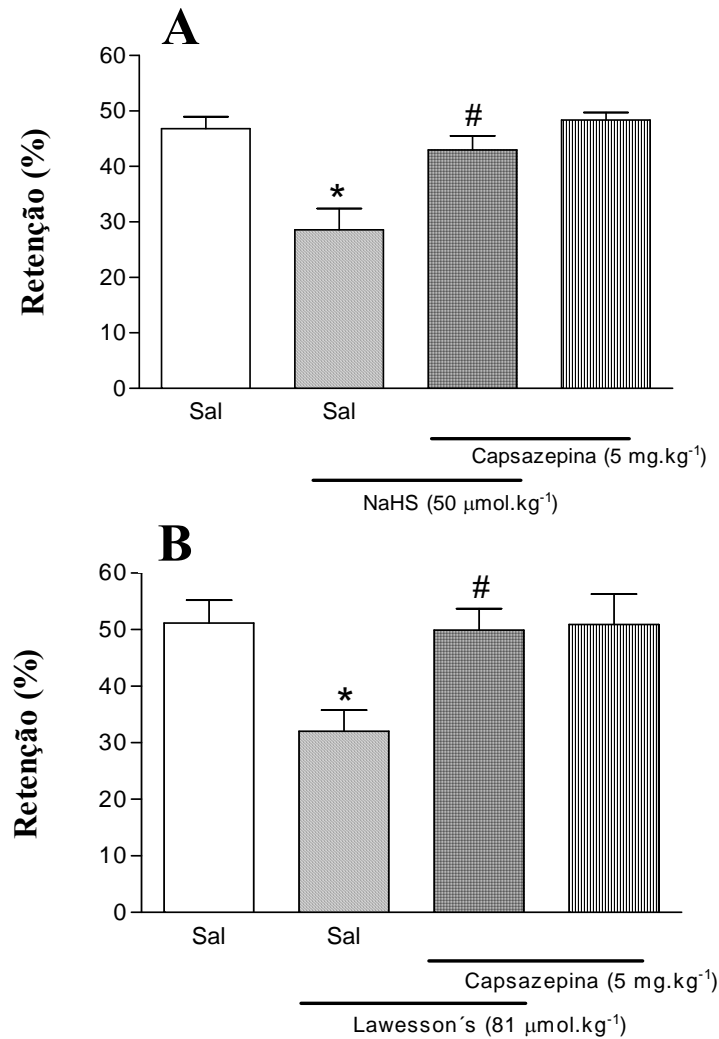
### **5.11 Participação dos receptores TRPV1 na aceleração do esvaziamento gástrico do sulfeto de hidrogênio**

A figura 22 mostra que a administração de um antagonista seletivo dos receptores TRPV1, capsazepina, suprimiu a aceleração do esvaziamento gástrico provocada por doadores de  $H_2S$  (NaHS e reagente de Lawesson's). Esses dados sugerem a participação, pelo menos em parte, dos receptores TRPV1 no efeito pró-cinético do sulfeto de hidrogênio.





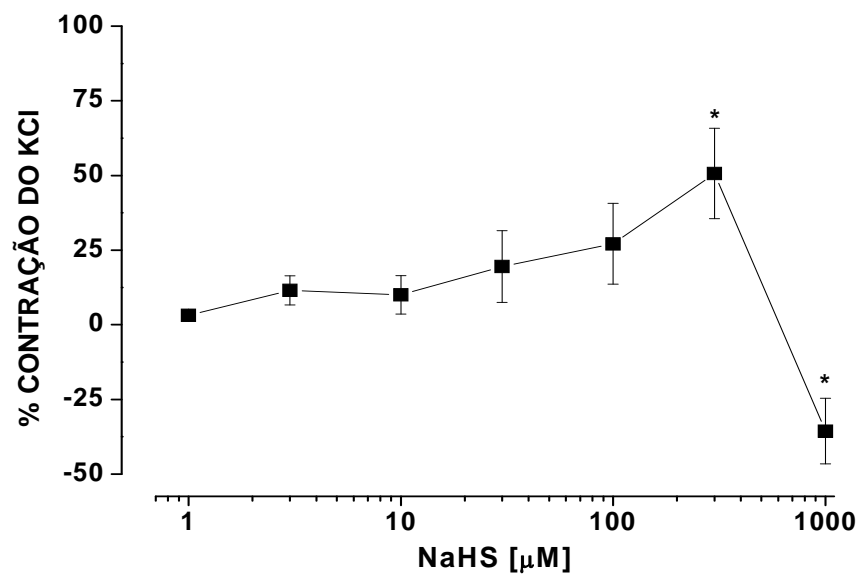
**Figura 21. Glibenclamida inibe o efeito dos doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS e reagente de Lawesson's) na aceleração do esvaziamento gástrico em camundongos.** Inicialmente os animais foram pré-tratados com glibenclamida. Após 1 hora, os animais foram tratados com NaHS (50 µmol kg<sup>-1</sup>, i.p) (painel A) ou reagente de Lawesson's (81 µmol kg<sup>-1</sup>, i.p) (painel B). Trinta minutos depois, os animais receberam uma refeição teste contendo um marcador não absorvível (vermelho de fenol, v.o). Após 20 minutos, os animais foram sacrificados e a avaliação do esvaziamento gástrico foi realizada por espectrofotometria. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (\*) p<0,05 quando comparado ou grupo tratado apenas com salina; (#) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com NaHS ou reagente de Lawesson's. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.



**Figura 22. Capsazepina inibe o efeito dos doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS e reagente de Lawesson's) na aceleração do esvaziamento gástrico em camundongos.** Inicialmente os animais foram pré-tratados com capsazepina. Após 30 minutos, os animais foram tratados com NaHS (50 µmol kg<sup>-1</sup>, i.p) (painel A) ou reagente de Lawesson's (81 µmol kg<sup>-1</sup>, i.p) (painel B). Trinta minutos depois, os animais receberam uma refeição teste contendo um marcador não absorvível (vermelho de fenol, v.o). Após 20 minutos, os animais foram sacrificados e a avaliação do esvaziamento gástrico foi realizada por espectrofotometria. Os resultados estão expressos pela média ± EPM de pelo menos 5 animais por grupo. (\*) p<0,05 quando comparado ou grupo tratado apenas com salina; (#) p<0,05 quando comparado ao grupo tratado com NaHS ou reagente de Lawesson's. ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls.

### 5.12 Efeito do NaHS (DOADOR de H<sub>2</sub>S) na contratilidade do fundo gástrico de camundongos

Podemos verificar na figura 23 que o NaHS promoveu contração o qual teve valor máximo de  $27,21 \pm 13,54$  % (100  $\mu$ M de NaHS) e  $50,63\% \pm 15,14$  (300  $\mu$ M de NaHS) em relação à contração controle de KCl. Entretanto, em concentração maiores (1000  $\mu$ M) o NaHS apresentou efeito relaxante, o que mostra um possível efeito duplo do H<sub>2</sub>S na musculatura lisa do fundo gástrico.



**Figura 23. Efeito do NaHS (doador de H<sub>2</sub>S) na contratilidade espontânea do fundo gástrico em camundongos.** Após a retirada de tiras longitudinais do fundo do estômago de camundongos, o tecido foi montado em uma câmara muscular contendo solução fisiológica. Como grupo controle utilizou-se inicialmente uma solução contraturante de KCl (contração correspondente a 100%). Após lavagem o NaHS foi adicionado cumulativamente. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  EPM de pelo menos 4 animais por grupo. (\*) p quando comparado ou grupo tratado apenas com KCl. ANOVA, seguido pelo teste Newman-Keuls.

## 6 DISCUSSÃO

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

O modelo de lesão gástrica induzido por etanol é um dos principais modelos de lesão gástrica utilizados em pesquisa. O modelo de injúria gástrica induzida por etanol provoca as lesões por solubilização do muco protetor e desta forma a mucosa fica indefesa à ação hidrolítica e proteolítica do ácido clorídrico e da pepsina, respectivamente. O contato com o etanol também leva ao aumento da secreção ácida e alteração da rede vascular local, por rompimento dos vasos sanguíneos que irrigam a mucosa gástrica (OATES; HAKKINEN, 1988). Similarmente, o etanol pode interferir no movimento do intestino, contribuindo para a diarreia (BODE; BODE, 1997).

Hoje, podem-se obter benefícios clínicos no tratamento da gastrite ou úlcera péptica com o uso de diversas classes de drogas, como os antiácidos e antissecretógenos. Contudo o tratamento da gastropatia alcoólica permanece limitado a medidas de suporte ou simplesmente no ato de parar de beber. Indubitavelmente, a terapia eficaz para impedir a gastropatia alcoólica poderia ser conseguida investigando os mecanismos subjacentes que contribuem para a lesão da mucosa gástrica ou a correção de falhas induzidas pelo etanol (LEE *et al.*, 2005). Conseqüentemente, sinalizar as moléculas preferencialmente envolvidas na gastropatia alcoólica poderia ser um alvo final para a prevenção dessa enfermidade, podendo ser mais valioso do que a simples abstinência ou o uso de bloqueadores da secreção ácida gástrica. Portanto, a busca de substâncias que diminuam esses efeitos provocados pelo etanol é de suma importância para a sociedade e a farmacoterapia, no momento, é a única forma de tratamento que pode realçar os mecanismos de defesa da mucosa gástrica. Baseado nisso, o nosso trabalho teve como objetivo inicial determinar o efeito gastroprotetor de drogas que são substrato para síntese de H<sub>2</sub>S (L-cisteína) ou de doadores diretos de H<sub>2</sub>S (NaHS ou reagente de Lawesson's) sobre a lesão gástrica induzida por etanol em camundongos, bem

como estudar a participação dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina, receptores TRPV1 ou canais de  $K_{ATP}$  sobre o efeito gastroprotetor do  $H_2S$ .

Nossos dados confirmam que a administração de etanol 50% induz uma importante lesão gástrica hemorrágica. É bem conhecido que a administração de etanol em altas concentrações causa extensas lesões na mucosa gástrica, envolvendo extensas hemorragias e destruição de tecido (LACY, 1988). Além disso, o etanol induz distúrbios da microcirculação, isquemia, liberação de endotelina, degranulação de mastócitos, inibição de prostaglandinas e diminuição da produção de muco (SAMONINA *et al.*, 2004). O termo “gastrite hemorrágica” é usado para descrever o aparecimento de hemorragias subepiteliais no estômago e pacientes com gastrite hemorrágica subepitelial podem ter também gastrite histológica associada. Fisiopatologicamente, a lesão gástrica provocada pelo etanol é mediada ou modulada por diversos fatores tais como a cicloxigenase, lipoxigenase, citocinas, tromboxanos e radicais livres derivados do oxigênio (TARNAWISKI *et al.*, 1998).

Histologicamente, o nosso trabalho mostrou que o etanol 50% provocou hemorragia, edema e perda de células epiteliais. Esses resultados estão de acordo com outros autores que mostram que o etanol provoca, microscopicamente, hemorragias subepiteliais focais na mucosa gástrica e que esses efeitos são devidos diretamente a sua ação tóxica e indiretamente causados por mediadores como COX, citocinas, radicais livres e outras moléculas de sinalização provocando inflamação ou apoptose ou pela redução do fluxo sanguíneo gástrico (GOTTFRIED *et al.*, 1978; LEE *et al.*, 2005; SZABO *et al.*, 1985). Além disso, o etanol promove a peroxidação de lipídios e a ativação de NF- $\kappa$ B que são eventos críticos responsáveis pela hemorragia e edema nas células musculares lisas e endoteliais (ALTURA; GEBREWOLD, 2002; JONSSON; PALMBLAD, 2001). No nosso estudo, não houve migração de células inflamatórias para a mucosa gástrica, provavelmente devido ao curto tempo de lesão (1 hora). Porém, Lieber (1997) e Lee *et al.* (2005) mostraram que a administração de etanol aumenta a resposta inflamatória juntamente com infiltração de células inflamatórias para a mucosa gástrica. Assim a proteção histológica e a proteção da integridade vascular são os dois principais critérios de gastroproteção (KO *et al.*, 1997).

Apesar de há muito tempo ser reconhecido como poluente ambiental, o  $H_2S$  tem sido cada vez mais caracterizado como um importante mediador em vários processos fisiológicos. Já foi demonstrado que o  $H_2S$  pode atuar como neuromodulador (WANG, 2002)

e como regulador endógeno da inflamação aguda (ZANARDO *et al.*, 2006; Dal SECCO *et al.*, 2008) e da dor (CUNHA *et al.*, 2008). Também foi demonstrado que o H<sub>2</sub>S contribui para manutenção da integridade da mucosa gástrica na lesão provocada por AINEs (FIORUCCI *et al.*, 2005). Assim, no presente estudo nós, inicialmente, avaliamos o efeito protetor do H<sub>2</sub>S na lesão gástrica induzida por etanol e a participação dos neurônios aferentes primários, receptores TRPV1 e canais de K<sub>ATP</sub> neste efeito.

O nosso estudo demonstrou que o tratamento com doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS ou o reagente de Lawesson's) ou com o precursor da síntese de H<sub>2</sub>S (L-cisteína) reduziram, de maneira dose-dependente, as lesões macroscópicas causadas por etanol 50% na mucosa gástrica, bem como diminuiu a extensão da lesão gástrica microscópica. Entretanto a pré-administração de PAG (inibidor irreversível da CSE) aboliu a gastroproteção da L-cisteína sobre a lesão induzida por etanol 50%. Esses resultados são consistentes com a hipótese de que o efeito gastroprotetor da L-cisteína está correlacionado com o aumento da síntese de H<sub>2</sub>S. Portanto, a partir desses estudos podemos inferir que o H<sub>2</sub>S é essencial para proteção da mucosa gástrica contra o etanol.

Está bem descrito na literatura que a fisiopatologia da lesão da mucosa gástrica induzida pelo etanol está relacionada à liberação de mediadores inflamatórios, que induzem a ativação de granulócitos com a formação de proteases e radicais livres, bem como uma diminuição do fluxo sanguíneo gástrico, provocando isquemia da mucosa gástrica, morte celular e dano gástrico (TEYSEN; SINGER, 2003). O papel de H<sub>2</sub>S sobre a migração de leucócitos é controverso. Existem provas de que ele inibe a aderência de leucócito à célula endotelial (FIORUCCI *et al.*, 2006; ZANARDO *et al.*, 2006). Porém, também há indícios de que pode aumentar a migração de neutrófilos (Dal-SECCO *et al.*, 2008). Esse efeito do H<sub>2</sub>S sobre a migração de leucócitos não elucida o efeito gastroprotetor do H<sub>2</sub>S em nossos modelos, pois não observamos um aumento na infiltração de células inflamatórias após administração de etanol. Assim, é possível que esse efeito gastroprotetor do H<sub>2</sub>S pode estar relacionado a um aumento do fluxo sanguíneo gástrico, porque foi demonstrado que H<sub>2</sub>S melhora o fluxo sanguíneo gástrico no estômago durante a gastropatia induzida por AINEs (FIORUCCI *et al.*, 2005).

É também possível que o efeito protetor do H<sub>2</sub>S esteja relacionado à diminuição do estado redox na gastropatia induzida etanol. Portanto, neste estudo, nós também

investigamos o papel da glutathione (GSH) na proteção gástrica do H<sub>2</sub>S sobre lesão provocada pelo etanol. A administração de etanol 50%, em nossos experimentos, diminuiu consideravelmente o nível gástrico de GSH, provavelmente devido ao consumo destes pelos radicais livres. Nossos resultados mostraram que a administração de L-cisteína e doadores de H<sub>2</sub>S revertem à diminuição dos níveis gástricos de GSH após a administração de etanol. De fato, há uma associação entre a glutathione e síntese H<sub>2</sub>S, considerando que a L-cisteína é um substrato comum para ambos os processos (WALLACE *et al.*, 2007). Portanto, poderíamos inferir que o efeito gastroprotetor da L-cisteína pode ser explicado, em parte, pelo aumento na concentração de GSH. Entretanto, Wallace *et al.* (2007) demonstraram que a administração de L-cisteína não aumentou os níveis de glutathione na mucosa gástrica. Assim, outra possibilidade é que o aumento nos níveis de GSH no estômago poderia ser secundário a uma diminuição na produção de radicais livres. Nossos resultados realmente demonstraram que a administração de L-cisteína ou de doadores de H<sub>2</sub>S resultou em uma diminuição significativa nas concentrações de malondialdeído (MDA) na mucosa de camundongos tratados com etanol. De fato, os produtos da peroxidação lipídica, como o MDA, podem ser utilizados como indicadores da ação dos radicais livres no organismo (DEL RIO *et al.*, 2005). Deste modo, o mecanismo pelo qual o H<sub>2</sub>S exerce seu efeito gastroprotetor parece envolver a redução da peroxidação lipídica induzida por instilação de etanol. Nossos dados estão de acordo com outros autores que mostram que o etanol depleta o nível de glutathione nos tecidos do estômago e que a restauração parece ser importante na gastroproteção (OLIVEIRA *et al.*, 2004; SZABO *et al.*, 1981). Smith *et al.* (1996) também demonstrou que o efeito lesivo do etanol no estômago é diminuído pelo aumento da concentração de glutathione. A mucosa gástrica possui uma alta concentração basal de glutathione, que funciona como um antioxidante (MUTOH *et al.*, 1990). A glutathione é um tripeptídeo que possui função protetora contra agentes agressores, eliminando radicais livres endógenos derivados do oxigênio. Vários estudos têm demonstrado que a glutathione possui um importante papel na defesa da mucosa gástrica (SZABO *et al.*, 1981; BOYD *et al.*, 1981). Assim, diversas substâncias conhecidas por causar lesão na mucosa gástrica foram associadas à diminuição dos níveis de glutathione, provocando injúrias e um dos principais mecanismos de gastroproteção é aumentar a concentração de glutathione.

O passo seguinte do nosso trabalho foi investigar a possível participação dos canais de potássio ATP-dependentes (K<sub>ATP</sub>) no efeito protetor do H<sub>2</sub>S sobre a lesão gástrica induzida por etanol. Recentemente, Peskar e colaboradores (2002) demonstraram a

participação dos canais de  $K_{ATP}$  em vários modelos de proteção gástrica, como 16,16-prostaglandina dimetil E2, etanol 20%, salicilato de sódio, dimercaprol e dietilmaleato, com a glibenclamida inibindo a proteção por esses compostos (PESKAR *et al.*, 2002). Medeiros e colaboradores (2008) mostraram que o sildenafil protege a gastropatia induzida por etanol absoluto, em parte devido a abertura dos canais de  $K_{ATP}$  (MEDEIROS *et al.*, 2008) e Akar e colaboradores mostraram que o diazóxido inibiu a lesão gástrica induzida por indometacina em ratos, com a glibenclamida revertendo essa proteção (AKAR *et al.*, 1999). Entretanto, o papel dos canais de  $K_{ATP}$  na proteção gástrica a lesões induzidas por etanol não está completamente elucidado. Usando como ferramenta farmacológica a glibenclamida (um bloqueador dos canais de  $K_{ATP}$ ), nós demonstramos que o efeito protetor do  $H_2S$  na lesão gástrica induzida por etanol 50% é mediado, em parte, pela abertura dos canais de  $K_{ATP}$ .

Tem sido postulado que os canais de  $K_{ATP}$  estão envolvidos em uma variedade de funções fisiopatológicas no estômago tais como: regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido gástrico e contratilidade da musculatura gástrica. A capacidade da glibenclamida de alterar a resposta de algumas drogas tem sido aceita como evidência para sugerir o envolvimento dos  $K_{ATP}$  nos eventos biológicos (STANDEN *et al.*, 1989). Nossos estudos evidenciaram que a glibenclamida reverte, de forma dose-dependente, o efeito protetor do  $H_2S$ . Outros estudos demonstram claramente que muitos efeitos do  $H_2S$ , incluindo vasodilatação, inibição da aderência de leucócitos (FIORUCCI *et al.*, 2006), analgesia (DISTRUTTI *et al.*, 2006), e inibição da formação de edema são devidos à estimulação dos  $K_{ATP}$ . No nosso trabalho, mostramos que glibenclamida reverteu o efeito protetor da L-cisteína e dos doadores de  $H_2S$  (NaHS e reagente de Lawesson's) sobre o desenvolvimento da lesão gástrica induzida por etanol. Fiorucci *et al.* (2005) também observaram que a inibição do efeito do  $H_2S$  por glibenclamida contribui para uma aumento dos danos gástricos induzido por AINEs, sugerindo um envolvimento dos canais de  $K_{ATP}$  nos efeitos gastroprotetores do  $H_2S$ . Em contraste, Wallace *et al.* (2007) demonstraram que a ativação de canais de  $K_{ATP}$  por pinacidil não produziu qualquer efeito benéfico sobre a cicatrização de úlceras, como observado no caso de doadores de  $H_2S$ . Além disso, a glibenclamida não afetou a cicatrização de úlceras induzida por doadores de  $H_2S$  (WALLACE *et al.*, 2007). Assim, estes autores mostraram que o  $H_2S$  possui um papel significativo para a cicatrização de úlceras gástricas, sendo que este efeito pode estar relacionado à ação vasodilatadora do  $H_2S$  e que esse efeito não é mediado por canais de  $K_{ATP}$ . Baseados nos nossos resultados, podemos inferir que o efeito gastroprotetor do  $H_2S$  contra a lesão por etanol é, pelo menos em parte, dependente de ativação dos canais de  $K_{ATP}$ .



Nós evidenciamos ainda que a glibenclamida induziu uma diminuição no nível gástrico de glutathiona (GSH) e aumento na concentração de malondialdeído (MDA), indicando, respectivamente, que ela aumentou a produção de radicais livres e a peroxidação de lipídios. Portanto, a glibenclamida reverteu o efeito gastroprotetor do H<sub>2</sub>S na lesão por etanol sobre os níveis de GSH e de MDA. Outra possibilidade é que a glibenclamida poderia induzir uma diminuição do fluxo sanguíneo gástrico e dessa forma aumentar as lesões na mucosa gástrica induzidas por etanol. Akar *et al.* (1999) demonstraram que o diazóxido reduziu a lesão gástrica na mucosa gástrica de ratos tratados com indometacina, e que o relaxamento de artérias gástricas pré-contraídas pela noradrenalina induzida por diazóxido foi revertido pela glibenclamida. Então, estes autores sugeriram que os canais de K<sub>ATP</sub> possuem uma função importante na manutenção da integridade da mucosa gástrica pelo aumento da perfusão gástrica e da regulação de neutrófilos (AKAR *et al.*, 1999). Foi sugerido também que os canais de K<sub>ATP</sub> possuem um papel na produção de radicais livres induzidos por neutrófilos em tecidos lesados (PIEPER; GROSS, 1992) e que a glibenclamida reverteu o efeito protetor do LPS na determinação do nível de glutathiona (GOMES *et al.*, 2006). Isso sugere que a glibenclamida ao reverter o efeito protetor do H<sub>2</sub>S na gastropatia por álcool, também pode ter aumentado a liberação de radicais livres e conseqüentemente isso resultou em uma diminuição dos níveis de glutathiona. A ativação dos canais de K<sub>ATP</sub> poderia oferecer mecanismos protetores a injúrias por inibição da ativação de neutrófila e subseqüente diminuição do consumo de glutathiona, como conseqüência da diminuição da produção de radicais livres por estes leucócitos.

A glibenclamida é um agente hipoglicemiante oral que estimula a secreção de insulina pelo bloqueio dos canais de K<sub>ATP</sub> (Da SILVA-SANTOS *et al.*, 2002). O nível de glicose no sangue desempenha um papel crítico no desenvolvimento de lesões gástricas (TAKEUCHI *et al.*, 1994). Neste estudo, a glibenclamida foi administrada em uma solução de 2,5 ml/kg de NaOH 0,02 N contendo glicose 4%, para minimizar a hipoglicemia. Nosso grupo de pesquisa já tinha demonstrado previamente que a glibenclamida com este tratamento não altera o nível de glicose no sangue, em comparação com solução salina (GOMES *et al.*, 2006). Deste modo, podemos concluir que a diminuição dos efeitos gastroprotetores da L-cisteína ou dos doadores de H<sub>2</sub>S pela glibenclamida não é dependente de hipoglicemia.

Neurônios aferentes contendo neuropeptídeos estão presentes em abundância na mucosa gástrica (STERNINI *et al.*, 1987). Diversos trabalhos mostram que a ativação de neurônios aferentes por baixas doses de capsaicina exerce proteção contra uma variedade de agentes ulcerogênicos (HOLZER, 1998; EHRLICH *et al.*, 2004). Entretanto, altas doses de capsaicina provocam desnervação dos neurônios aferentes com piora da defesa da mucosa gástrica a agressões. No contexto do trato gastrointestinal, pouco é conhecido sobre os efeitos do H<sub>2</sub>S no sistema nervoso entérico. Trabalhos anteriores demonstraram que o H<sub>2</sub>S pode atuar nos neurônios entéricos. Schicho *et al.* (2006) observaram que em cobaias e humanos, os neurônios entéricos expressam CSE e CBS, fornecendo evidências que os neurônios entéricos são capazes de sintetizar H<sub>2</sub>S. Estes autores também demonstraram que o H<sub>2</sub>S atua como um secretagogo no cólon de cobaias e seres humanos, envolvendo a ativação de fibras nervosas sensíveis à capsaicina e de receptores TRPV1.

É também sabido que o TRPV1 é um receptor integrador de vários estímulos dolorosos e desempenha um papel crucial nos distúrbios motores e sensoriais do TGI (GEPETTI; TREVISANI, 2004). Nossos resultados sugerem que o efeito protetor do H<sub>2</sub>S na mucosa gástrica é dependente dos neurônios aferentes sensoriais sensíveis à capsaicina e da ativação dos receptores TRPV1. Assim, nossos resultados mostram que a dessensibilização dos neurônios aferentes por doses neurotóxicas de capsaicina e o pré-tratamento com capsazepina (antagonista dos receptores TRPV1) aboliu o efeito protetor do H<sub>2</sub>S sobre a lesão gástrica provocada pelo etanol.

É bem conhecido que a ativação dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina protege a mucosa gástrica da lesão por agentes irritantes, ao passo que a ativação e abertura dos canais K<sub>ATP</sub> previnem os danos na mucosa gástrica induzida por etanol. No entanto, a interação entre neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina e a ativação de K<sub>ATP</sub> ainda não foi totalmente elucidada. Bratz *et al.* (2008) mostraram que os canais TRPV1 são funcionalmente expressos nos vasos e que eles medeiam a vasodilatação endotélio-dependente através de um mecanismo que não envolve os canais de K<sub>ATP</sub>. Tanto os canais de K ATP-dependentes quanto os canais de K ativado por cálcio têm sido implicados na mediação do relaxamento induzido pelo peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) em uma grande variedade de leitos vasculares. Foi demonstrado que a glibenclamida antagoniza o CGRP na artéria mesentérica (NELSON *et al.*, 1990) e no leito vascular pulmonar (HOOD *et al.*, 1991), sugerindo o envolvimento dos canais de K<sub>ATP</sub>. Outra

possibilidade é que os canais de  $K_{ATP}$  e os receptores TRPV1 são co-expressos nos neurônios primários aferentes estando envolvidos na proteção gástrica. Chi *et al.* (2007) mostraram que a ativação dos canais de  $K_{ATP}$  pode desempenhar um papel importante na reversão da excitabilidade produzida por agentes pró-inflamatórias, tais como prostaglandina E2 (PGE2), nos neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina. Rodrigues e Duarte (2000) também sugerem que o efeito antinociceptivo periférico da morfina pode resultar da ativação dos canais de  $K_{ATP}$ , o que pode causar uma hiperpolarização dos terminais periféricos do neurônio primário aferentes, levando a uma diminuição do potencial de ação.

Em resumo, nossos resultados indicam que o  $H_2S$  diminui a lesão gástrica causada por etanol e, embora possam existir muitos mecanismos envolvidos neste efeito, nossos dados sugerem que a ativação dos canais de  $K_{ATP}$ , dos neurônios aferentes e dos receptores TRPV1 é de importância primordial. Estas observações também levantam a possibilidade de que agentes que aumentem a produção/liberação de  $H_2S$  possam ser usados para melhorar a resistência da mucosa gástrica à injúria induzida por etanol.

Como discutido anteriormente, o  $H_2S$  está envolvido em muitas funções fisiológicas incluindo processos imunes e inflamatórias (ZANARDO *et al.*, 2006; DAL SECCO *et al.*, 2008), percepção e mediação da dor (DISTRUTTI *et al.*, 2005; CUNHA *et al.*, 2008) bem como o controle da integridade da mucosa gástrica (FIORUCCI, 2005). Além disso, trabalhos recentes mostram que o  $H_2S$  é importante para manutenção do tônus vascular e relaxamento do músculo do TGI (TEAGUE *et al.*, 2002; GALLEGO *et al.*, 2008, ZHAO *et al.*, 2009). Baseado nisso, e em face à carência de dados na literatura sobre o efeito do  $H_2S$  na motilidade, neste estudo nós também investigamos o efeito do  $H_2S$  sobre o controle da motilidade gástrica, sobretudo no esvaziamento gástrico de líquidos em camundongos acordados. Posteriormente, estudamos a influência dos canais de  $K_{ATP}$  e dos receptores TRPV1 neste efeito.

A determinação do esvaziamento gástrico, com base na retenção fracional de corante, tem sido amplamente utilizado por outros autores (GONDIM *et al.*, 1999; GONDIM *et al.*, 2001) e permite avaliar a motilidade gástrica e intestinal em animais acordados (SANTOS *et al.*, 2007), evitando os efeitos da anestesia sobre as funções cardiovasculares e autonômicas, e assim se aproximando do cenário clínico.

Nossos resultados demonstraram que os doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS e reagente de Lawesson's) e o precursor da sua síntese (L-cisteína) aceleram o esvaziamento gástrico de líquidos em camundongos acordados. Assim, podemos inferir que o H<sub>2</sub>S possui um efeito prócinético na motilidade gástrica. Outra possibilidade para esse efeito prócinético seria um efeito inespecífico dos doadores de H<sub>2</sub>S ou L-cisteína. No entanto, isso não parece estar correto, visto que a administração de um inibidor da CSE (propargilglicina, PAG) reverteu o efeito de L-cisteína no esvaziamento gástrico. Além disso, uma vez que o teste do vermelho de fenol é pH-dependente, uma eventual alteração da secreção gástrica induzida por doadores de H<sub>2</sub>S ou L-cisteína poderia influenciar a avaliação do esvaziamento gástrico (SCARPIGNATO *et al.*, 1980). Mas essa última hipótese também não é verdadeira, tendo em vista que nós demonstramos que a L-cisteína ou doadores H<sub>2</sub>S não alteram o volume de suco gástrico, pH ou total de acidez quando comparado com o grupo controle (ver tabela 1). Estes últimos resultados estão de acordo com a literatura, já que foi demonstrado que o tratamento com reagente de Lawesson's não afetou significativamente a secreção de ácido gástrico em relação aos animais tratados apenas com veículo (WALLACE *et al.*, 2007).

Dados da literatura demonstraram que a CSE e CBS são constitutivamente expressas na mucosa gástrica de ratos (WALLACE *et al.*, 2007). Outros autores também demonstraram que o H<sub>2</sub>S pode provocar relaxamento da musculatura gastrintestinal (ZHAO *et al.* 2009; GALLEGO *et al.*, 2008). Entretanto, estudos sobre os efeitos do H<sub>2</sub>S na motilidade gastrintestinal *in vivo* são escassos. Nosso trabalho é o primeiro a relatar que o H<sub>2</sub>S acelera o esvaziamento gástrico de líquidos em camundongos. Este efeito pode ser devido a uma diminuição da complacência gástrica e/ou uma diminuição da resistência antro-duodenal. No nosso trabalho, mostramos que o NaHS possui efeito na contratilidade espontânea do fundo gástrico, causando relaxamento em altas concentrações e contração em baixas doses (< 300 µM). Estes dados contradizem, em parte, os estudos de Dhaese e Lefebvre (2009) que demonstraram que o NaHS causa relaxamento em tiras, pré-contraídas, de fundo gástrico de camundongos (DHAESE; LEFEBVRE, 2009). Assim, parece que a acomodação gástrica não é o principal fator envolvido no efeito do H<sub>2</sub>S na motilidade gástrica. Por outro lado, Zhao *et al.* (2009) mostraram que o NaHS em concentrações de 0,3-1,0 mM suprimiu a amplitude da contração muscular espontânea no antro gástrico e Teague *et al.* (2002) demonstraram que o NaHS produz relaxamento do intestino delgado de coelhos. Portanto, em conjunto, poderíamos propor que o H<sub>2</sub>S pode diminuir a resistência antro-duodenal, o que poderia explicar o seu efeito sobre acelerar o esvaziamento gástrico.

Nossos resultados também mostraram que a glibenclamida, um antagonista dos canais de  $K_{ATP}$ , reverte o efeito prócinético dos doadores de  $H_2S$  na motilidade gástrica. Como comentados anteriormente, vários estudos têm mostrado que  $H_2S$  ativa canais de  $K_{ATP}$ . No estômago, foi demonstrado que a glibenclamida reverte, parcialmente, a diminuição da amplitude da contração espontânea induzida por NaHS no músculo liso do antro (ZHAO *et al.*, 2009). No entanto, em tiras de fundo gástrico, os bloqueadores dos canais de K como glibenclamida, apamina, 4-aminopiridina e cloreto de bário não tiveram nenhuma influência sobre o relaxamento induzido por NaHS (DHAESE; LEFEBVRE, 2009). No intestino delgado, Teague *et al.* (2002) demonstraram que o efeito inibitório do NaHS no íleo de cobaia não foi afetada pelo pré-tratamento com glibenclamida. Portanto, poderia ser plausível supor que a ativação dos canais de  $K_{ATP}$  por doadores  $H_2S$  pode relaxar o músculo liso do antro e do duodeno, e com isso diminuir a resistência antro-duodenal, o que poderia acelerar o esvaziamento gástrico.

Estudos anteriores no músculo da bexiga urinária (PATACCINI *et al.*, 2005), na secreção intestinal (SCHICHO *et al.*, 2006) e nossos dados de defesa da mucosa gástrica sugerem que os neurônios aferentes sensoriais sensíveis à capsaicina participam dos efeitos do  $H_2S$  nestes tecidos. Baseado nisto, nós hipotetizamos que os receptores TRPV1 poderiam estar envolvidos no efeito prócinético do  $H_2S$ . Nossos resultados demonstraram que a aceleração do esvaziamento gástrico induzida por doadores de  $H_2S$  é, em parte, abolida por capsazepina, um antagonista dos receptores TRPV1. A via dependente de TRPV1, que consiste de neurônios aferentes taquinérgicos sensíveis à capsaicina e de neurônios nitrérgicos mioentericos, têm mostrado influenciar negativamente as contrações musculares estriadas mediadas vagalmente no TGI (BOUDAKA *et al.*, 2007). No estômago, nós mostramos anteriormente que o prétratamento com capsazepina aboliu os efeitos gastroprotetores da L-cisteína, NaHS, ou reagente Lawesson's na lesão gástrica induzida por etanol. Por outro lado, Gallego *et al.* (2008), utilizando camundongos deficientes para TRPV1, mostrou que os efeitos do relaxamento produzido pelo NaHS no jejuno e cólon de ratos eram praticamente idênticos aos controles do tipo selvagem. Por fim, eles sugerem que outros mecanismos poderiam estar envolvidos neste efeito.

Os neurônios entéricos do trato gastrintestinal são contactados por neurônios aferentes primários de origem espinhal e vagal (MAZZIA; CLERC, 1997). Diversos

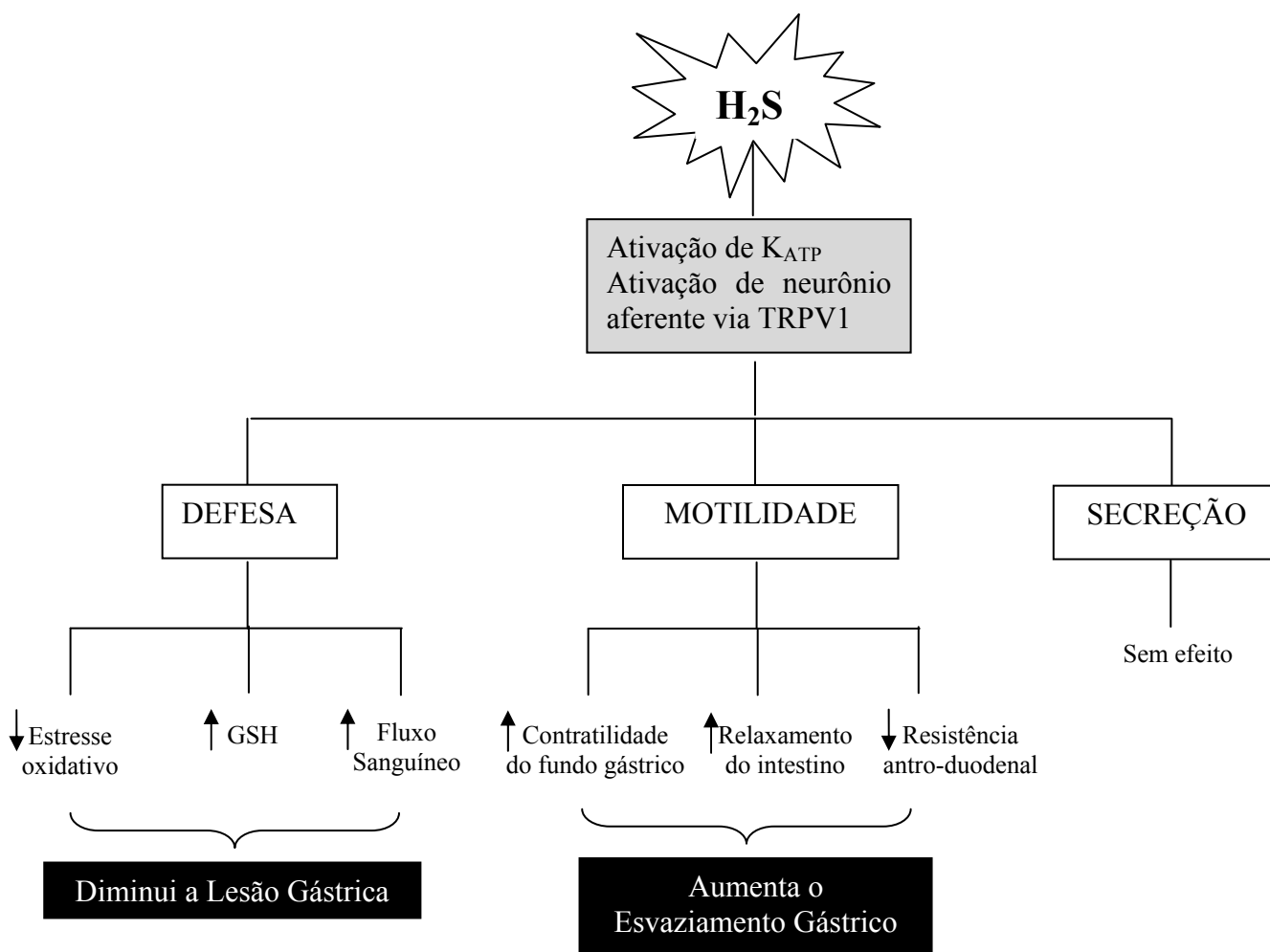
pesquisadores observaram que o tratamento crônico com capsaicina (para dessensibilizar os neurônios aferentes sensíveis à capsaicina) não afeta a propulsão gastrointestinal em estados fisiológicos, enquanto que pode reduzir a inibição do trânsito gastrointestinal devido ao trauma cirúrgico ou a administração peritoneal (HOLZER, 1986; HOLZER *et al.*, 1987). Um número substancial desses neurônios aferentes primários é imunorreativo para o receptor TRPV1 (HOLZER, 1991). Esses neurônios podem modular a motilidade gastrointestinal, transmitir sinais provenientes do trato gastrointestinal para o sistema nervoso central e pode simultaneamente liberar transmissores capazes de afetar a neurotransmissão entérica (HOLZER, 1991). Campos *et al.* (2008) mostram que a gastroproteção por flavonas contra a lesão gástrica induzida por etanol ou indometacina pode ocorrer por mecanismos diferentes e complementares, que incluem a participação de prostaglandinas endógenas, liberação de óxido nítrico, e ativação do receptor TRPV1 ou canais  $K_{ATP}$ . Nós também sugerimos que os canais de  $K_{ATP}$  e os receptores TRPV1 são co-expressos em neurônios aferentes primários, estando envolvidos na proteção gástrica do  $H_2S$ . Em outros modelos, Bratz *et al.* (2008) mostraram que os receptores TRPV1 são funcionalmente expressos nos vasos e medeiam a vasodilatação endotélio-dependente através de um mecanismo envolvendo óxido nítrico e possivelmente canais de  $K_{ATP}$ . Estes resultados confirmam que há uma relação entre o TRPV1 e  $K_{ATP}$ , sugerindo sua aplicação em diferentes condições.

Por fim, nossos resultados indicam que  $H_2S$  acelera o esvaziamento gástrico de líquidos em camundongos acordados. Embora existam vários mecanismos através dos quais este efeito pode ocorrer, nossos dados suporta a hipótese de que a ativação dos canais de  $K_{ATP}$  e a via neurônios aferentes/TRPV1 são de primordial importância.

Após a identificação do NO e CO como uma substância biológica importante produzida pelas células, recentemente foi demonstrado que  $H_2S$  exerce igual importância. Talvez, não surpreendentemente, o aumento no entendimento da biologia do  $H_2S$  na saúde e na doença em termos quantitativos (não apenas descritivos ou observacionais) emerge como um pré-requisito fundamental para a descoberta, alvo e otimização de novas terapias e, com sucesso, realizando seu potencial comercial como uma droga segura e com benefícios clínicos decisivos. Informações adicionais da biologia do  $H_2S$  devem ajudar a formular estratégias terapêuticas novas baseadas na identificação molecular e manipulação direta dos alvos sensíveis ao  $H_2S$ . A descoberta de que o  $H_2S$  é essencialmente um neurotransmissor, vasodilatador e mediador que participa na defesa do organismo e a compreensão dos aspectos

fisiológicos e fisiopatológicos dessa molécula teve grandes avanços. Entretanto, muitas questões permanecem abertas a respeito do papel do H<sub>2</sub>S na fisiologia normal e modulação/potencialização da patologia de doenças inflamatórias.

Baseado no exposto acima, acreditamos que o H<sub>2</sub>S em baixas concentrações e por via oral é capaz de diminuir consideravelmente a lesão gástrica induzida por etanol e possui efeito prócinético em camundongos. Estes eventos são dependentes da abertura de canais de K<sub>ATP</sub> e da via neurônios aferentes/TRPV1 (figura 24). A compreensão dos mecanismos pelo qual o H<sub>2</sub>S exerce esses efeitos no estômago poderá ser um alvo interessante para o desenvolvimento de novas terapêuticas citoprotetoras.



**Figura 24:** Esquema representativo dos efeitos do H<sub>2</sub>S no estômago.

## 7 CONCLUSÕES

- ✓ O Sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) preveniu a lesão gástrica, o consumo de glutathione e aumento da peroxidação lipídica na mucosa gástrica, induzidos pela administração de etanol 50% em camundongos e esse efeito gastroprotetor deve-se a ativação dos canais de  $K_{ATP}$ , dos neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina e dos receptores TRPV1;
- ✓ O Sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) apresentou efeito prócinético, acelerando o esvaziamento gástrico de líquidos em camundongos acordados, sendo esse efeito dependente dos canais de  $K_{ATP}$  e dos receptores TRPV1;
- ✓ O tratamento com L-cisteína ou de doadores de  $H_2S$  não alterou a atividade secretora ácida gástrica.



## REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, O.M.E.; BÓDIS, B.; KARÁDI, O.; SZOLCSÁNYI, J.; MÓZSIK, G.; Modification of aspirin and ethanol-induced mucosal damage in rats by intragastric application of resiniferatoxin. **Inflammopharmacology**, v. 3, p. 135–147, 1995.
- ABDEL-SALAM, O.M.E.; SZOLCSÁNYI, J.; BARTHÓ, L.; MÓZSIK, G. Sensory nerve-mediated mechanisms, gastric mucosal damage and its protection: A critical overview. **Gastroprotection**, v. 2, p. 4–12, 1994.
- ABE, K.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. **J Neurosci.**, v. 16, n. 3, p.1066-1071, 1996.
- AKAR, F.; UYDES-DOGAN, B.S.; BUHARALIOGLU, C.K.; ABBAN, G.; HEINEMANN, A.; HOLZER, P.; VAN DE VOORDE, J. Protective effect of cromokalim and diazóxido, and proulcerogenic effect of glibenclamida on indomethacin-induced gastric injury. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 25, p. 461-470, 1999.
- 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.**, v. 334, p. 21–24, 2002.
- ASHCROFT, F.M.; GRIBBLE, F.M. New windows on the mechanism of action of KATP channel openers. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 21, n. 11, p. 439–445, 2000.
- ASHCROFT, F.M.; HARRISON, D.E.; ASHCROFT, S.J.H. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic  $\beta$ -cells. **Nature**, v. 312, p. 446-448, 1984.
- ASHFORD, M.L.; STURGESS, N. C.; TROUT, N.J.; GARDNER, N.J.; HALES, C.N. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurons. **Pflugers Arch.**, v. 412, p. 297-304, 1988.
- AUBÉ, A.C.; BLOTTIÈRE, H.M.; SCARPIGNATO, C.; CHERBUT, C.; ROZÉ, C.; GALMICHE, J.P. Inhibition of acetylcholine induced intestinal motility by interleukin 1 beta in the rat. **Gut.**, v. 39, n. 3, p. 470-474, 1996.
- AWATA, S.; NAKAYAMA, K.; SATO, A.; KAWAMURA, M.; SUZUKI, I.; KODAMA, H. Changes in cystathionine  $\gamma$ -lyase levels in rat liver during lactation. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 31, p.185–191, 1993.
- AWATA, S.; NAKAYAMA, K.; SUZUKI, I.; SUGAHARA, K.; KODAMA, H. Changes in cystathionine  $\gamma$ -lyase in various regions of rat brain during development. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 35, p. 1331–1338, 1995.
- BATTISTON, L.; MORETTI, M.; TULISSI, P.; FANNI-CANELLES M.; POZZATO G. Alcohol hepatic toxicity in rat: evidence of the utility of gastric ethanol metabolism. **Int. Hepatol. Commun.**, v. 6, p. 61-70, 1996.

BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M.; KAZAZ, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. **Phytomedicine**, v. 13, p. 584–590, 2006.

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

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

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

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

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

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

BORNSTEIN, J.C.; COSTA, M.; GRIDER, J.R. Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. **Neurogastroenterol. Motil.**, v.16, n. 1 , p. 34-38, 2004.

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

BOUDAKA, A.; WÖRL, J.; SHIINA, T.; NEUHUBER, W.L.; KOBAYASHI, H.; SHIMIZU, Y.; TAKEWAKI, T. Involvement of TRPV1-dependent and -independent components in the regulation of vagally induced contractions in the mouse esophagus. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 556, n. 1/3, p.157-165, 2007.

BOYCE, H.W. The normal anatomy around the oesophagogastric junction: an endoscopic view. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 22, n. 4, p. 553-567, 2008.

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

BRATZ, I.N.; DICK, G.M.; TUNE, J.D.; EDWARDS, J.M.; NEEB, Z.P.; DINCER, U.D.; STUREK, M. Impaired capsaicin-induced relaxation of coronary arteries in a porcine model of the metabolic syndrome. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 29, p. 2489-2496, 2008.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics**. 11th ed. United States of America: Mc Graw-Hill, 2006.

BUCK, S.H.; BURKS, T.F. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. **Pharmacol. Rev.**, v. 38, n. 3, p.179-226, 1986.

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

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

CAMPOS, D.A.; LIMA, A.F.; RIBEIRO, R.S.L.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L.; RAO, V.S. SANTOS, F.A. Gastroprotective effect of a flavone from *Lonchocarpus araripensis* Benth. (Leguminosae) and the possible mechanism. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 60, p.391-397. 2008.

CATERINA, M.J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Ann. Rev. Neurosci.**, v. 24, p. 487-517, 2001.

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

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS (CEBRID). Álcool Etílico: Etanol. Mensagem recebida por <[cebrid@psicobio.epm.br](mailto:cebrid@psicobio.epm.br)> em 2009.

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

CHAPADEIRO, E.; LOPES, E. R.; RASO, P.; TAFURI, W. L. **Bogliolo: patologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.

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

CHI, X.X.; JIANG, X.; NICOL, G.D. ATP-Sensitive Potassium Currents Reduce the PGE2-Mediated Enhancement of Excitability in Adult Rat Sensory Neurons. **Brain Res.**, v. 11, p.28-40, 2007.

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

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

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

CUNHA, T.M.; DAL-SECCO, D.; VERRI, W.A. JR.; GUERRERO, A.T.; SOUZA, G.R.; VIEIRA, S.M.; LOTUFO, C.M.; NETO, A.F.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 590, n. 1/3, p. 127-135, 2008.

DAL-SECCO, D.; CUNHA, T.M.; FREITAS, A.; ALVES-FILHO, J.C.; SOUTO, F.O.; FUKADA, S.Y.; GRESPAN, R.; ALENCAR, N.M.; NETO, A.F.; ROSSI, M.A. Hydrogen sulfide augments neutrophil migration through enhancement of adhesion molecule expression and prevention of CXCR2 internalization: role of ATP-sensitive potassium channels. **J. Immunol.**, v. 181, p.4287-4298, 2008.

DA SILVA-SANTOS, J.E.; SANTOS-SILVA, M.C.; CUNHA, F.Q.; ASSREUY, J. The role of ATP-sensitive potassium channels in neutrophil migration and plasma exudation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 300, p.946-951, 2002.

DAVENPORT, H.W. Ethanol damage to canine oxyntic glandular mucosa. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 126, p. 657-662, 1967.

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

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

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v.15, p.316-328, 2005.

DEMBINSKI, A.; WARZECHA, Z.; CERANOWICZ, P.; BRZOZOWSKI, T.; DEMBINSKI, M.; KONTUREK, S. J.; PAWLIK, W. W. Role of capsaicin-sensitive nerves and histamine H1, H2, and H3 receptors in the gastroprotective effect of histamine against stress ulcers in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 508, p. 211-221, 2005.

DHAESE, I.; LEFEBVRE, R.A. Myosin light chain phosphatase activation is involved in the hydrogen sulfide-induced relaxation in mouse gastric fundus. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 606, n. 1/3, p.180-186, 2009.

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

DISTRUTTI, E.; SEDIARI, L.; MENCARELLI, A.; RENGA, B.; ORLANDI, S.; ANTONELLI, E.; ROVIEZZO, F.; MORELLI, A.; WALLACE, J. L.; CIRINO, G.; FIORUCCI, S. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, p.325-335, 2006.

DUFFIN, R.; SHAW, C.A.; ROSSI, A.G. Sildenafil reduces alcohol-induced gastric damage: just say 'NO'. **Br. J. Pharmacol.**, v.153, n. 4, p. 623-624, 2008.

EASTWOOD, G. L. Is Smoking Still Important in the Pathogenesis of Peptic Ulcer Disease?. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 25, Suppl.1, p.1-7, 1997.

EHRlich, K.; SICKING, C.; RESPONDEK, M.; PESKAR, B.M. Interaction of cyclooxygenase isoenzymes, nitric oxide, and afferent neurons in gastric mucosal defense in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 308, p.277–283, 2004.

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

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, E.; DISTRUTTI, E.; RIZZO, G.; MENCARELLI, A.; ORLANDI, S.; ZANARDO, R.; RENGHA, B.; DI SANTE, M.; MORELLI, A.; CIRINO, G.; WALLACE, J.L. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. **Gastroenterology**, v.129, p. 1210–1224, 2005.

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

FRIDMAN, I. S.; PELLEGRINI, I. L. **Trabalho e Drogas: Uso de Substâncias Psicoativas no Trabalho.** Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

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

GALLEGO, D.; CLAVÉ, P.; DONOVAN, J.; RAHMATI, R.; GRUNDY, D.; JIMÉNEZ, M.; BEYAK, M.J. The gaseous mediator, hydrogen sulphide, inhibits in vitro motor patterns in the human, rat and mouse colon and jejunum. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 20, n. 12, p.1306-1316, 2008.

GANOG, W. F. **Review of medical physiology.** 21th ed. San Francisco: Lange Medical Books, 2003.

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

GEPPETTI, P.; TREVISANI, M. Activation and sensitisation of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, p.1313-1320, 2004.

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

GOMES, A.S.; LIMA, L. M.F.; SANTOS, C.L.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H.L.P. LPS from E.coli protects indomethacin-induced gastropathy in rats – role of ATP-sensitive K channels. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 547, n. 1/3, p. 136-142, 2006.

GONDIM, F.A.; OLIVEIRA, G.R.; GRACA, J.R.V.; GONDIM, R.B.M.; ALENCAR, H.M.P.; DANTAS, R.P.; SANTOS, A.A.; ROLA, F.H. Neural mechanisms involved in the delay of gastric emptying of liquid elicited by acute blood volume expansion in awake rats. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 12, p. 93–99, 1999.

GONDIM, F.A.; RODRIGUES, C.L.; GRACA, J.R.; CAMURCA, F.D.; ALENCAR, H.M.; SANTOS, A.A.; ROLA, F.H. Neural mechanisms involved in the delay of gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid after thoracic spinal cord transection in awake rats. **Auton. Neurosci.**, v. 87, p. 52–58, 2001.

GOODWIN, L.R.; FRANCOM, D.; DIEKEN, F.P.; TAYLOR, J.D.; WARENYCIA, M.W.; REIFFENSTEIN, R.J.; DOWLING, G. Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. **J. Analyt. Toxicol.**, v. 13, p.105–109, 1989.

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

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

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

GUIDOTTI, T.L. Hydrogen sulphide. **Occup. Med.**, v.6, p. 367-371, 1996.

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

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

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Textbook of medical physiology**. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.

HAYES, P.; MEADOWS, H.J.; GUNTHORPE, M.J.; HARRIES, M.H.; DUCKWORTH, D.M.; CAIRIN, W.; HARRISON, D.C.; CLARK, C.E.; ELLINGTON, K.; PRINJHA, R.K. Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. **Pain**, v. 88, n. 2, p. 205-215, 2000.

HOLDEN, C. Alcoholism and the medical cost crunch. **Science**, v. 235, p. 1132-1133, 1987.

HOLZER, P. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 143-201, 1991.

HOLZER, P. Capsaicin-sensitive afferent neurones and gastrointestinal propulsion in the rat. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 332, n. 1, p. 62-65, 1986.

HOLZER, P. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 16, p. 469-478, 2000.

HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v. 24, p.739–768, 1988.

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

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

HOLZER, P. Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 7, p.563–569, 2007.

HOLZER, P.; SCHLUET, W.; LIPPE, I.T.; SAMETZ, W. Involvement of capsaicin-sensitive sensory neurons in gastrointestinal function. **Acta Physiol. Hung.**, v.69, n. 3/4, p. 403-411, 1987.

HOOGERWERF, W.; PASRICHA, P.J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. In: HARDMAN, J.; LIMBIRD, L. E. (Ed.). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2003.

HORN, J. The Proton-Pump Inhibitors: Similarities and Differences. **Clin. Therap.**, v. 22, n. 3, 2000.

HOSOKI, R.; MATSUKI, N.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 237, p.527–531, 1997.

HUANG, C.C.; CHU, N.S. A case of acute hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S) intoxication successfully treated with nitrites. **J. Formos. Med. Assoc.**, v. 86, p.1018–1020, 1987.

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

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

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

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

KASPAREK, M.S.; LINDEN, D.R.; KREIS, M.E.; SARR, M.G. Gasotransmitters in the gastrointestinal tract. **Surgery**, v. 143, p. 455-9, 2008.

KAWASHIMA, K.; ISHIHARA, S.; RUMI, M. A. K.; MORIYAMA, N.; KAZUMORI, H.; SUETSUGU, H.; SATO, H.; FUKUDA, R.; ADACHI, K.; SHIBATA, M.; ONODERA, S.; CHIBA, T.; KINOSHITA, Y. Localization of calcitonin gene-related peptide receptors in rat gastric mucosa. **Peptides**, v.23, p.955–966, 2002.

KIMURA, H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 267, p.129–133, 2000.

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

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

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

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; PAWLIK, T.; SLIWOWSKI, Z.; OCHMAŃSKI, W.; HAHN, E.G. Duodenal mucosal protection by bicarbonate secretion and its mechanisms. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 55, p. 5-17, 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**, v. 98, p. 909–920, 1990.

KWAK, J.Y.; JUNG, J.Y.; HWANG, S.W.; LEE, W.T. A capsaicin-receptor antagonist, capsazepine, reduces inflammation-induced hyperalgesic responses in the rat: evidence for an endogenous capsaicin-like substance. **Neuroscience**. v. 86, n. 2, p. 619-626, 1998.

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

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

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

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



LI, L.; BHATIA, M.; MOORE, P.K. Hydrogen sulphide — a novel mediator of inflammation? **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 6, p.125–129, 2006.

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

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

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

LU, Y.; OWYANG, C. Secretin-induced gastric relaxation is mediated by vasoactive intestinal polypeptide and prostaglandin pathways. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 21, n. 7, p. 754-747, 2009.

LUNDBERG, J.M. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: Integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids, and nitric oxide. **Pharmacol. Rev.**, v. 48, n.1, p. 113-177, 1996.

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

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

MAGGI, C.A.; GEPPETTI, P.; SANTICIOLI, P.; FRILLI, S.; GIULIANI, S.; FURIO, M. Tachykinin- like immunoreactivity in the mammalian urinary bladder: correlation with the fractions of the capsaicin-sensitive sensory nerves. **Neuroscience**, v. 26, p.233–242, 1988.

MAINIER, F.B.; VIOLA, E.D.M. O sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e o meio ambiente. In: SIMPÓSIO DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO E TECNOLOGIA – SEGeT', 2., 2005.

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R.K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanistic update. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 253, p. 329–338, 2003.

MALAGELADA, J. R.; ASPIROZ, F. Determinants of gastric emptying and transit in the small intestine. In: Wood, J. D. (Ed.). **Handbook of physiology: the gastro-intestinal system**. Bethesda: American Physiological Society, 1989. p. 909-937. Section 6, v. 1, Pt 2.

MARSH, S.J.; STANSFELD, C.E.; BROWN, D.A.; DAVEY, R.; MCCARTHY, D. The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. **Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 275-289, 1987.

MASUR, J.; JORGE, M.R. Dados relacionados a bebidas alcoólicas e alcoolismo no Brasil: uma revisão. **Rev. ABP-APAL**, v.64, p. 157-165, 1986.

MAZZIA, C.; CLERC, N. Ultrastructural relationships of spinal primary afferent fibres with neuronal and non-neuronal cells in the myenteric plexus of the cat oesophago-gastric junction. **Neuroscience**, v. 80, n. 3, p. 925-937, 1997.

MAYER, E.A. The physiology of gastric storage and emptying. In: JOHNSON, L.R. (Ed.). **Physiology of the gastrointestinal tract**. 3<sup>rd</sup> ed. New York, NY: Raven Press, 1994. p. 923-976.

MCCONALOGUE, K.; FURNESS, J.B. Gastrointestinal neurotransmitters. **Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 8, n. 1, p. 51-76, 1994.

MCINTYRE, P.; MCLATCHIE, L.; CHAMBERS, A.; PHILLIPS, E.; CLARKE, M.; SAVIDGE, J.; TOMS, C.; PEACOCK, M.; SHAH, K.; WINTER, J. Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). **Br. J. Pharmacol.**, v. 132, n. 5, p.1084-1094, 2001.

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

MEIER, M.; JANOSIK, M.; KERY, V.; KRAUS, J.P.; BURKHARD, P. Structure of human cystathionine  $\beta$ -synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein. **EMBO J.**, v. 20, p.3910-3916, 2001.

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

MELONI, J. N.; LARANJEIRA, R. Custo social e de saúde do consumo do álcool. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 26, suppl.1, p. 26-32, 2004.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem.** v. 86, p. 271-278, 1978.

MILBY, T.H.; BASELT, R.C. Hydrogen sulfide poisoning: clarification of some controversial issues. **Am. J. Ind. Med.**, v. 35, p.192-195, 1999.

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

MOORE, P.K.; BHATIA, M.; MOOCHHALA, S. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, p. 609-611, 2003.

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

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

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

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

NATALE, G.; LAZZERI, G.; LUBRANO, V.; COLUCCI, R.; VASSALLE, C.; FORNAI, M.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M. Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 195, p. 62–72, 2004.

NELSON, M.T.; HUANG, Y.; BRAYDEN, J.E.; HESCHELER, J.; STANDEN, N.B. Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K<sup>+</sup> channels. **Nature**, v. 344, p. 770-773, 1990.

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

NICOLETTI, P.; TREVISANI, M.; MANCONI, M.; GATTI, R.; DE SIENA, G.; ZAGLI, G.; BENEMEI, S.; CAPONE, J.A.; GEPPETTI, P.; PINI, L.A. Ethanol causes neurogenic vasodilation by TRPV1 activation and CGRP release in the trigeminovascular system of the guinea pig. **Cephalalgia**, v. 28, n. 1, p. 9-17, 2008.

NOMA, A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. **Nature**, v. 305, n. 5930, p. 147–148, 1983.

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

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

PATACCHINI, R.; SANTICIOLI, P.; GIULIANI, S.; MAGGI, C.A. Pharmacological investigation of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) contractile activity in rat detrusor muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 9, n. 2/3, p.171-177, 2005.

PATACCHINI, R.; SANTICIOLI, P.; GIULIANI, S.; MAGGI, C.A. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) stimulates capsaicin-sensitive primary afferent neurons in the rat urinary bladder. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, p.31–34, 2004.

PARKMAN, H.P.; JONES, M.P. Tests of gastric neuromuscular function. **Gastroenterology**, v. 136, n. 5, p. 1526-1543, 2009.

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

PESKAR, B.M.; LANGE, K.; HOPPE, U.; PESKAR, B.A. Ethanol stimulates formation of leukotriene C4 in rat gastric mucosa. **Prostaglandins**, v. 31, n. 2, p. 283-293, 1986.

PIEPER, G.M.; GOSS, G. Anti-free-radical and neutrophil-modulating properties of the nitrovasodilator, nicorandil. **Cardiovasc. Drugs Therapy**, v. 6, p. 225-232, 1992.

PITCHUMONI, C.S. Pathogenesis of alcohol-induced chronic pancreatitis: facts, perceptions, and misperceptions. **Surg. Clin. N. Am.**, v. 81, p. 379-390, 2001.

QUAYLE, J.M.; NELSON, M.T.; STANDEN, N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 1165-1232, 1997.

RATNAM, S.; MACLEAN, K.N.; JACOBS, R.L.; BROSNAN, M.E.; KRAUS, J.P.; BROSNAN, J.T. Hormonal regulation of cystathionine  $\beta$ -synthase expression in liver. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p.42912-42918, 2002.

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

REGINATO, W.; MORAES-FILHO, J. P. Álcool e alcoolismo. **Rev. Bras. Clín. Terap.**, v. 15, p.79-82, 1986.

REYNELL, P. C.; SPRAY, G. H. The simultaneous measurement of absorption and transit in the gastrointestinal tract of the rat. **J. Physiol.**, v. 15, p. 361-371, 1978.

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

ROBERT, A. Cytoprotection by prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 77, p. 761-767, 1979.

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

ROBERTS, S.; MCDONALD, I. M. In: ABRAHAM, D. J. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. 6th ed. New Jersey: John Wiley, 2003.

RODRIGUES, A.R.A.; DUARTE, I.D.G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **Br. J. Pharmacol.**, v. 129, p.110-114, 2000.

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

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

RUSSO, C.D.; TRINGALI, G.; RAGAZZONI, E.; MAGGIANO, N.; MENINI, E.; VAIRANO, M.; PREZIOSI, P.; NAVARRA, P. Evidence that hydrogen sulfide can modulate hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: in vitro and in vivo studies in the rat. **J. Neuroendocrinol.**, v. 12, p.225–233, 2000.

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

SANTOS, C.L.; MEDEIROS, B.A.; PALHETA-JUNIOR, R.C.; MACEDO, G.M.; NOBRE-E-SOUZA, M.A.; TRONCON, L.E.; SANTOS, A.A.; SOUZA, M.H. Cyclooxygenase-2 inhibition increases gastric tone and delays gastric emptying in rats. **Neurogastroenterol . Motil.**, v. 19, n. 3, p.225-232, 2007.

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

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

SCARPIGNATO, C.; CAPOVILLA, T.; BERTACINI, G. Action of caerulein on gastric emptying of the conscious rat. **Arch. Int. Pharm. Ther.**, v. 246, p. 286-294 1980.

SCHEMANN, M.; ROHN, M.; MICHEL, K. Motor control of the stomach. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v.12, n. 1, p.41-51, 2008.

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

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

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 20, p. 519–525, 2004.

SEARCY, D.G.; LEE, S.H. Sulfur reduction by human erythrocytes. **J. Exp. Zool.**, v. 282, p.310–322, 1998.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

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

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

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

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

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

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

STERNINI, C.; REEVE, J.R.; BRECHA, N. Distribution and characterization of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the digestive system of normal and capsaicin-treated rats. **Gastroenterology**, v. 93, p.852–862, 1987.

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

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

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol. Rev.**, v. 51, n. 2, p.159-212, 1999.

SZALLASI, A.; CORTRIGHT, D.N.; BLUM, C.A.; EID, S.R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, n. 5, p.357-372, 2007.

SZOLCSÁNYI, J. A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. **J. Physiol.**, v. 73, n. 3, p.251-259, 1977.

SZOLCSÁNYI, J. Capsaicin, irritation, and desensitization: neurophysiological basis and future perspectives. In: GREEN, B.G.; MASON, J. R.; KARE, M. R. (Ed.). **Chemical senses**. New York: [s.n], p. 141–169, 1990.

TACK, J. Prokinetics and fundic relaxants in upper functional GI disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v. 8, n. 6, p. 690-696, 2008.

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

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

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

TEAGUE, B.; ASIEDU, S.; MOORE, P.K. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. **Br. J. Pharmacol.**, v. 137, p. 139–145, 2002.

TEYSSEN, S.; SINGER, M.V. Alcohol-related diseases of the oesophagus and stomach. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 17, p. 557–573, 2003.

TOMINAGA, M. Capsaicin receptor TRPV1. **Brain Nerve**, v. 60, n. 5, p.493-501, 2008.

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

TREVISANI, M.; PATACCHINI, R.; NICOLETTI, P.; GATTI, R.; GAZZIERI, D.; LISSI, N.; ZAGLI, G.; CREMINON, C.; GEPPETTI, P.; HARRISON, S. Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. **Br. J. Pharmacol.**, v. 145, p.1123-1131, 2005.

TRONCON, L.E.A. Motilidade gástrica: fisiopatologia e métodos de estudo. **Rev. Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 2, n. 1, p. 14-24, 2008.

UBUKA, T. Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissues. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 781, p. 227–249, 2002.

UCHIDA, K.; KAMIKAWA, Y. Muscularis mucosae – the forgotten sibling. **J. Smooth Muscle Res.**, v.43, n. 5, p. 157-177, 2007.

UZUN, H.; SIMSEK, G.; AYDIN, S.; UNAL, E.; KARTER, Y.; YELMEN, N.K.; VEHID, S.; CURGUNLU, A.; KAYA, S. Potential effects of L-NAME on alcohol-induced oxidative stress. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, n. 4, p. 600-604, 2005.

VANDER, A. J.; SHERMAN, J.H.; LUCIANO, D.S. **Human physiology**. 8th ed. Boston: McGraw-Hill, 2001.

VISSCHER, F. E.; SEAY, P. H.; TAZELAAR, A. P.; VELDKAMP, W.; VANDER BROOK, M. J. Pharmacology of pamine bromide. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.110, n. 2, p. 188-204, 1954.

WALKER, K.M.; URBAN, L.; MEDHURST, S.J.; PATEL, S.; PANESAR, M.; FOX, A.J.; MCINTYRE, P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 304, n. 1, p. 56-62, 2003.

WALLACE, J.L.; DICAY, M.; MCKNIGHT, W.; MARTIN, G.R. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. **FASEB J.**, v. 21, n. 14, p. 421-428, 2007.

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

WALLACE, J. L.; MCKNIGHT, W.; MIYASAKA, M.; TAMATANI, T.; PAULSON, J.; ANDERSON, D.C.; GRANGER, D.N.; KUBES, P. Role of endothelial adhesion molecules in NSAID-induced gastric mucosal injury. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p.993-998, 1993.

WANG R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? **FASEB J.**, v. 16, p. 1792-1798, 2002.

WOOD, J.N.; WINTER, J.; JAMES, I.F.; RANG, H.P.; YEATS, J.; BEVAN, S. Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. **J. Neurosci.**, v. 8, n. 9, p. 3208-3220, 1988.

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

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

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

WU, L.; WANG, R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. **Pharmacol. Rev.**, v. 5, p. 585-630, 2005.

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



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

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

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

ZHAO, P.; HUANG, X.; WANG, Z.Y.; QIU, Z.X.; HAN, Y.F.; LU, H.L.; KIM, Y.C.; XU, W.X. Dual effect of exogenous hydrogen sulfide on the spontaneous contraction of gastric smooth muscle in guinea-pig. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 616, n. 1/3, p. 223-228, 2009.

ZHAO, W.; ZHANG, J.; LU, Y.; WANG, R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a endogenous gaseous KATP channel opener. **EMBO J.**, v. 20, p. 6008–6016, 2001.

# ANEXO