

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

**MICHEL SANTOS PALHETA**

**PARTICIPAÇÃO DA VIA NITRÉRGICA NA ELEVAÇÃO DA TAXA DE  
RELAXAMENTO TRANSITÓRIO DO ESFÍNCTER ESOFÁGICO INFERIOR  
DECORRENTE DA DISTENSÃO RETAL EM CÃES**

**FORTALEZA**

**2011**

**MICHEL SANTOS PALHETA**

**PARTICIPAÇÃO DA VIA NITRÉRGICA NA ELEVAÇÃO DA TAXA DE  
RELAXAMENTO TRANSITÓRIO DO ESFÍNCTER ESOFÁGICO INFERIOR  
DECORRENTE DA DISTENSÃO RETAL EM CÃES**

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

**Orientador: Prof. Dr. Miguel Ângelo Nobre e Souza**

**Co-orientador: Prof. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça**

**Fortaleza-Ceará**

**2011**

**MICHEL SANTOS PALHETA**

**PARTICIPAÇÃO DA VIA NITRÉRGICA NA ELEVAÇÃO DA TAXA DE  
RELAXAMENTO TRANSITÓRIO DO ESFÍNCTER ESOFÁGICO INFERIOR  
DECORRENTE DA DISTENSÃO RETAL EM CÃES**

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

**Aprovada em: 15 de Abril de 2011**

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO**

---

**Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza**  
**UFC- Faculdade de Medicina**

---

**Prof. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça**  
**UFC- Faculdade de Medicina- Campus Sobral**

---

**Prof. Dr. Miguel Ângelo Nobre e Souza**  
**UFC- Faculdade de Medicina**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Palheta, Michel Santos

Participação da via nitrérgica na elevação da taxa de relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior decorrente da distensão retal em cães / Michel Santos Palheta. – Fortaleza, 2011.

53f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Ângelo Nobre e Souza

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza-Ce; 2011.

1. Óxido nítrico 2. Motilidade esofágica 3. Refluxo gastroesofágico 4. Esfíncter esofágico inferior 5. Cães I. Sousa, Miguel Ângelo Nobre (Orient.) II. Título.

CDD:

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, coordenador do programa de Pós-graduação *stricto sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio e incentivos constantes.

Ao Prof. Dr. MIGUEL ÂNGELO NOBRE E SOUZA, professor Adjunto do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, meu orientador, pela oportunidade de concretizar este estudo, pelos ensinamentos, por sua paciência e presteza na orientação desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. ARMÊNIO AGUIAR DOS SANTOS, professor Adjunto do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pelo acolhimento e orientação, ainda durante a vontade de ingressar na pós-graduação.

Ao Prof. Dr. JOSÉ RONALDO VASCONCELOS DA GRAÇA, professor Adjunto do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina, Campus Sobral, da Universidade Federal do Ceará, antes de tudo um amigo, pela ajuda na elaboração e execução desse trabalho.

Ao meu irmão, Prof. Dr. RAIMUNDO CAMPOS PALHETA JÚNIOR, professor Adjunto do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal Rural do Vale do São Francisco, por suas orientações nesta dissertação, disponibilidade e por seu exemplo de vida acadêmica e amor incondicional ao que faz.

À minha mãe, FÁTIMA DO ROSÁRIO DA CONCEIÇÃO SANTOS, por todas as oportunidades a mim oferecidas, sem medir esforços pessoais, e por fundamentar os valores morais e afetivos que hoje norteiam minha vida.

À ANA CLÁUDIA VIANA WANZELER, pela ajuda na revisão ortográfica desta dissertação e, principalmente, pela sua paciência e compreensão da minha ausência em prol da concretização de um sonho.

Ao Dr. SIDNEY WENDELL GOIANA, coordenador do Curso de Medicina Veterinária, da Faculdade INTA, pela ajuda no tratamento dos cães desse trabalho.

À LIZIANE LOPES, BRUNO MOTA, FRANCISCO GOMES, pela inestimável ajuda na condução de toda parte laboratorial deste trabalho.

Ao Prof. Dr. ROBSON DOMINGUES, professor Adjunto do Departamento de Morfologia da Universidade do Estado do Pará, pelos ensinamentos ainda na graduação em tempos de monitoria e iniciação científica, a oportunidade do ensino superior como professor substituto de Anatomia Humana e constante incentivo para ingressar na pós-graduação.

A CAPES, pelo importante apoio financeiro na realização desta pesquisa.

## DEDICATÓRIA

Aos meus avós, PRISCILA e CLÁUDIO SANTOS (*in memoriam*), que deixaram saudades.

À minha mãe, FÁTIMA DO ROSÁRIO DA CONCEIÇÃO SANTOS, porque tudo que sou, e tudo que conquistei, devo a ela.

Aos meus irmãos EDUARDO RAPHAEL E RAIMUNDO JÚNIOR pelo eterno amor e amizade.

Aos meus tios CLÁUDIO SANTOS e RAIMUNDO SANTOS, ao meu pai RAIMUNDO PALHETA e cunhadas PATRÍCIA QUINTO e RAFAELE PALHETA pelo companheirismo e constante incentivo.

Aos meus sobrinhos, EDUARDO GABRIEL e RICARDO CALIEL, pelo carinho e alegria que colocam em minha vida mais motivos de buscar o sucesso.

“Se consegui enxergar mais longe é porque estava apoiado sobre ombros de gigantes”

**Isaac Newton**

## RESUMO

### **PARTICIPAÇÃO DA VIA NITRÉRGICA NA ELEVAÇÃO DA TAXA DE RELAXAMENTO TRANSITÓRIO DO ESFÍNCTER ESOFÁGICO INFERIOR DECORRENTE DA DISTENSÃO RETAL EM CÃES. MICHEL SANTOS PALHETA.**

Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação *stricto sensu* em Cirurgia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará.

Abril, 2011. Orientador: Prof. Dr. Miguel Ângelo Nobre e Souza

A distensão retal induz o relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior (RTEEI) em cães, tal relaxamento gera uma queda na pressão do esfíncter esofágico inferior (EEI) no nível da pressão intragástrica, evento inclusive considerado o principal fator para ocorrência do refluxo gastroesofágico. O objetivo deste estudo foi avaliar a participação da via nitrérgica na elevação da taxa de RTEEI decorrente da distensão retal em cães. Foram utilizados cães (n=21), sem raça definida, machos, pesando entre 10-15 Kg. Os animais foram submetidos ao jejum de 12h com água *ad libitum*. No dia seguinte, os cães foram anestesiados com (cetamina 10 mg.Kg<sup>-1</sup> + xilazina 20 mg.Kg<sup>-1</sup>). Posteriormente, foi iniciado o protocolo de avaliação da motilidade esofágica. Em seguida, os animais foram aleatoriamente pré-tratados com solução salina 0.15 M (1 ml.Kg<sup>-1</sup>, i.v.), L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>), L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.v.) + L-Arginina (200 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.v.), glibenclamida (1 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.v.) ou azul de metileno (3 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.v.). Decorridos 45 min, o reto foi distendido (5 ml.Kg<sup>-1</sup>) com um balão de látex e as variações da motilidade esofágica foram registradas ao longo dos 45 min seguintes. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA seguida do teste Student-Newman-Keuls. Em relação aos respectivos animais controles (5,8 ± 0,34 RTEEI/h) o pré-tratamento com L-NAME (2,3±0,52 RTEEI/h) reduziu (p<0.05) a taxa de RTEEI provenientes da distensão retal, evento que foi revertido no grupo que recebeu a adição de L-Arginina (6,5 ± 0,6 RTEEI/h, p<0,05). Além disso, o pré-tratamento com azul de metileno (1,56 ± 0,5 RTEEI/h) também preveniu o aumento da taxa de RTEEI decorrente da distensão retal. Entretanto, nos animais pré-tratados com glibenclamida (5,3 ± 0,3 RTEEI/h) a distensão retal não demonstrou alteração no número de RTEEI em relação ao grupo controle. O óxido nítrico participa da elevação da taxa de RTEEI decorrente da distensão retal em cães através do segundo mensageiro GMPc.

**DESCRITORES:** Óxido nítrico. Motilidade esofágica. Refluxo gastroesofágico. Esfíncter esofágico inferior. Cães.

## ABSTRACT

**PARTICIPATION OF THE NITRERGIC PATHWAY IN THE INCREASED RATE OF TRANSITORY RELAXATION OF LOWER ESOPHAGEAL SPHINCTER INDUCED BY RECTAL DISTENSION IN DOGS.** MICHEL SANTOS PALHETA. Dissertation (master's degree). Post-Graduation Program (*stricto sensu*) in surgery. Federal University of Ceará. Faculty of Medicine. April, 2011. Prof. Dr. Miguel Ângelo Nobre e Souza

The rectal distension (RD) induces transitory relaxation of lower esophageal sphincter (TLERs) in dogs, this relaxation generates a drop in pressure of lower esophageal sphincter (LES) similar a intragastric pressure values event even considered the main factor for the occurrence of gastroesophageal reflux. The aim of this study was evaluate the participation of the nitreergic pathway in the increased rate of TLERs induced by rectal distension in dogs. Mongrel male dogs (n = 21) weighing 10-15 kg. The animals were fasted for 12 hours with water *ad libitum*. The next day, the dogs were anesthetized (ketamine 10 mg.Kg<sup>-1</sup> + xylazine 20 mg.Kg<sup>-1</sup>). The animals were subjected to the evaluation protocol of esophageal motility during 120 min. Considering the first 30 minutes as basal period, the animals were randomly intravenous treated whit: Saline 0.15M (1ml.Kg<sup>-1</sup>, i.v.), L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.v.), L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.v.) + L-Arginine (200 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.v.), glibenclamide (1 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.v.) or methylene blue (3 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.v.). After 45 min, the rectum was distended (5 ml.Kg<sup>-1</sup>, i.v.) with a latex balloon and changes in esophageal motility were recorded last 45 min. Data were analyzed using ANOVA followed by Student Newman-Keuls test. In comparison to their control animals (5,8 ± 0,34 TLESRs/h), pre-treatment with L-NAME (2,3±0,52 TLESRs/h) decreased (p <0.05) rate the TRLES induced by DR, this phenomena was reversed by L-NAME plus L-Arginine (6,5 ± 0,6 TLESRs/h, p<0,05). Moreover, the pre-treatment with methylene blue (1,56 ± 0,5 TLESRs/h) also prevent increase rate the TLESRs induced by RD. However, in animals pretreated with glibenclamide (5,3 ± 0,3 TLESRs/h) RD the showed no change in the number of TLESRs in comparison the control. Nitric oxide participates in the rising rate of TLESRs resulting from rectal distension in dogs through the cGMP second messenger

**KEY WORDS:** Nitric oxide. Esophageal motility. Gastroesophageal reflux. Lower esophageal sphincter. Dogs.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AM</b>	Azul de metileno
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CE</b>	Ceará
<b>COBEA</b>	Colégio brasileiro para uso de experimentação com animais
<b>DR</b>	Distensão retal
<b>DRGE</b>	Doença do refluxo gastroesofágico
<b>EEI</b>	Esfíncter esofágico inferior
<i>et al</i>	e colaboradores
<b>Fig.</b>	Figura
<b>GC</b>	Guanilato ciclase
<b>GMPc</b>	Guanosina monofosfato cíclico
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>i.v.</b>	Intravenoso
<b>JEG</b>	Junção esôfago-gástrica
<b>n</b>	Número
<b>NANC</b>	Não adrenérgico não colinérgico
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Enzima sintase de óxido nítrico
<b>p</b>	Intervalo de significância
<b>RGE</b>	Refluxo gastroesofágico
<b>RTEEI</b>	Relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal
<b>vs.</b>	Versus
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Circuito neural que determina os RTEEI decorrente da distensão gástrica.....**18**
- Figura 2** – Relaxamento da musculatura lisa do trato gastrintestinal, causado pelo mediador inibitório NANC, liberado no plexo mientérico, envolvendo vários mecanismos intracelulares.....**21**
- Figura 3** – Modulação central do RTEEI decorrente da distensão retal em cães.....**20**
- Figura 4** – Posicionamento da sonda de manometria para os registros da taxa de RTEEI em cães.....**23**
- Figura 5** – Representação esquemática dos registros da taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados. ....**24**
- Figura 6** – Sonda retal posicionada a cerca de 6 cm da margem anal de acordos com Yong Lei *et al.* ....**24**
- Figura 7** – Representação de um registro individual experimental do RTEEI .....**26**
- Figura 8** – Representação esquemática dos grupos utilizados no estudo.....**27**
- Figura 9** – Delineamento experimental para o estudo da participação da via nitrérgica no controle do aumento da taxa de RTEEI advindo da distensão retal em cães anestesiados.....**28**
- Figura 10** – Efeitos da distensão retal sobre a taxa de RTEEI em cães.....**29**
- Figura 11** – Efeitos do pré-tratamento farmacológico com L-NAME sobre a taxa de RTEEI advindo da distensão retal em cães anestesiados.....**30**

**Figura 12** – Efeitos do pré-tratamento farmacológico com L-NAME + L-Arginina sobre a taxa de RTEEI advindo da distensão retal em cães anestesiados.....**31**

**Figura 13** – Efeitos do pré-tratamento farmacológico com azul de metileno sobre a taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados .....**33**

**Figura 14** – Efeitos do pré-tratamento farmacológico com glibenclamida sobre a taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados ..... **35**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Efeito do pré-tratamento com L-NAME ( $3 \text{ mg.Kg}^{-1} \text{ i.v.}$ ) e com L-NAME ( $3 \text{ mg.Kg}^{-1} \text{ i.v.}$ ) + L-Arginina ( $200 \text{ mg.Kg}^{-1} \text{ i.v.}$ ) na latência do 1ª RTEEI, duração do RTEEI e pressões do EEI e gástrica de cães submetidos a distensão retal.....**32**

**Tabela 2** - Efeito do pré-tratamento com azul de metileno ( $3 \text{ mg.Kg}^{-1} \text{ i.v.}$ ) na latência do 1ª RTEEI, duração do RTEEI e pressões do EEI e gástrica de cães submetidos a distensão retal.....**34**

**Tabela 3** - Efeito do pré-tratamento com glibenclamida ( $1 \text{ mg.Kg}^{-1} \text{ i.v.}$ ) na latência do 1ª RTEEI, duração do RTEEI e pressões do EEI e gástrica de cães submetidos a distensão retal.....**36**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
<b>3. MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
3.1 Animais.....	22
3.2 Protocolos experimentais .....	22
3.2.1 Anestesia.....	22
3.2.2 Posicionamento da sonda de manometria.....	23
3.2.3 Posicionamento da sonda retal.....	24
3.2.4 Registro do período basal.....	24
3.2.5 Investigação do efeito dos inibidores da via nitrérgica e de canais para K <sup>+</sup> .....	25
3.2.6 Protocolo de distensão retal e registros deste período.....	26
3.3 Análise estatística.....	28
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
4.1 Efeitos da distensão retal sobre a taxa de RTEEI decorrente da distensão retal em cães.....	29
4.2 Efeitos do pré-tratamento farmacológico com L-NAME sobre a taxa de RTEEI advindo da distensão retal em cães anestesiados.....	30
4.3 Efeitos do pré-tratamento farmacológico com L-NAME + L-Arginina sobre a taxa de RTEEI advindo da distensão retal em cães anestesiados.....	31
4.4 Efeitos do pré-tratamento farmacológico com azul de metileno sobre a taxa de RTEEI advindo da distensão retal em cães anestesiados.....	33
4.5 Efeitos do pré-tratamento farmacológico com glibenclamida sobre a taxa de RTEEI advindo da distensão retal em cães anestesiados.....	35
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>53</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

No trato gastrintestinal, o esôfago é uma estrutura tubular muscular que, funcionalmente, se estende desde a margem inferior do esfíncter esofágico superior a margem inferior do esfíncter esofágico inferior (EEI) e ao unir a faringe ao estômago, permite a passagem do alimento, bem como a eliminação do excesso de materiais gasosos do estômago, mediante eructação. O movimento do conteúdo alimentar ao longo do esôfago é resultante de contrações musculares coordenadas a quem denominamos de motilidade esofágica. (SILVERTHORN, 2003).

Com a ingestão de alimento sólido damos início à mastigação, evento que permite a umidificação e modelamento de volume adequado do material a ser deglutido. Ao término da mastigação dar-se início ao processamento da deglutição. Neste momento entra em ação o esôfago. Para isso, conta com o auxílio do EES e do EEI situados em suas extremidades para controlar o fluxo anterógrado e evitar o fluxo retrógrado (SANTOS, 2009). O reflexo da deglutição segue uma sucessão altamente coordenada de eventos orquestrada pelo centro da deglutição no tronco cerebral e requer impulsos dos nervos cranianos trigêmeo, facial, glossofaríngeo, vago e hipoglosso (LANG, 2009; SOUZA e FREIRE, 2010).

Tais impulsos desencadeiam a constrição da faringe e o esfíncter esofágico superior relaxa, propulsionando a comida no esôfago e iniciando uma onda peristáltica. Isto é conhecido como peristalse primária e a contração prossegue distalmente ao longo do esôfago a uma taxa de aproximadamente 5 a 10 cm por segundo. A peristalse secundária clareia qualquer alimento restante e é iniciada através da distensão do esôfago ou através do refluxo gastroesofágico (RGE). Contrações terciárias não-peristálticas podem acontecer espontaneamente ou depois da deglutição (GURSKI, 2006).

Na porção mais distal do esôfago, o EEI forma junto com o diafragma crural uma zona de alta pressão (em torno de 25 mmHg). Embora do ponto de vista anatômico a junção esofagogástrica não tenha estrutura típica de esfíncter, exhibe contração tônica entre as deglutições, inclusive suficiente para manter uma pressão em torno de 05 mmHg superior a intragástrica, evitando o RGE (SANTOS, 2009).

Tal fato, talvez, esteja relacionado às propriedades miogênicas ou maior sensibilidade da junção a neurotransmissores colinérgicos. Portanto, fatores de natureza muscular, neural e hormonal contribuem para o regulamento fisiológico da pressão do EEI. Neste sentido, vale salientar que nos dois terços inferiores, a musculatura do esôfago é

inervada a partir do plexo mioentérico, cuja atividade excitatória ou inibitória é comandada por fibras vagais pós-ganglionares de natureza colinérgica ou através de mediadores não adrenérgicos e não colinérgicos (NANC) (SANTOS e GRAÇA, 2010).

Além disso, quando há o relaxamento do EEI ou do diafragma crural, ou mesmo quando algumas destas estruturas encontram-se defeituosas pode haver ocorrência de episódios de RGE, ou seja, o trânsito retrógrado e involuntário do conteúdo gástrico para o esôfago, podendo manifestar-se ou não com regurgitação ou vômito de saliva, alimentos e secreção gástrica (MORAES-FILHO *et al*, 2002). Já o termo doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é utilizado para descrever o amplo espectro de distúrbios causados pelo RGE e, conceitua-se como afecção crônica decorrente do fluxo retrógrado de parte do conteúdo gastroduodenal para o esôfago ou órgãos adjacentes ao mesmo, acarretando variável espectro de sintomas ou sinais esofagianos ou extraesofagianos, associados ou não a lesões teciduais (PEREIRA e FURTADO, 2010).

Atualmente, a DRGE é considerada uma das doenças mais comuns na prática médica e há muito tempo desperta o interesse de clínicos e cirurgiões da gastroenterologia. O diagnóstico adequado da DRGE necessita do conhecimento do conceito atual da afecção e das suas várias formas de apresentação clínica. As manifestações clínicas consideradas típicas da DRGE são pirose e regurgitação. Tais sintomas sugerem a presença da afecção, entretanto outras doenças (como gastrites e, eventualmente, neoplasias) podem cursar com um deles (PEREIRA e FURTADO, 2010).

A duração e frequência dos sintomas são informações importantes que precisam ser sempre avaliadas e quantificadas. Assim como, a identificação de pirose ou regurgitação ácida são sintomas considerados como marcadores clínicos da DRGE quando ocorrem 1 ou mais vezes por semana nos últimos 12 meses ou 2 vezes por semana nas últimas 4 a 8 semanas segundo o Consenso Brasileiro para a Doença do Refluxo (MORAES-FILHO *et al*, 2002). Apesar de que para alguns a intensidade e a frequência dos sintomas da DRGE serem fracos preditores da presença ou da gravidade da esofagite (DODDS, 1982). Segundo Mincis (2002) existe marcada correlação entre o tempo de duração dos sintomas e aumento do risco para o desenvolvimento do esôfago de Barret e adenocarcinoma do esôfago.

Mais recentemente, surgiu a hipótese de que outras manifestações clínicas como a dor torácica não-coronariana, sensação de globus faríngeo, manifestações extraesofágicas respiratórias (fundamentalmente, tosse e asma brônquica) e otorrinolaringológicas (basicamente, disfonia e pigarro) possam também ser decorrentes de RGE (VAEZI, 2003; KAHNILAS, 2008).

Vale ressaltar que, tais teorias surgem graças ao advento de técnicas de investigação mais acuradas como os exames de endoscopia digestiva alta, cintilografia, pHmetria de 24 horas e a manometria esofágica; com isto há possibilidade de avaliação mais adequada para o entendimento da fisiopatologia da DRGE (HIRANO, 2007; ANDREOLLO, 2010). De fato, a manometria, por exemplo, dispõe de equipamento computadorizado e muito sensível, com sondas de oito canais, destaca-se ao quantificar a funcionalidade motora esofágica, inclusive apontando possíveis anormalidades de motilidade, evento geralmente associado a episódios de refluxo (ANDREOLLO, 2010).

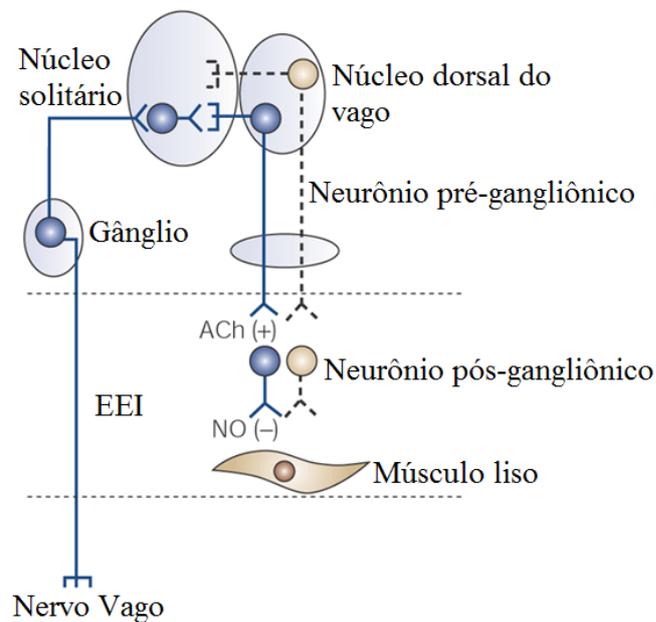
Com o avanço destas técnicas de avaliação de motilidade, constatou-se que vários fatores podem predispor a DRGE, incluindo a hérnia de hiato, baixa pressão do EEI, perda da função peristáltica do esôfago, a obesidade abdominal, estados de hipersecreção gástrica, retardo no esvaziamento gástrico e outros. O mecanismo do RGE, no entanto, não se resume a uma fraqueza relativa do EEI, pois há pacientes com DRGE que apresentam EEI hipertônicos (NEBEL, 1976; KAHRILAS e SHI, 2000; KAHRILAS, 2008).

Neste contexto, nas últimas duas décadas foi observado que no âmbito da motilidade esofágica há um relaxamento episódico designado de “relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior” (RTEEI). Caracterizado por uma queda abrupta e espontânea da pressão do EEI, no nível da pressão intragástrica, não induzida pela deglutição, isto é, não precedida por contração da faringe quatro segundos antes e dois segundos após o início do relaxamento do EEI, e podem durar de 5 a 35 segundos (CASTELL *et al*, 2004). Vale ressaltar que o RTEEI ocorre tanto em pacientes saudáveis como naqueles com DRGE, entretanto é considerado o principal mecanismo para explicar RGE (MITTAL *et al*, 1995).

Neste sentido, estudos demonstram que o RTEEI ocorre quando há distensão do fundo gástrico por alimentos ou gases, principalmente no período pós-prandial. E que pelo menos, duas áreas localizadas no estômago e outra na faringe são capazes, quando devidamente estimuladas, de deflagrar o reflexo que irá desencadear o RTEEI (FRANZI *et al*, 1990; SIFRIM, 2001). De fato, a presença de alimento ou a distensão gástrica com balão inflável, na região do fundo ou da cárdia deflagra o RTEEI, em virtude da presença de mecanorreceptores sensitivos nestas regiões (WASHINGTON, 1998; CASTELL *et al*, 2004).

Várias evidências indicam que a distensão destes mecanorreceptores inicia um arco reflexo, cujas fibras aferentes transitam pelo nervo vago até os núcleos vagais superiores (solitário, ambíguo e dorsal), onde ocorre a integração deste estímulo. Após a integração do reflexo, os estímulos eferentes trafegam através de neurônios vagais eferentes, bem como por mensageiros químicos de natureza inibitória NANC responsáveis em desencadear o RTEEI

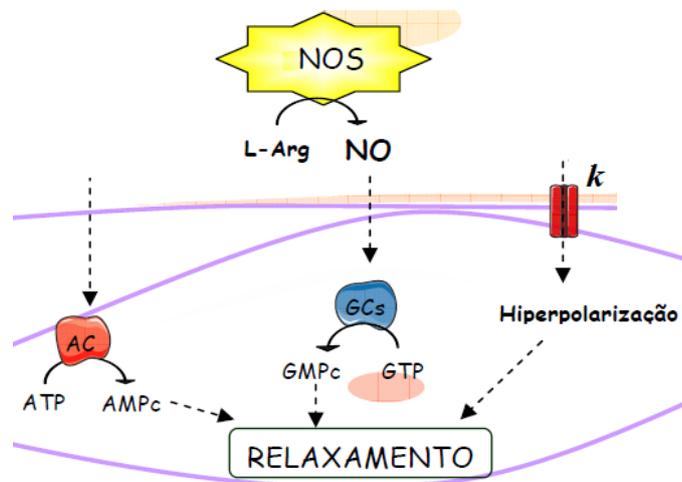
(FURNESS e COSTA, 1987). As evidências em favor do controle neurogênico do relaxamento do EEI e de sua natureza NANC foram demonstradas por Boulant *et al* (1994), que relataram que a estimulação vagal causa relaxamento do EEI, porém o bloqueio colinérgico ou adrenérgico não altera a função do EEI. Além disso, o relaxamento do EEI é bloqueado pelo L-nitro arginina metil-ester (L-NAME), inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela síntese do óxido nítrico (NO) (Figura 1).



**Fig 01. Circuito neural que determina o RTEEI decorrente da distensão gástrica.**

É bem verdade que o NO, originalmente identificado por Furchgott (1984) como um fator vasodilatador dependente de endotélio, foi logo evidenciado por suas propriedades relaxantes também da musculatura lisa do trato gastrintestinal. No caso do estiramento do estômago, o aumento em sua complacência decorre principalmente da inibição reflexa por via vagovagal da musculatura lisa do fundo e do corpo gástrico. Tal fenômeno envolve neurotransmissão NANC, possivelmente do tipo VIPérgica ou nitrérgica (ERGUN *et al*, 2001), pois a inibição da enzima NOS aumenta a pressão intragástrica. Do mesmo modo, a administração endovenosa de L-NAME aumenta a pressão basal do EEI e diminui a taxa de RTEEI induzido pela distensão gástrica em cães, efeitos estes revertidos pela administração da L-Arginina, substância que inativa o L-NAME ao competir pela NOS. Estes resultados confirmam estudos anteriores que demonstraram o papel do NO sobre o tônus basal do EEI, utilizando tanto inibidores da NOS como doadores de NO (BOULANT *et al*, 1994).

Além disso, estudos recentes demonstram que o relaxamento e a hiperpolarização da musculatura lisa do trato gastrointestinal, causado pelo mediador inibitório NANC, liberado no plexo mientérico, envolve vários mecanismos intracelulares como o aumento de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) formado a partir de trifosfato de guanosina (GTP) ou aumento de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), segundos mensageiros que podem inclusive atuar em diferentes canais para potássio ( $K^+$ ) desencadeando à hiperpolarização (MARTINS *et al*, 1995; MURRAY *et al*, 1995; SANDERS, 2000; VANNESTE *et al*, 2007). (Figura 2)



**Fig. 2 – Relaxamento da musculatura lisa do trato gastrointestinal, causado pelo mediador inibitório NANC, liberado no plexo mientérico, envolvendo vários mecanismos intracelulares.**

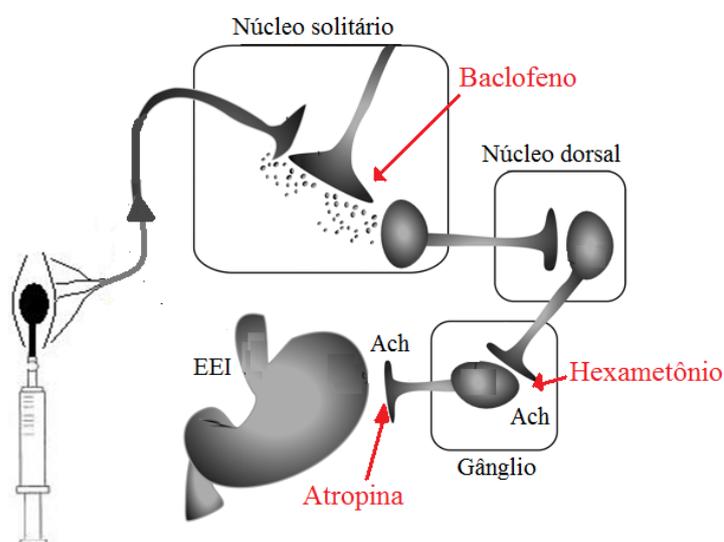
Muito interessante foi a observação feita por Ahmed Shafik (2003), que relatou uma alta incidência de constipação intestinal em pacientes com acalásia esofágica, chamando a atenção para possível existência de uma relação entre as duas condições, denominando de “síndrome esôfago-retal”. Este relacionamento incitou necessárias investigações para responder as questões por ele mencionadas.

Corroborando com este fato, notou-se que alguns pacientes com síndrome do cólon irritável e com constipação intestinal, queixavam-se, frequentemente, de sintomas no trato gastrointestinal superior (NEUMANN, 2008; ZARATE, 2009). De fato, cerca de 25 a 51% dos pacientes com tais enfermidades apresentam o RGE (NEUMANN, 2008).

Fazendo parte deste contexto, recentemente, foi demonstrado que o reto é outra região de origem do arco reflexo responsável em desencadear o RTEEI, além das reconhecidas regiões do estômago e da faringe. De fato, em avaliação da atividade do EEI em cães anestesiados, Neves *et al* (2010) observaram, através dos registros de manometria,

que houve um aumento da taxa de RTEEI após a distensão mecânica do reto. Deste modo, indicando que o relaxamento do EEI sem deglutição pode ser deflagrado por um reflexo retoesofágico.

Nesta direção Graça *et al* (2010) demonstraram que a ocorrência do RTEEI induzida pela distensão retal foi sensível ao pré-tratamento com atropina e baclofeno, porém não o foi ao pré-tratamento com hexametônio, indicando haver participação GABAérgica central e sem o envolvimento de receptores ganglionares nicotínicos neste fenômeno (Figura 3).



**Fig. 3 – Modulação central do RTEEI decorrente da distensão retal em cães (GRAÇA *et al*, 2010).**

A notável observação de Graça *et al*, levantou questionamentos sobre a modulação deste fenômeno ainda sem descrição na literatura. O NO estaria envolvido neste RTEEI na vigência da distensão retal em cães, como já descrito na distensão gástrica? Com isso, a necessária investigação da participação da via nitrérgica na elevação da taxa de RTEEI em cães anestesiados secundário a distensão retal (DR) foi o objetivo deste estudo.

## **2 – OBJETIVO**

### **2.1- OBJETIVO GERAL**

Avaliar a participação da via nitrérgica no aumento da taxa de RTEEI decorrente da DR em cães anestesiados.

### **2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

2.2.1- Estudar a participação do óxido nítrico no aumento da taxa de RTEEI decorrente da DR em cães anestesiados mediante o pré-tratamento com L-NAME (inibidor da NOS não seletivo), seguido ou não de L- Arginina (substrato da NOS);

2.2.2- Estudar a possível participação da via de transdução do sinal mediada pela guanilato ciclase no aumento da taxa de RTEEI decorrente da DR em cães anestesiados, mediante o pré-tratamento com azul de metileno (um inibidor da guanilato ciclase);

2.2.3- Estudar a participação dos canais para  $K^+$  dependentes de ATP no aumento da taxa de RTEEI decorrente da DR em cães anestesiados mediante o pré-tratamento com glibenclamida (bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao ATP).

### **3 – MÉTODO**

#### **3.1 – ANIMAIS**

Foram utilizados 21 cães, sem raça definida, machos, pesando entre 10 a 15 Kg, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses da Secretaria de Saúde e Ação Social da Prefeitura Municipal de Sobral-CE, mantidos em canis individuais sob dieta para cães (Pedigree Champ<sup>®</sup>) e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos anestésicos e terapêuticos foram conduzidos de acordo com o guia da Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório - SBCAL (antigo COBEA), sob supervisão e orientação de um médico veterinário, após aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa com animais da Faculdade de Medicina da UFC. (protocolo n<sup>o</sup>: 009.05.10, em 11 de agosto de 2010).

Antes dos experimentos os animais permaneceram em jejum por 12 horas, porém, foi permitido livre acesso à água até 2h antes dos procedimentos, sendo administrado, na noite anterior 01 bisnaga de solução retal de enema (Minilax<sup>®</sup> Eurofarma, São Paulo, Brasil) com vistas ao esvaziamento cólico dos animais.

Após os experimentos os animais eram sacrificados, utilizando-se método indolor, sendo praticado sempre distante de outros animais e fora da área de manutenção. O técnico responsável pela eutanásia era especializado em animais de laboratório para que pudesse interceder na ocorrência de qualquer problema

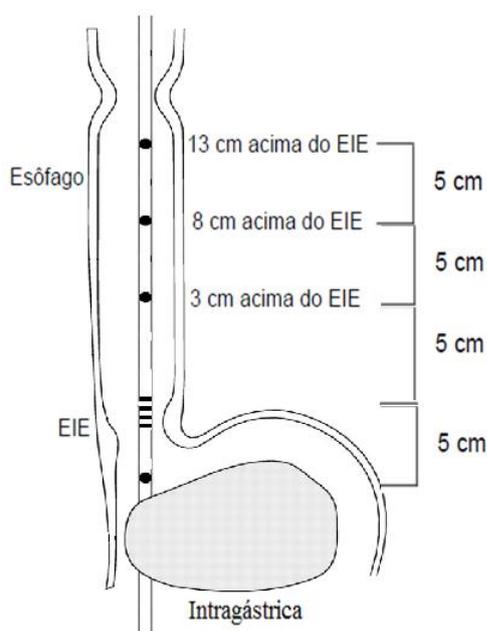
#### **3.2- PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

##### **3.2.1 –ANESTESIA**

No início dos experimentos todos os animais foram anestesiados com administração intravenosa de cetamina (10 mg.Kg<sup>-1</sup>, UNIVET<sup>®</sup> São Paulo, Brasil) e xilazina (20 mg.Kg<sup>-1</sup> BAYER<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), sendo realizado uma dose de reforço na mesma concentração quando necessária em alguns animais em virtude do prolongado tempo de experimento (120 mim).

### 3.2.2 – POSIONAMENTO DA SONDA DE MANOMETRIA

Após os animais atingirem o plano anestésico, foi introduzida, por via oral, uma sonda de 08 canais para aquisição das pressões gástrica, do corpo esofágico e do EEI. Sendo que quatro canais espirais, dispostos a 0,5 cm entre si, prestar-se-iam ao monitoramento das variações de pressão do EEI. Outros três canais situados a 03, 08 e 13 cm proximal ao EEI serviriam para medir as pressões no corpo esofágico e a peristalse esofágica, enquanto que um canal situado a 05 cm distalmente do EEI serviria para monitorar a pressão intragástrica. (Figura 4).



**Fig. 4 – Posicionamento da sonda de manometria para os registros da taxa de RTEEI em cães.**

Para os registros manométricos, os animais foram colocados em posição de decúbito lateral direito. Os quatro canais espirais, dispostos a 0,5 cm entre si da sonda foram posicionados inicialmente no estômago. A sonda então foi tracionada de forma gradual até que estes registrassem a pressão mais alta, que corresponderia anatomicamente ao EEI. O canal mais distal permaneceu no interior da câmara gástrica, registrando a pressão gástrica durante todo o exame. O exame teve duração total de 120 minutos.

A sonda foi acoplada ao sistema de manometria esofágica de perfusão líquida ( $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) com alta pressão e baixa complacência (Viote System® - Brasil), para o correto posicionamento da sonda de acordo com os registros das pressões gerados pelo corpo do esôfago, EEI e estômago proximal, visualizados em microcomputador através do sistema

de captura e armazenamento digital (PowerLab System - ADInstruments™) (Figura 5) de acordo com Graça *et al* (2010).

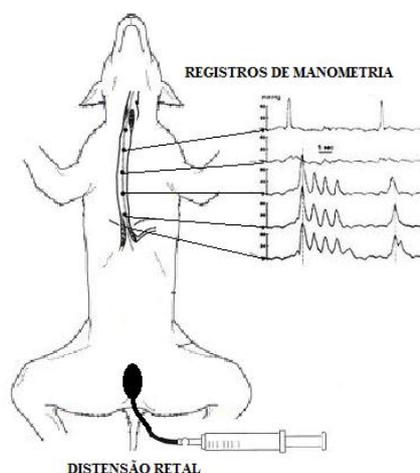


Fig. 5 – Representação esquemática dos registros da taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados.

### 3.2.3 – POSIONAMENTO DA Sonda RETAL

O posicionamento (a cerca de 6 cm da margem anal, ilustrado na figura 5, de acordo com Yong Lei *et al* (2005) da sonda de polietileno por via retal provida na sua extremidade distal de um balão de látex com 10 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro (desinsuflado).

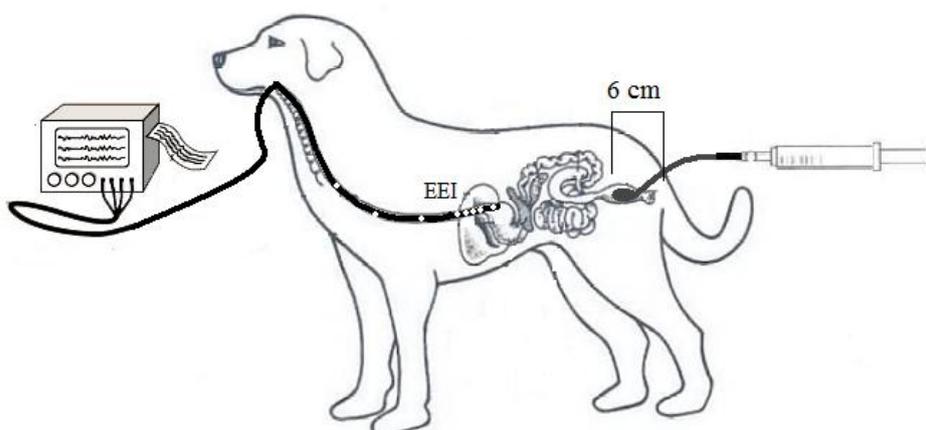


Fig. 6- Sonda retal posicionada a cerca de 6 cm da margem anal de acordos com Yong Lei *et al*.

### **3.2.4 – REGISTRO DO PERÍODO BASAL**

Após o procedimento anestésico e o correto posicionamento das sondas, procedeu-se o registro manométrico dos primeiros 30 minutos considerados o período basal para avaliação da motilidade espontânea. Foram verificadas as medidas de pressão do corpo esofágico, do EEI e do estômago. Todos os 21 cães do experimento tiveram os registros do período basal, ou seja, do período sem tratamento farmacológico e sem distensão retal. E somente após este período, os animais foram distribuídos em diferentes grupos farmacológicos e no grupo controle que recebeu solução salina intravenosamente.

### **3.2.5 – INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE INIBIDORES DA VIA NITRÉRGICA E DE CANAIS PARA POTÁSSIO.**

Para o estudo da investigação da eventual participação da via nitrérgica, bem como da possível via de transdução intracelular responsável pela elevação da taxa de RTEEI decorrente da DR, após os 30 minutos do período basal, os animais foram distribuídos em 5 grupos de diferentes tratamentos farmacológicos por via intravenosa (Figura 7):

- 05 cães foram tratados por via intravenosa com salina 0,15 M (1 mL.Kg<sup>-1</sup>) sendo estes considerados o grupo controle.
- 04 cães foram tratados como um inibidor não específico da enzima NOS, L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>, SIGMA<sup>®</sup> St. Louis, USA),
- 04 cães foram tratados com L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>) + L-Arginina (200 mg.Kg<sup>-1</sup>, SIGMA<sup>®</sup> St. Louis, USA).
- 04 cães foram tratados com o inibidor da enzima Guanilato Ciclase, azul de metileno (3 mg.Kg<sup>-1</sup>, SIGMA<sup>®</sup> St. Louis, USA).
- 04 cães receberam o bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao ATP, glibenclamida (1 mg.Kg<sup>-1</sup>, SIGMA<sup>®</sup> St. Louis, USA).

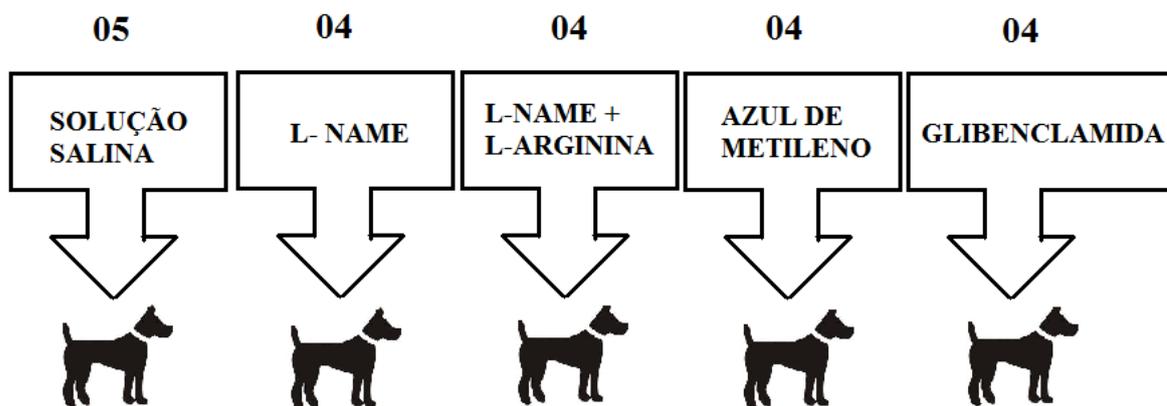


Fig. 7 – Representação esquemática dos grupos experimentais utilizados no estudo.

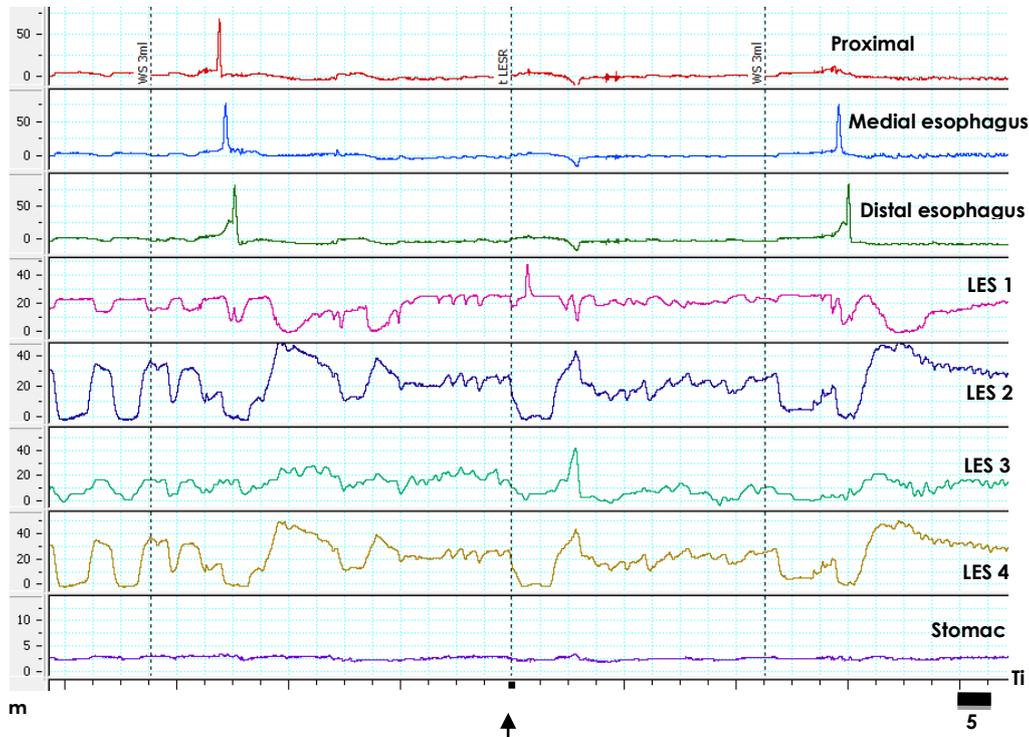
Em virtude dos diferentes tempos de meia-vida dos fármacos, aguardou-se um período de 45 minutos após a administração intravenosa nos cães, para que se desse início ao protocolo de distensão retal.

### 3.2.6 – PROTOCOLO DE DISTENSÃO RETAL E REGISTROS DESTE PERÍODO.

A distensão retal foi realizada com auxílio de uma seringa de 60 ml. Injetou-se ar a uma taxa de 10 ml/s, perfazendo um volume de 5 mL.Kg<sup>-1</sup>. O balão permaneceu insuflado durante 45 min. Vale salientar que, o volume de distensão máxima foi limitado a 60 ml, acima do qual os sinais de desconforto foram observados na maioria dos cães em estudo anterior de Graça *et al* (2010)

Ao longo dos 45 minutos finais a DR foi mantida e os parâmetros de pressão do corpo esofágico, do EEI e gástrica foram adquiridos, sendo considerado este o período de DR. Sendo que, as taxas de RTEEI foram calculadas conforme descrito por Graça *et al* (2010).

Os registros dos RTEEIs foram considerados quando a características do relaxamento do EEI, respeitavam as descrições de Mittal et al (1995).



**Fig. 8 - Exemplo de um registro individual experimental de RTEEI. Ver RTEEI (↑). WS – deglutição.**

Embora a latência do início do primeiro RTEEI, após a DR não ter qualquer relevância clínica, foi determinado como um parâmetro adicional refletindo mudanças no desencadeamento de RTEEI.

A pressão basal do EEI foi definida como a média da pressão entre os 04 canais do EEI.

O delineamento experimental é ilustrado abaixo na figura 8.

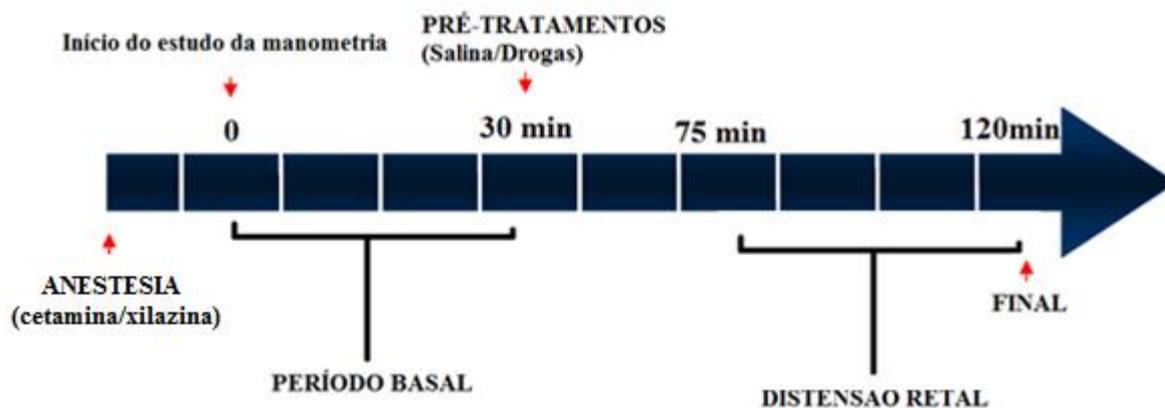


Fig. 9 - Delineamento experimental para a investigação farmacológica da participação da via nitrérgica no aumento da taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados.

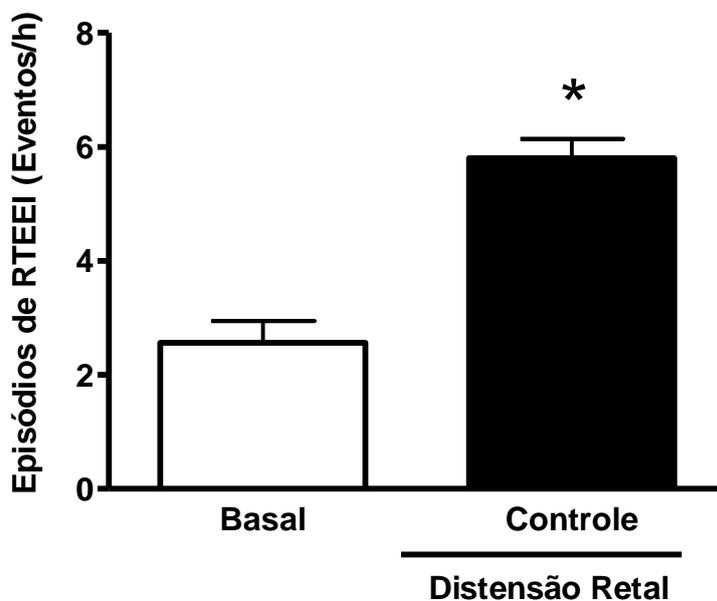
### 3.3- ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os valores das taxas de RTEEI, pressão do EEI, latência e duração do RTEEI foram agrupados em período basal, tratamentos farmacológicos e controles (salina) e foram expressos como média e desvio padrão, após utilização de ANOVA para medidas repetidas dos animais intragrupos e intergrupos, a fim de podermos comparar as diferenças observadas em cada parâmetro estudado seguido do teste Student-Newman-Keuls. Diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas significativas.

## 4- RESULTADOS

### 4.1- EFEITOS DA DISTENSÃO RETAL SOBRE A TAXA DE RTEEI EM CÃES.

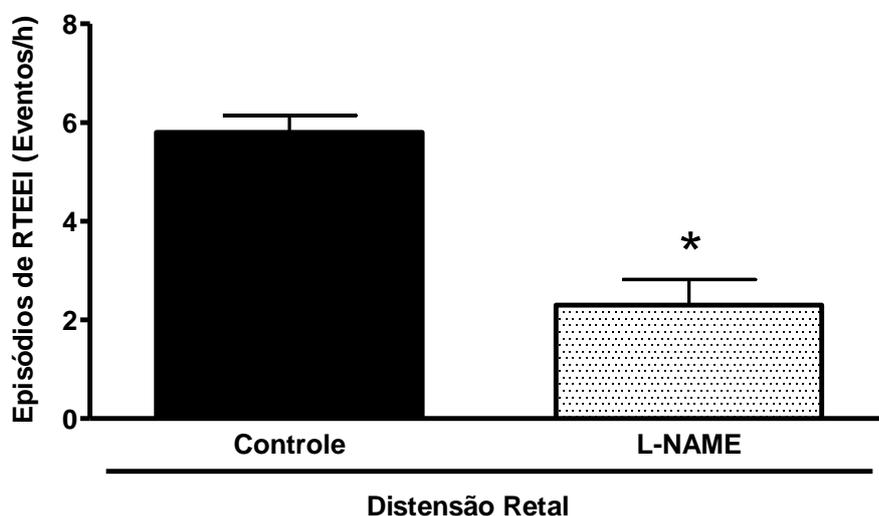
A figura 10 resume os resultados dos efeitos da distensão retal sobre a taxa de RTEEI em cães anestesiados. Quando se compara a taxa de RTEEI obtida durante os 30 primeiros minutos em todos os animais (período basal) à taxa de RTEEI observada nos animais que receberam solução salina iv. e distensão retal (grupo controle), observa-se elevação na taxa de RTEEI neste grupo de animais ( $2,56 \pm 0,38$  RTEEI/h vs.  $5,8 \pm 0,34$  RTEEI/h,  $*p < 0,05$ ).



**Fig. 10 - Efeitos da distensão retal sobre a taxa de RTEEI em cães anestesiados.** Taxa de RTEEI em todos os cães nos 30 primeiros minutos (Basal,  $n=21$ , □) e grupo controle que recebeu solução salina e distensão retal ( $n=5$ , ■). As barras verticais representam a média dos valores de RTEEI de cada grupo estudado e as linhas verticais indicam o erro padrão da média.  $* p < 0,05$  vs. basal. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls.

#### 4.2- EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO FARMACOLÓGICO COM L-NAME SOBRE A TAXA DE RTEEI DECORRENTE DA DR EM CÃES ANESTESIADOS.

A figura 11 resume os resultados dos efeitos do pré-tratamento (i.v. *bolus*) com L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>), sobre a taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados. Quando se compara a taxa de RTEEI obtida durante a DR nos animais pré-tratados com L-NAME à taxa de RTEEI observada nos animais controle (salina), observa-se diminuição na taxa de RTEEI neste grupo de animais (2,3±0,52 RTEEI/h vs. 5,8 ± 0,34 RTEEI/h, \*p<0,05).



**Fig. 11 - Efeitos do pré-tratamento com L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>) sobre a taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados.** Taxa de RTEEI em cães pré-tratados com L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>, n=4, □) e grupo controle (n=5, ■). As barras verticais representam a média dos valores de RTEEI de cada grupo estudado e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. \* p<0,05 vs. controle (salina). Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls.

#### 4.3- EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO FARMACOLÓGICO COM L-NAME + L-ARGININA SOBRE A TAXA DE RTEEI DECORRENTE DA DR EM CÃES ANESTESIADOS.

A figura 12 demonstra os resultados dos efeitos do pré-tratamento (i.v. bolus) com L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>) + L-Arginina (200 mg.Kg<sup>-1</sup>), sobre a taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados. Quando se compara a taxa de RTEEI obtida durante a DR nos animais pré-tratados com L-NAME+L-Arginina à taxa de RTEEI observada nos animais controle, observa-se que não houve diferença na taxa de RTEEI entre estes grupos de animais (6,5±0,6 RTEEI/h vs. 5,8±0,6 RTEEI/h, #, p<0,05).

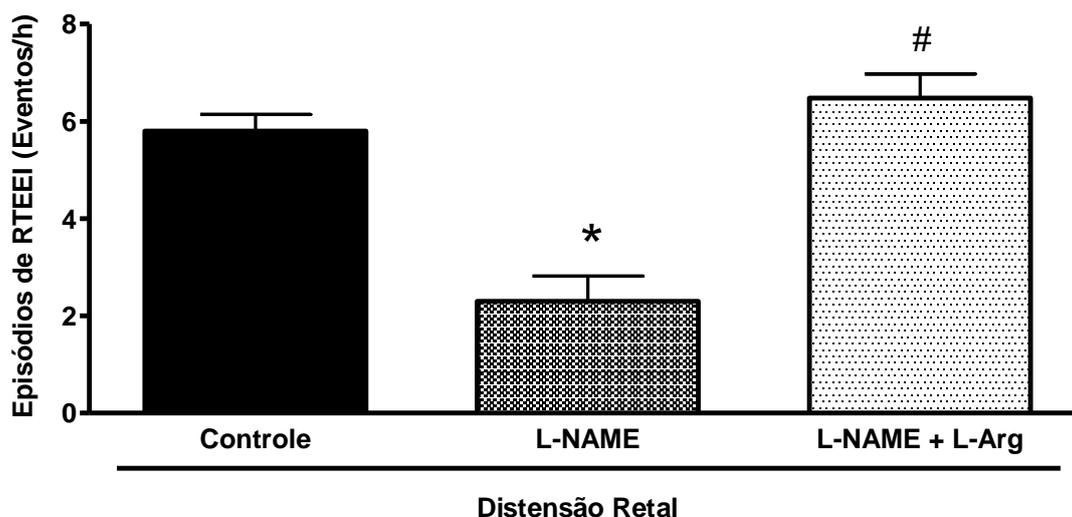


Fig. 12 - Efeitos do pré-tratamento com L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>) + L-Arginina (200 mg.Kg<sup>-1</sup>) sobre a taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados. Taxa de RTEEI em cães pré-tratados com L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>, n=4, ▣), grupo controle (n=5, ■) e L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>) + L-Arginina (200 mg.Kg<sup>-1</sup>, n=4, ▤). As barras verticais representam a média dos valores de RTEEI de cada grupo estudado e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. # p<0,05 vs. controle. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls.

Já a tabela 01 resume os resultados dos efeitos do pré-tratamento com L-NAME e L-NAME + L-Arginina sobre a latência e a duração dos RTEEI bem como as pressões do EEI e gástrica em cães submetidos a DR.

Quando se compara a média, em minutos, da latência para o surgimento do primeiro evento de RTEEI obtido durante a distensão retal nos animais pré-tratados com L-NAME à latência obtida no grupo controle, observa-se que houve um aumento destes tempos nos animais pré-tratados com L-NAME, já nos animais pré-tratados com L-NAME + L-Arginina a latência foi discretamente menor que o grupo que recebeu apenas L-NAME.

Do mesmo modo, ao se comparar a duração em segundos dos RTEEI encontrada nos grupos pré-tratados com L-NAME aos animais controles, observa-se que houve uma redução desta duração no grupo de animais pré-tratados com L-NAME, porém a adição de L-Arginina não modificou este parâmetro em relação ao grupo L-NAME .

Ainda na Tabela 01, pode-se observar um aumento da pressão no EEI dos animais pré-tratados com L-NAME e sem alteração significativa das pressões no EEI dos animais pré-tratados com L-NAME+L- Arginina.

**Tabela 1 – Efeito do pré-tratamento com L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>) + L-Arginina (200 mg.Kg<sup>-1</sup> i.v.) na latência do 1<sup>a</sup> RTEEI, duração do RTEEI e pressões do EEI e gástrica de cães submetidos a DR.**

Protocolos	Latência 1 <sup>o</sup> . RTEEI (min)	Duração (s)	Pressão (mmHg)	
			EEI	Gástrica
Controle (5)	6,8±2,5	42,5±5,4	20,3±2,5	2,7±1,7
L-NAME (4)	32,8±2,5*	22,5±5,4*	35±3,2*	7,5±1,7*
L-NAME+L- ARG (4)	15,8±2,5#Ψ	22,5±5,4#	25±3,6Ψ	3,5±1,9Ψ

\*, p<0,05 vs. controle ( teste Student-Newman-Keuls)

#, p<0,05 vs. controle ( teste Student-Newman-Keuls)

Ψ, P<0,05 vs. L-NAME ( teste Student-Newman-Keuls)

(n) – número de animais

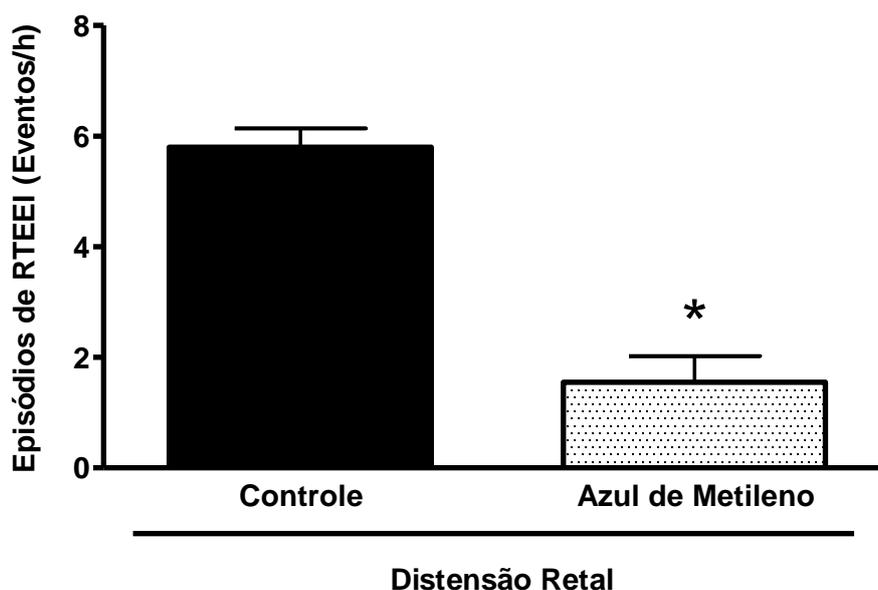
L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.v.)+ L-Arginina (200 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.v.)

RTEEI – relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior

EEI - esfíncter esofágico inferior

#### 4.4- EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO FARMACOLÓGICO COM AZUL DE METILENO (AM) SOBRE A TAXA DE RTEEI DECORRENTE DA DR EM CÃES ANESTESIADOS.

A figura 13 ilustra os resultados dos efeitos dos pré-tratamentos (i.v. *bolus*) com AM (3 mg.Kg<sup>-1</sup>), sobre a taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados. Quando se compara a taxa de RTEEI obtida durante a DR nos animais pré-tratados com AM à taxa de RTEEI observada nos animais controles, observa-se que houve diminuição na taxa de RTEEI no grupo de animais pré-tratados com AM (1,56±0,5 RTEEI/h vs. 5,8±0,34 RTEEI/h, \*p<0,05).



**Fig. 13 - Efeitos do pré-tratamento com AM (3 mg.Kg<sup>-1</sup>) sobre a taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados.** Taxa de RTEEI em cães pré-tratados com AM (3 mg.Kg<sup>-1</sup>, n=4, □) e controle (n=5, ■). As barras verticais representam a média dos valores de RTEEI de cada grupo estudado e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. \*p<0,05 vs. controles. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls.

A tabela 02 mostra a latência e a duração dos RTEEI bem como as pressões do EEI nestes animais. Quando se compara a média, em minutos, da latência para o surgimento do primeiro evento de RTEEI obtido durante a DR nos animais controle, o tratamento com AM aumentou (\* $p < 0,05$ ) a latência para ocorrência do RTEEI durante DR. Além disto, também em relação ao grupo controle, o AM preveniu o aumento do período de RTEEI induzido pela DR. Porém, o tratamento com AM aumentou a pressão do EEI e do estômago durante a DR.

**Tabela 2 – Efeito do pré-tratamento com AM ( $3\text{mg.Kg}^{-1}$ , i.v.) na latência do 1ª RTEEI, duração do RTEEI e pressões do EEI e gástrica de cães submetidos a DR.**

Grupos	Latência 1º. RTEEI (min)	Duração (s)	Pressão (mmHg)	
			EEI	Gástrica
Controle (5)	6,8±2,5	42,5±5,4	20,3±2,5	2,7±1,7
AM (4)	22,7±3,5*	21,5±7,4*	35±3,8*	7,5±1,7*

\*,  $p < 0,05$  vs. controle (teste Student-Newman-Keuls)

(n) – número de animais

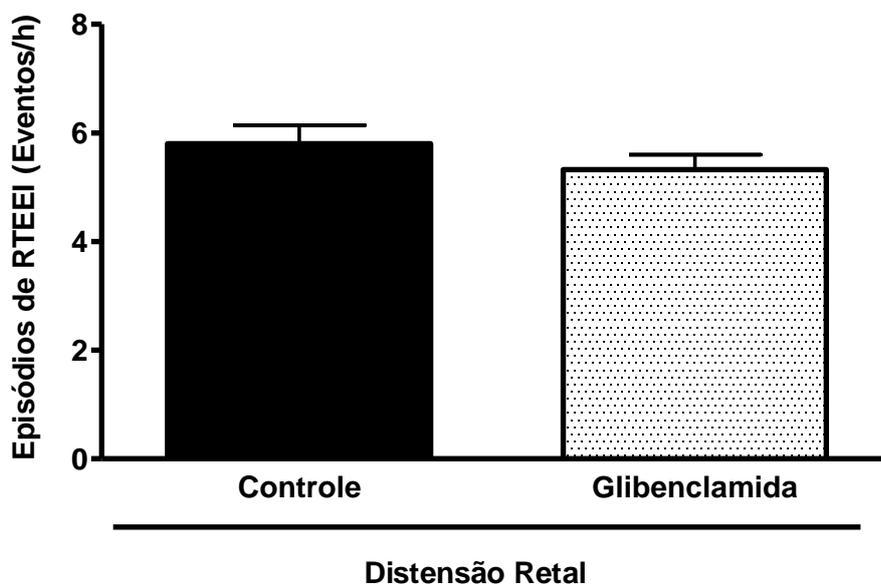
AM - Azul de metileno ( $3\text{ mg.Kg}^{-1}$ , i.v.)

RTEEI – relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior

EEI - esfíncter esofágico inferior

#### 4.5 - EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO FARMACOLÓGICO COM GLIBENCLAMIDA SOBRE A TAXA DE RTEEI ADVINDO DA DR EM CÃES ANESTESIADOS.

A figura 14 resume os resultados dos efeitos do pré-tratamento (i.v. *bolus*) com glibenclamida (1 mg.Kg<sup>-1</sup>), sobre a taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados. Ao considerar a taxa de RTEEI no grupo controle, observa-se que o tratamento com glibenclamida não induziu variações significativas nos valores de RTEEI (5,3±0,3 RTEEI/h vs. 5,8±0,34 RTEEI/h, \*p<0,05).



**Fig. 14 - Efeitos do pré-tratamento com Glibenclamida (1 mg.Kg<sup>-1</sup>) sobre a taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados.** Taxa de RTEEI de cães pré-tratados com Glibenclamida (1 mg.Kg<sup>-1</sup>, n=4, □) e controle (n=5, ■). As barras verticais representam a média dos valores de RTEEI de cada grupo estudado e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. \*p<0,05 vs. controle. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls.

A tabela 03 mostra a latência e a duração dos RTEEI bem como as pressões do EEI nestes animais. Quando se compara a média em minutos da latência para o surgimento do primeiro evento de RTEEI obtido durante a distensão retal nos animais pré-tratados com salina, houve um aumento da latência para o RTEEI no grupo de animais tratados com glibenclamida. Além disto, o tratamento com este inibidor de canais para K<sup>+</sup> preveniu o longo período de duração dos RTEEI induzido pela DR.

Ainda na Tabela 03, pode-se observar que não houve diferença da pressão no EEI dos animais pré-tratados com glibenclamida.

**Tabela 3 – Efeito do pré-tratamento com glibenclamida (1mg.Kg<sup>-1</sup>, i.v.) na latência do 1ª RTEEI, duração do RTEEI e pressões do EEI e gástrica de cães submetidos a DR.**

Grupos	Latência 1º. RTEEI (min)	Duração (s)	Pressão (mmHg)	
			EEI	Gástrica
Controle	6,8±2,5	42,5±5,4	20,3±2,5	2,7±1,7
Glibenclamida	21,8±2,7*	22,5±5,9*	25±3,2	4,5±1,7

\*, p<0,05 vs. controle (teste Student-Newman-Keuls)

(n) – número de animais

Glibenclamida (1 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.v.)

RTEEI – relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior

EEI - esfíncter esofágico inferior

## 5- DISCUSSÃO

O controle da motilidade esofágica depende dos mediadores clássicos, acetilcolina e também de vários outros neurotransmissores conhecidos como mediadores NANC (Furness e Costa 1987). Várias substâncias identificadas no sistema nervoso mioentérico de mamíferos podem ser liberadas e participar do controle da motilidade esofágica por agir diretamente sobre o músculo liso do EEI, causando contração ou relaxamento, ou indiretamente, modulando a liberação do mediador inibitório ou excitatório (Furness e Costa 1987).

Estudou-se a participação da via nitrérgica na elevação da taxa de RTEEI após distensão retal em cães anestesiados. Foi demonstrado que o pré-tratamento farmacológico com L-NAME determinou uma inibição do aumento da taxa de RTEEI proveniente da DR. Contudo, o pré-tratamento com L-Arginina reverteu este evento. Além disso, o pré-tratamento com azul de metileno também preveniu a elevação da taxa de RTEEI advindos da DR. Foi demonstrado ainda, que nos animais pré-tratados com glibenclamida a DR não apresentou alterações significativas na taxa de RTEEI em relação ao respectivo controle. Portanto, postula-se que o óxido nítrico participe do aumento da taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados através do segundo mensageiro GMPc.

Para que se pudesse estudar a participação do óxido nítrico no aumento da taxa de RTEEI decorrente da DR fazia-se necessário o pré-tratamento dos cães com L-NAME, um inibidor da NOS não seletivo, isoladamente ou seguido do tratamento com L- Arginina, um substrato da NOS. Assim como, para o estudo da via de transdução do sinal mediada pela guanilato ciclase, fez-se necessário o pré-tratamento com um fármaco inibidor da guanilato ciclase, o azul de metileno. Já, ao estudar a participação dos canais para  $K^+$  dependentes de ATP, o pré-tratamento com glibenclamida, um bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao ATP, foi necessário.

Mais do que isso, levando em consideração a administração intravenosa, a meia-vida sérica, picos de concentração plasmática, metabolização e excreção dos fármacos utilizados no experimento, a fidelidade ao delineamento experimental foi para que o efeito da distensão retal acontecesse na vigência da ação dos fármacos administrados.

Inicialmente, acreditava-se que o fator patogênico primário da DRGE era a deslocação proximal da junção esofagogástrica, representada pela hérnia hiatal. Em 1971, Cohen e Harris sugeriram que a pressão basal baixa de EEI era mais importante para o desenvolvimento crônico da DRGE (COHEN, 2006).

Com o advento da manometria, considerado o método de eleição para a avaliação qualitativa e quantitativa da atividade motora esofágica e do EEI pôde-se detectar uma onda peristáltica no esôfago trafegando em direção ao estômago seguido de um relaxamento do EEI (JONES *et al*, 2002). Sem que houvesse nenhuma deglutição, o EEI relaxava espontaneamente por um período prolongado e, neste momento, ocorria uma queda no pH esofágiano, caracterizando um episódio de RGE, a esse processo denominou-se de RTEEI (JONES *et al*, 2002). Assim, o fator principal da DRGE foi atribuído ao RTEEI (GONZALEZ *et al*, 2000).

Em 1964, foram observados pela primeira vez o RTEEI por McNally *et al*, mas só em 1980 sua relação com DRGE foi descrita com detalhes (CASTELL, 2004). Considerado o fator responsável pela maioria dos episódios de refluxo em pessoas saudáveis e em pacientes com DRGE (RICHTER, 2004). O RTEEI consiste em uma queda abrupta na pressão do EEI até o nível da pressão intragástrica que não é desencadeado pela deglutição. A duração é, tipicamente, maior do que a de um relaxamento induzido pela deglutição, durando de 10 a 45 segundos. Neste sentido, o presente estudo ao utilizar um sistema de manometria perfusional de baixa complacência, com sonda de 08 canais, sendo 04 canais destinados ao EEI, ratificou o estudo de Neves *et al* (2010) ao observar também que a DR desencadeou relaxamentos que perduraram por cerca de 42 segundos, tempo de relaxamento bem superior ao encontrado em animais não distendidos (período basal), caracterizando um RTEEI induzido pela DR.

Estudos mais recentes têm enfatizado essa importância do aumento da taxa de RTEEI como o principal mecanismo do RGE; no entanto, não se resume a uma fraqueza relativa do EEI, pois há DRGE em pacientes que apresentam EEI hipertônicos (NEBEL e FORNES, 1976; KAHRILAS, 2008). De fato, levando-se em consideração os valores da pressão do EEI durante a DR no presente estudo, apesar de encontrar-se em níveis fisiológicos (HERBELLA *et al*, 2007), inclusive valores que chegam a ser 20 vezes superiores a pressão intragástrica, apesar disto caracteriza-se um RTEEI, através do tempo de relaxamento do EEI dos animais submetidos a DR ser bem superior ao encontrado nos animais não submetidos a DR (NEVES *et al*, 2010).

É bem verdade que o tônus do EEI é, primariamente, miogênico. Contudo, o relaxamento do EEI em resposta a deglutição parece ser mediada por estímulo neuronal (GONZALEZ, 2000). Este é um mecanismo absolutamente fisiológico e pode ocorrer em pacientes com RGE ou não, permitindo a eliminação de gás proveniente de aerofagia. Mas

em alguns indivíduos, além do ar também reflui líquido de natureza ácida ou não. Naqueles indivíduos em que reflui muito líquido ocorre uma enfermidade por RGE.

O estudo de Ahmed Shafik (2003) chamou a atenção para possível existência de uma relação entre condições clínicas do esôfago e do trato gastrointestinal baixo, denominando de “síndrome esôfago-retal”, pois, verificou-se uma alta incidência de constipação intestinal em pacientes com acalásia esofágica. Além disso, outros estudos notaram que os pacientes com síndrome do cólon irritável e com constipação intestinal, queixavam-se, frequentemente, de sintomas no TGI superior (NEUMANN, 2008; ZARATE, 2009). De fato, cerca de 25 a 51% dos pacientes com tais enfermidades apresentam o RGE (NEUMANN, 2008).

A falta de informações disponíveis na literatura a cerca da correlação da dismotilidade esofágica e retardo no trânsito colônico ou mesmo a co-existência de distúrbios evacuatórios que, mediante retenção de material fecal e distensão retal, poderia potencialmente influenciar a motilidade esofágica via reflexo reto-esofágico inibitório, estimulou necessárias investigações científicas a respeito desse tema.

Baseando-se nisto e na tentativa de dirimir tais questões sobre a interação reto-esofágica, Neves *et al* (2010) verificaram que a distensão mecânica do reto em cães anestesiados elevou a taxa de RTEEI, além disso, quando comparados aos respectivos valores basais, a distensão retal determinou redução no período para o início do primeiro RTEEI (latência), bem como um aumento do tempo de duração do RTEEI durante a DR. Tais resultados reforçaram a hipótese do reflexo retoesofágico.

Dando continuidade neste estudo foi demonstrado também, mediante o tratamento com baflofeno, que há participação GABAérgica central para tal aumento da taxa de RTEEI decorrente da distensão retal, porém tal evento não foi sensível ao hexametônio, excluindo, presumidamente, o envolvimento de receptores nicotínicos neste fenômeno (GRAÇA *et al*, 2010). Desse modo, as evidências sugerem que o reflexo retoesofágico é mediado inicialmente por reflexo neurológico, vindo depois o mecanismo hormonal e finalmente a ação dos quimiorreceptores.

No entanto, até onde se pode pesquisar não foi encontrado relatos da via NANC e a possível transdução intracelular responsável pelo RTEEI induzido pela DR. Portanto, como os possíveis mecanismos ainda estão por ser elucidados, decidiu-se avaliar a possível participação da via NANC, nitrérgica, na regulação da motilidade esofágica frente à DR em cães anestesiados.

Entretanto, sabemos que tais estudos são difíceis de ser conduzidos, uma vez que nem sempre temos o número de pacientes necessários, devido à discordância ou desistência do paciente. Desse modo, vários modelos experimentais para pesquisa da motilidade esofágica têm sido relatados. Tendo em vista que a utilização de modelos experimentais é amplamente aceita, pois os mecanismos desencadeantes e reguladores do RGE não parecem diferir daqueles encontrados em humanos (SCHANAIDER, 2004).

Schanaider (2004) ressaltou outro importante fator nesses experimentos, a utilização do cloridrato de cetamina cuja dose varia entre 10 a 100 mg.kg<sup>-1</sup>, dependendo da via de administração e da associação deste com outros anestésicos, produz um tipo de anestesia dissociativa entre o córtex e o tálamo. Causa analgesia, sem perda total dos reflexos protetores. Já a xilasina, na dose de 5 a 20 mg.kg<sup>-1</sup>, também deve ser administrada junto com outro anestésico (ex: cetamina), pois atua, principalmente, na imobilização do animal. A combinação cetamina/xilasina, é uma das mais utilizadas em animais de pequeno porte e mantém o animal em plano anestésico de 60 a 120 minutos, com possibilidade de reforço da dose, caso prolongue o tempo do experimento.

Como vários trabalhos descrevem o RTEEI como sendo um reflexo que se inicia no estômago, que quando distendido, por meio da ativação de mecanorreceptores no do fundo e corpo gástrico, enviam um sinal aferente ao centro da deglutição no tronco encefálico. Desta região parte um sinal eferente por via vagal que fará sinapse com neurônios do plexo mioentérico, tais estruturas são responsáveis, por exemplo, em modular a atividade do EEI através da liberação inibitórios do tipo NANC (FURNESS e COSTA, 1987; KATSCHINSKI *et al*, 1996).

Inclusive, várias doenças com alterações da motilidade gastrointestinal, como acalasia idiopática do esôfago, estenose hipertrófica do piloro, doença de Chagas e diabetes mellitus, podem apresentar alterações da inervação inibitória NANC (MEREARIN *et al*. 1993, VANDERWINDEN *et al*, 1993, GOCKEL *et al*, 2008).

Em verdade tais mediadores NANC, envolvidos na inibição do músculo liso do EEI, são descritos desde os trabalhos realizados em meados do século passado, que demonstraram que a estimulação dos nervos mioentéricos causava inibição da musculatura lisa do jejuno de cobaia, não inibidos nem por bloqueadores adrenérgicos, nem por bloqueadores colinérgicos (BURNSTOCK *et al*, 1963).

Levando em consideração o sistema nervoso entérico de mamíferos, já foram identificados vários mediadores ou candidatos a mediador inibitório NANC. Os que são liberados por ativação dos neurônios do sistema nervoso entérico responsável pela resposta

elétrica de hiperpolarização associada ao relaxamento da musculatura lisa do trato gastrointestinal, são descritos na literatura principalmente o trifosfato de adenosina (ATP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e o NO (COCKSS *et al*, 1999; LOWICKA *et al*, 2007).

Neste sentido, o NO é um dos mediadores ou neurotransmissores inibitórios principais do TGI. O EEI é um músculo liso que reconhecidamente apresenta-se sob o controle inibitório do NO. Estudos demonstram a liberação de NO em resposta à estimulação de neurônios NANC do EEI. Experimentos realizados em ratos com estimulação dos neurônios NANC e bloqueio adrenérgico e colinérgico demonstraram um relaxamento da musculatura esfinteriana, associado a uma maior liberação de NO (WANG, 2002).

Uma demonstração eloquente da participação nitrérgica como mediador inibitório dos neurônios do EEI foi descrita por Matsuda *et al*, em 2009, ao evidenciar a presença da enzima NOS no plexo mioentérico do EEI, além disso a administração de um inibidor estereoespecífico da NOS, o L-NAME, preveniu o relaxamento do EEI em gambá. Já no presente trabalho, observou-se que em relação aos respectivos animais controles, o pré-tratamento com L-NAME (3 mg.Kg<sup>-1</sup>) reduziu ( $p < 0.05$ ) a taxa de RTEEI advinda da DR, evento que foi revertido pela adição de L-Arginina (substrato da NOS), sugerindo que um mediador NANC liberado dos neurônios nitrérgicos estaria envolvido nessa resposta do retoesofágica oriunda da distensão retal.

Além disso, observamos que no grupo de cães que recebeu pré-tratamento com L-NAME houve um aumento no tempo de latência para o primeiro episódio de RTEEI, bem como, redução do tempo de duração desses RTEEI em relação ao grupo de cães controle, ratificando que o bloqueio da NOS, e conseqüente inibição da formação de NO modificou estes parâmetros após a DR. Entretanto como já era esperado, nestes animais o pré-tratamento com L-NAME aumentou as pressões do EEI e gástrica, indicando que houve uma redução da complacência de tais porções do TGI, evento relacionado com a ausência de níveis fisiológicos de NO.

No entanto Lefebvre , em 1996, argumentou que drogas bloqueadoras de NO como hidroquinona, embora inibam o relaxamento induzido por NO, não interferem no relaxamento neurogênico NANC nessas preparações. Uma possível explicação para esta aparente contradição seria de que os bloqueadores de NO, embora capazes de inibir o NO exógeno, não conseguiriam inibir o NO endógeno que estaria protegido pela enzima superóxido dismutase. Outra especulação seria a da substância responsável pelo relaxamento da musculatura lisa intestinal, liberada pela enzima NOS em neurônios entéricos, não ser o NO livre ou, ainda, que haja a liberação de um mediador ou mediadores que, por sua vez,

seriam responsáveis pela inibição da musculatura lisa do trato gastrointestinal, tal como ocorre, por exemplo, com o VIP (GRIDER *et al*, 1992).

Os mecanismos intracelulares envolvidos no relaxamento e na hiperpolarização da musculatura lisa do trato gastrointestinal descritos envolvem desde a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) e aumento de GMPc, a ativação de um canal para K<sup>+</sup> de alta condutância dependente de cálcio (Ca<sup>2+</sup>), que pode ser dependente ou independente do aumento de GMPc, até a ativação de um canal para K<sup>+</sup> dependentes de ATP (MARTINS *et al*, 1995; MURRAY *et al*, 1995; SANDERS, 2000; VANNESTE *et al*, 2007; MATSUDA *et al*, 2009).

O GMPc é um nucleotídeo sintetizado no interior da célula pela ação de uma enzima conhecida como guanilato ciclase. Esta enzima pode ser ativada pelo NO, formando GMPc a partir do ATP (BEAVO, 1995). A produção do GMPc é o principal mecanismo pelo qual o NO produz muitos dos seus efeitos biológicos. Há evidências de que o NO e o GMPc podem atuar sobre diversos alvos como as proteínas quinases GMPc-dependentes, fosfodiesterases reguladas por GMPc e diferentes tipos de canais para K<sup>+</sup> (BOLOTINA *et al*, 1994). Neste sentido, para estudar a possível via de transdução do sinal responsável pelo aumento da taxa de RTEEI advindo da DR em cães anestesiados, utilizou-se como fármaco o azul de metileno (um inibidor da guanilato ciclase). Neste grupo de cães, o azul de metileno preveniu o aumento da taxa de RTEEI advindos da DR em relação ao respectivo controle. Além disso, tal fármaco aumentou a pressão basal do EEI e gástrica. Portanto, constatou-se que o GMPc participa como segundo mensageiro da sinalização orquestrada pelo NO para o relaxamento basal do EEI e estômago, bem como para o aumento da taxa de RTTEI induzido pela DR.

Tal fato foi também descrito por autores como Barnette (1989), que utilizou estimulação elétrica em tiras isoladas do EEI de gambás, produzindo um relaxamento que foi acompanhado por uma elevação do conteúdo intracelular de GMP cíclico.

Por outro lado, o pré-tratamento com um bloqueador específico da guanilato ciclase, o ODQ, diminui parcialmente o relaxamento do EEI em gambá, sugerindo que a elevação do conteúdo intracelular de GMPc não parecem ser o único mecanismo envolvido nesse relaxamento (SHAHIN 2000, VANNESTE *et al*. 2007, MATSUDA *et al*. 2008).

Tem sido postulado que os canais para K<sup>+</sup> dependentes de ATP estão envolvidos em uma variedade de funções fisiológicas no esôfago tais como a contratilidade da musculatura lisa do EEI. Entretanto, o papel dos canais para K<sup>+</sup> ATP dependentes no aumento da RTEEI após a DR não está completamente elucidado. Usando como ferramenta

farmacológica a glibenclamida (um bloqueador dos canais para potássio ATP dependentes) o nosso trabalho demonstrou que em relação ao respectivo controle, o bloqueio de canais para  $K^+$  não preveniu o aumento no número de RTEEI advindo da DR. Segundo Matsuda *et al.* (2004) a glibenclamida também não causou nenhum efeito na resposta elétrica de hiperpolarização e no relaxamento da musculatura lisa de jejuno de suíno, sugerindo que tanto o canal para  $K^+$  de alta condutância dependente de  $Ca^{2+}$ , quanto o canal para  $K^+$  dependente de ATP, não estariam envolvidos nesses relaxamentos no TGI.

Por outro lado, a hiperpolarização causada por um doador de NO, nitroprussiato de sódio, foi inibida tanto por caribdotoxina (inibidor de canal para  $K^+$  de alta condutância dependente de  $Ca^{2+}$ ) como por ODQ (MATSUDA *et al.*, 2004). Esses resultados sugerem que, embora um canal para  $K^+$  de alta condutância dependente de  $Ca^{2+}$  e dependente de GMPc possa ser ativado por NO ou por doadores de NO, esse não parece ser o mecanismo intracelular relacionado ao mediador NANC no potencial de junção inibitória no jejuno de suíno.

Já o relaxamento neurogênico NANC nos esfínteres de gambá, apesar de ser inibido por bário, não foi inibido pela apamina (bloqueador de canais para  $K^+$  ativados pelo  $Ca^{2+}$ ), como ocorre no duodeno de rato, sugerindo que o mediador NANC inibitório nos esfínteres seja diferente do duodeno de rato (MARTINS *et al.* 1995).

Mais de 20 anos após a descoberta do NO como substância biológica importante produzida pelas células, muito se tem discutido sobre a modulação do NO nos relaxamentos da musculatura lisa do TGI. Contudo, a hipótese que o NO sintetizado a partir da L-Arginina via NOS atua como neurotransmissor inibitório NANC nos nervos que inervam músculo liso do EEI é hoje amplamente aceita. Os neurônios responsáveis pela liberação de NO são chamados de nitrérgicos. O NO desempenha um papel crucial no controle do tônus da musculatura lisa e motilidade, em particular, nos esfínteres e também da secreção de fluidos no trato gastrointestinal. Além do relaxamento da musculatura lisa ao longo do TGI, o NO provoca vasodilatação aumentando o fluxo sanguíneo da mucosa, fator essencial para auxiliar na proteção da mucosa contra os estímulos nocivos (MEDEIROS *et al.*, 2006).

Na musculatura lisa do TGI, o relaxamento induzido por NO é mediado não só pela GMPc, mas também mecanismos independentes de GMPc. Liberação de NO dos nervos nitrérgica é facilitada ou inibida por neurotransmissores de nervos autônomos, como a acetilcolina, o ATP, peptídeos e noradrenalina, que atuam sobre os receptores pré-juncional. Várias condições patológicas ou substâncias que inibem a síntese de NO, aumentar a sua degradação, ou inibir o da guanilato ciclase são acompanhadas por um aumento no TGI

contratilidade muscular e um comprometimento da função gastrointestinal. Os resultados relacionados com a inervação nitrérgica pode nos fornecer concepções que certamente facilitarão o entendimento da fisiologia do trato gastrointestinal, com isto a fisiopatologia. (CRIST *et al.* 1991, FARRUGIA *et al.* 1993, MARTINS *et al.* 1995, MURRAY *et al.* 1995, SANDERS 2000, VANNESTE *et al.* 2007).

Baseado nisso, acredita-se que o aumento da taxa de RTEEI após a distensão retal tem em sua modulação a participação da via NO/GMPc. Porém, este evento não se demonstrou dependente dos canais para  $K^+$  dependentes de ATP, visto que o pré-tratamento com glibenclamida não alterou o aumento das taxas de RTEEI após DR. A compreensão dos mecanismos pelo qual ocorrem os chamados RTEEI poderá ser um alvo interessante para o desenvolvimento de novas terapêuticas para o controle da DRGE.

## **6- CONCLUSÃO**

De acordo com a metodologia aplicada o estudo conclui que a elevação da taxa de RTEEI decorrente da distensão retal em cães anestesiados tem a participação conjunta da via NO/GMPc.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, S. Anorectal motility in patients with achalasia of the esophagus: recognition of an esophago-rectal syndrome. **BMC Gastroenterology**.3:28. 2003.
- ANDREOLLO, N.A.; LOPES, L.R.; COELHO-NETO, J.S. Gastroesophageal reflux disease: what is the effectiveness of diagnostic tests?. **Arq Bras Cir Dig**. 23(1):6-10. 2010.
- BEAVO, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiological Reviews**.; v. 75, p. 725-745. 1995.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**. v. 368, p. 850-853. 1994.
- BOULANT, J.; FIORAMONTI, J.; DPOIGNY, M. Cholecystokinin and nitric oxide in transient lower esophageal sphincter relaxation to gastric distension in dogs. **Gastroenterology**, 107:1059-66, 1994.
- BURNSTOCK, G.; CAMPBELL, G.; BENNETT, M.; HOLMAN, M. E. Inhibition of smooth muscle of the taenia coli. **Nature**. 200: 581-582. 1963.
- CASTELL, D.O.; MURRAY, J.A.; TUTUIAN, R.; ORLANDO, R.C.; ARNOLD, R. The pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease - oesophageal manifestations. **Aliment Pharmacol Ther**. Dec;20 Suppl 9:14-25. 2004.
- COCKS, T. M.; SOZZI, V.; MOFFAT, J. D.; SELEMIDIS, S. Protease-activated receptors mediate apamin-sensitive relaxation of mouse and guinea pig gastrointestinal smooth muscle. **Gastroenterology**.116: 586-592. 1999.
- COHEN, H.; MORAES-FILHO, J.P.P.; CAFFERATA, M.L.; TOMASSO, G.; SALIS, G.; GONZALES, O. A Latin-American Consensus on gastroesophageal Disease Evidence-Based. **Eur J Gastroenterol Hepatol**. 18(4): 349-68. 2006.

CRIST, J. R., HE, X. D. & GOYAL, R. K. Chloride-mediated junction potential in circular muscle of the guinea pig ileum. **The American Journal of Physiology**. 261: G742-751. 1991.

DODDS, W.J.; DENT, J.; HOGAN, W.J. Mechanisms of gastroesophageal reflux in patients with reflux esophagitis. **N Engl J Med**.;307:1547-52.S. 1982.

ERGUN, Y.; OGULENER, N.; DIKMEN, A. Involvement of nitric oxide in non-adrenergic non cholinergic relaxation and action of vasoactive intestinal polypeptide in circular muscle strips of the rat gastric fundus. **Pharmacol Res**. 44:221-227, 2001.

FALCÃO, A.C.G.M.; CECCONELLO, I. Função motora do esôfago em pacientes com doença de refluxogastroesofágico. Dissertação de mestrado. Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

FARRUGIA, G.; IRONS, W. A.; RAE, J. L.; SARR, M. G.; SZURSZEWski, J. H. Activation of whole cell currents in isolated human jejunal circular smooth muscle by carbon monoxide. **The American Journal of Physiology**. 264: G1184-1189. 1993.

FRANZI, S.; MARTIN, C.; COX, M. Response of canine lower esophageal sphincter to gastric distention. **Am J Physiol**. 259:G380. 1990.

FURCHGOTT, R.F.; CHERRY, P.D.; ZAWADZKI, J.V. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. **J Cardiovasc Pharm**. 53: 557-573. 1984.

FURNESS, J.; COSTA, M. *Enteric Nervous System*. Churchill Livingstone. Edinburgh, London, Melbourne, New York, 290p. 1987.

GOCKEL, I.; BOHL, J. R.; ECKARDT, V. F.; JUNGINGER, T. Reduction of interstitial cells of Cajal (ICC) associated with neuronal nitric oxide synthase (n-NOS) in patients with achalasia. **The American Journal of Gastroenterology**. 103: 856-64. 2008.

GRAÇA, J.R.V.; NEVES, J.R.; MOTA, B.T.; LOPES, L.H.; GOIANA, S.W.; BEZERRA, M.N.; SANTOS, A.A.; SOUZA, M.A.N. Rectal distension increases transient lower esophageal sphincter relaxations in dogs: investigation of mechanisms of a putative rectoesophageal reflex. **Joint International Neurogastroenterology and Motility Meeting**. Oral Sessions. Boston, Massachusetts.2010.

GRIDER, J. R.; MURTHY, K. S.; JIN, J. G.; MAKHLOUF, G. M. Stimulation of nitric oxide from muscle cells by VIP: prejunctional enhancement of VIP release. **The American Journal of Physiology**. 262: G774-G778. 1992.

GURSKI, R.R.; ROSA, A.R.P.; VALLE, E.; BORBA, M.A.; VALIATI, A.A. Manifestações extra-esofágicas da doença do refluxo gastroesofágico. **J. bras. pneumol.** 32(2):150-160, mar.-abr. 2006.

HERBELLA, F.A.M., DEL GRANDE, J.C. Novas técnicas ambulatoriais para avaliação da motilidade esofágica e sua aplicação no estudo do megaesôfago. **Rev Col Bras Cir** 35: 199-202, 2007.

HIRANO, I. J.; PANDOLFINO. New technologies for the evaluation of esophageal motility disorders: impedance, high-resolution manometry, and intraluminal ultrasound. **Gastroenterol Clin North Am.** 36(3): 531-51, viii. 2007.

KAHRILAS, P. J. Clinical practice: Gastroesophageal reflux disease. **N Engl J Med.**359(16): 1700-7. 2008.

KAHRILAS, P. J.; SHI, G. Increased frequency of transient lower esophageal sphincter relaxation induced by gastric distention in reflux patients with hiatal hernia. **Gastroenterology.** 118(4): 688-95. 2000.

KATSCHINSKI, M.; SCHIRRA, J.; BEGLINER, C.; LANGBEIN, S.; WANK, U.; D'AMATO, M.; ARNOLD, R. Intestinal phase of human antro-pyloro-duodenal motility: cholinergic and CCK-mediated regulation. **Eur J Clin Invest** 26: 574-583, 1996.

LANG, I.M. Brain stem control of the phases of swallowing. **Dysphagia**. Sep;24(3):333-48. 2009.

LEFEBVRE, R. A. Influence of superoxide dismutase inhibition on the discrimination between NO and the nitrenergic neurotransmitter in rat gastric fundus. **British Journal of Pharmacology**.188: 2171-2177. 1996.

LOWICKA, E.; BELTOWSKI, J. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) - the third gas of interest for pharmacologists. **Pharmacology Reporter**,. 59: 4-24. 2007.

YONG, L.E.I; HONGBING, Z.H.U; JINHONG, X.; CHEN, J. D. Z. Rectal Distension Modulates Canine Gastric Tone and Accommodation. **Digestive Diseases and Sciences**, Vol. 50, No. 11 (November), pp. 2134–2140. 2005.

MARTINS, S.R.; OLIVEIRA, R.B.; BALLEJO, G. Rat duodenum nitrenergic-induced relaxations are cGMP-independent and apamin-sensitive. **European Journal of Pharmacology**. 284: 265-270. 1995.

MATSUDA, N. M.; LEMOS, M. C.; FEITOSA R. L. Effect of nitric oxide inactivators and guanylate cyclase on nitrenergic nerve-induced relaxations of human and opossum lower esophageal sphincter (LES). **Fundamental & Clinical Pharmacology**,. 22: 299-304. 2009.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; SHA, L.; FARRUGIA, G.; SZURSZEWski, J. H. Mediators of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory neurotransmission in porcine jejunum. **Neurogastroenterology and Motility**.. 16: 605-612. 2004.

MEREARIN, F.; MOURELLE, M.; GUARNER, F.; SALAS, A.; RIVEROSMORENO, V.; MONCADA, S.; MALAGELADA J. R. Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastro-oesophageal junction. **European Journal of Clinical Investigation**. 23: 724-728. 1993.

MEDEIROS, J.V.R. Efeito gastroprotetor do sildenafil (Viagra®) na lesão gástrica induzida por álcool em ratos: papel do óxido nítrico, do GMPc, e dos canais de potássio sensíveis ao

ATP.121f. Dissertação (Mestrado). Fortaleza: Universidade Federal do Ceará- Faculdade de Medicina.2006.

MINCIS, M. Gastroenterologia & hepatologia : diagnóstico e tratamento.. São Paulo, Lemos Editorial. 2002.

MITTAL, R.K; HOLLOWAY, R.H; PENAGINI, R.; BLACKSHAW, L.A.; DENT, J.  
Transient lower esophageal sphincter relaxation. **Gastroenterology**. 109:601. 1995.

MORAES-FILHO, J.P.P.; CECCONELLO, I.; GAMA, R. J.; CASTRO, L.; HENRY, M.A.;  
MENEGHELLI, U.G. Brazilian Consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for  
assessment, classification, and management. **Am J Gastroenterol**. 97:241-8. 2002

MORAES-FILHO, J.P.P.; NASI, A.; CECCONELLO, I. Doença do refluxo gastroesofágico:  
revisão ampliada. **Arq. Gastroenterol**. vol.43 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2005

MURRAY, J. A.; SHIBATA, E. F.; BURESH, T. L.; PICKEN, H.; O'MEARA, B. W.;  
CONKLIN, J. H. Nitric oxide modulates a calcium-activated potassium current in muscle  
cells from opossum esophagus. **The American Journal of Physiology**. 269: G606-612.  
1995.

NEBEL, O. T.; FORNES, M. F. Symptomatic gastroesophageal reflux: incidence and  
precipitating factors. **Am J Dig Dis**. 21(11): 953-6. 1976.

NEUMANN, H.; MÖNKEMULLER, K.; KANDULSKI, A.; MALFERTHEINER, P.  
Dyspepsia and IBS Symptoms in Patients with NERD, ERD and Barrett's Esophagus. **Dig  
Dis**.;26:243–247. 2008

NEVES. J.R.C; MOTA, B.T.; LOPES, L.H.; GOIANA, S.W.; BEZERRA, M.M.; GRAÇA,  
J.R.V.; SANTOS, A.A.; SOUZA, M.A.N.; Effect of rectal distension on the frequency of  
transient lower esophageal sphincter relaxation in sedated dogs. **Neurogastroenterology and  
motility**. 21 , supplement 1 , 1 – 98 , pg 56. 2010

NETTER, F. ATLAS INTERATIVO DE ANATOMIA NETTER 3.0. Ícon Learning  
Systems. CD- ROM.2003.

PEREIRA, K.B.; FURTADO, G.B. Doença do refluxo gastroesofágico. In: Lima, JMC. Gastroenterologia e Hepatologia: Sinais, Sintomas, Diagnóstico e Tratamento, Fortaleza, Edições UFC, Capítulo 2, 275-296p, 2010.

SANDERS, K. M. Postjunctional electrical mechanisms of enteric neurotransmission. **Gut.** 47: 23-25. 2000.

SANTOS, A.A. Motilidade Gastrintestinal. In: Fisiologia Básica. Curi, R & Procópio JAF. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.609-624, 2009.

SANTOS, A.A.; GRAÇA, J.R.V. Bases celulares da fisiopatologia gastrointestinal. In: Lima, JMC. Gastroenterologia e Hepatologia: Sinais, Sintomas, Diagnóstico e Tratamento, Fortaleza, Edições UFC, Capítulo 2, 18-42p, 2010.

SCHANAIDER, A.; SILVA, P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir. Bras.**, Ago, vol.19, no.4, p.441-447. 2004.

SIFRIM, D. Transient lower esophageal sphincter relaxations: how many or how harmful? **Am J Gastroenterol.** vol 96 no 9 2529-32. 2001.

SHAHIN, W.; MURRAY, J. A.; CLARK, E.; CONKLIN, J. L. Role of cGMP as a mediator of nerve-induced motor functions of the opossum esophagus. **The American Journal of Physiology.**279: G567-G574. 2000.

SILVERTHORN, D. U. Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada. Austin - EUA University of Texas. 2a edição.Ed. Manole.819 p. il. 2003.

SOUZA, M.A.N.; FREIRE, C.C.F. Abordagem do Paciente com Disfagia. In: Lima, JMC. Gastroenterologia e Hepatologia: Sinais, Sintomas, Diagnóstico e Tratamento, Fortaleza, Edições UFC, Capítulo 2, 43-53p., 2010.

RICHTER, J.E.; CASTELL, D. O. The esophagus. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2004.

VANDERWINDEN, J. M.; MAILLEUX, P.; SCHIFFMANN, P. M.; VANDERHAEGHEN, J. J.; DELAET, M. H. Nitric oxide synthase/ NADPH diaphorase activity in infantile hypertrophic pylorus stenosis. **New England Journal of Medicine**, 327: 511-515. 1993.

VANNESTE, G.; DHAESE, I.; SIPS, P.; BUYS, E.; BROUCKAERT, P.; LEFEBVRE, R. A. Gastric motility in soluble guanylate cyclase alpha 1 knock-out mice. **Journal of Physiology**.584: 907-920. 2007

VAEZI, M.F. Gastroesophageal Reflux Disease and the Larynx. **Jornal of Clinical Gastroenterology**. March, Vol 36(3) pp 198-203.2003

WASHINGTON, N.; STEELE, R.J.; JACKSON, J. Patterns of food and acid reflux in patients with low-grade oesophagitis – the role of an anti-reflux agent. **Aliment Pharmacol Ther**.12:53-8.1998

WANG, X.; ZHONG, Y.X.; ZANHG, Z.Y.; LU, L.; LAN, M.; MIAO, J.Y. Effect of L-NAME on nitric oxide and gastrointestinal motility alterations in cirrhotic rats. **World J Gastroenterol**. Apr;8(2):328-32. 2002

ZARATE, N.; KNOWLES, C.H.; YAZAKI, E.; LUNNIS P.J.; SCOTT S.M. Clinical Presentation and Patterns of Slow Transit Constipation Do Not Predict Coexistent Upper Gut Dysmotility. **Dig Dis Sci** .54:122–131.2009

## APÊNDICE

**Apêndice 1: valores individuais das médias dos números de RTEEI/H nos cães distribuídos por grupo.**

<b>GRUPOS EXPERIMENTAIS</b>				
<b>CONTROLE</b>	<b>L-NAME</b>	<b>L-NAME +L-ARG</b>	<b>AM</b>	<b>GLIBENCLAMIDA</b>
<b>5,40</b>	<b>0,80</b>	<b>7,27</b>	<b>0,30</b>	<b>5,30</b>
<b>7,00</b>	<b>2,40</b>	<b>5,60</b>	<b>1,40</b>	<b>6,10</b>
<b>6,00</b>	<b>2,90</b>	<b>5,63</b>	<b>2,50</b>	<b>4,90</b>
<b>5,00</b>	<b>3,10</b>	<b>7,40</b>	<b>2,00</b>	<b>5,00</b>
<b>5,60</b>				