

INTERAÇÃO ENTRE O SULFETO DE HIDROGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS

Renan Oliveira Silva (bolsista, ICV), Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza (Colaborador, Depto de Farmacologia – UFC – CE), Jand-Venes Rolim Medeiros (Orientador, Depto de Biologia – UFPI – CMRV)

INTRODUÇÃO

O etanol é conhecido como uma toxina entérica, afetando a estrutura e função de vários elementos do trato gastrointestinal, além de possuir efeitos sobre o sistema nervoso central. No estômago o etanol atua como uma substância necrosante, causando injúria na mucosa, e a sua ingestão excessiva pode resultar em gastrite e úlcera (GUSLANDI, 1987). Nesse órgão também causa depleção dos grupos sulfidrilas, que são necessários para estabilização das membranas celulares, bem como na eliminação de radicais livres.

Entre os mediadores importantes para manutenção da integridade da mucosa gástrica se destacam os mediadores gasosos, como o óxido nítrico (NO), sulfeto de hidrogênio (H₂S) e monóxido de carbono (CO). Estudos recentes sugerem que esses “gasotransmissores” devem interagir entre si em condições fisiopatológicas potencializando seus efeitos ou induzindo a síntese simultânea um do outro (FIORUCCI et al., 2006).

Baseado no exposto acima, o objetivo geral do presente projeto foi avaliar a participação do H₂S no efeito gastroprotetor do NO e vice-versa, no curso da lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

METODOLOGIA

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com peso variando entre 25 a 30g. Para análise da lesão gástrica, os camundongos foram inicialmente tratados, por gavagem com L-NAME (3mg/Kg). Após 30 minutos foi administrado reagente de Lawesson's (doador de H₂S) na dose 27μmol kg⁻¹ e 1 hora depois foi administrado etanol 50% (0.5ml 25g⁻¹). Em outro grupo experimental, os animais foram inicialmente tratados com DL-propargilglicina (PAG) (50 mg/Kg) e em seguida administrado nitroprussiato de sódio (3 ou 10 mg kg⁻¹, v.o), após 30 minutos os animais receberam etanol 50%. Uma hora depois os animais foram sacrificados e os estômagos rapidamente removidos para determinação da área das lesões utilizando um programa de planimetria computadorizado. Amostras do estômago foram coletadas e congeladas a -70°C para posteriores dosagens de glutatona (GSH) e malondialdeído (MDA) que são parâmetros importantes na lesão por álcool.

Para determinação dos níveis gástrico de glutatona, uma amostra de 50 a 100 mg da mucosa gástrica dos animais foi homogeneizada em 1 ml de EDTA 0.02 M. Alíquotas de 400μL do homogeneizado foram misturadas a 320μL de água destilada e a 80μL de ácido tricloroacético (TCA) 50%. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4° C. A um total de 400μL do sobrenadante foi adicionado 800μL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20μL de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância foi lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em μg de NP-SH/g de tecido.

Para os níveis de malonilaldeído, fragmentos 300mg da mucosa gástrica foram homogeneizados com KCl gelado 1.15% para preparar 10% de homogenato. Em seguida 0.5ml desse homogenato foi pipetado em seguida acrescentados ao tubo, 3ml de H_3PO_4 a 1% e 1 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0.6%). Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em um banho de água fervendo e a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 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 mmol/g de fragmentos umedecidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A administração de etanol 50% induziu uma lesão significativa na mucosa gástrica ($112.0 \pm 7.4 \text{ mm}^2$), porém quando os animais foram tratados com reagente de Lawesson's preveniu significativamente a lesão por etanol no estômago ($32.54 \pm 9.7 \text{ mm}^2$). Entretanto, quando pré-tratados com L-NAME (inibidor não específico das enzimas NO sintases) o efeito gastroprotetor do reagente de Lawesson's não foi alterado ($44.24 \pm 6.6 \text{ mm}^2$). Por outro lado, o efeito gastroprotetor do NO depende, pelo menos em parte, do H_2S , visto que a administração de nitroprussiato na dose de 10 mg kg^{-1} protegeu significativamente a mucosa gástrica ($14.62 \pm 4.8 \text{ mm}^2$) da lesão provocada por etanol. Contudo, quando os animais foram pré-tratados com DL-propargilglicina ($46.9 \pm 5.6 \text{ mm}^2$) houve uma reversão parcial do efeito gastroprotetor do nitroprussiato.

A administração de etanol diminui de forma significativa ($p < 0,05$) o nível gástrico de glutathione (GSH) ($327.6 \pm 21.8 \text{ mm}^2$) quando comparado com o grupo controle (apenas salina). Entretanto, o pré-tratamento dos animais com nitroprussiato de sódio aumentou os níveis de glutathione ($471.0 \pm 44.17 \text{ mm}^2$) até os valores semelhantes aos normais. Porém quando os animais foram pré-tratados com DL-propargilglicina ocorreu reversão do efeito protetor do nitroprussiato de sódio ($205.4 \pm 25.2 \text{ mm}^2$) sobre o nível gástrico de glutathione. Da mesma forma, quando os animais foram inicialmente tratados com Reagente de Lawesson's ocorreu aumento dos níveis de glutathione ($795.0 \pm 55.3 \text{ mm}^2$). E o efeito permaneceu quando os animais foram pré-tratados com L-NAME ($615.6 \pm 85.0 \text{ mm}^2$), mostrando que o Reagente de Lawesson's não depende da presença de NO.

A administração de etanol 50% provocou aumento dos níveis de MDA na mucosa gástrica (89.1 ± 5.6) quando comparado ao grupo controle. Entretanto, quando os animais foram pré-tratados com reagente de Lawesson's observou-se uma redução significativa dos níveis gástricos de MDA (59.2 ± 3.2) quando comparado ao grupo recebeu somente etanol 50%. No entanto, o pré-tratamento com L-NAME não apresentou reversão na gastroproteção e diminuição de MDA promovido pelo Lawesson's (66.8 ± 5.5). Da mesma forma quando os animais foram inicialmente tratados com nitroprussiato de sódio ocorreu redução dos níveis de MDA (50.1 ± 2.4), porém ocorreu a reversão desse efeito quando os animais foram pré-tratados com PAG (106.5 ± 12.1), mostrando que o efeito do nitroprussiato de sódio depende da presença de H_2S .

Nossos dados estão de acordo com outros autores que mostram que o etanol depleta o nível de glutatona no 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 a lesão por etanol no estômago é diminuída pelo aumento da concentração de glutatona. Em nosso estudo observou-se também que a administração de etanol 50% provocou aumento dos 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).

CONCLUSÃO

- ✓ O H₂S e NO sozinhos exercem efeitos gastroprotetores na lesão induzida por etanol, sendo que o efeito protetor do NO parece depender em parte da produção de H₂S.
- ✓ O H₂S e o NO atuam aumentando os níveis de glutatona até os valores semelhantes aos normais. Porém o efeito do NO depende, em parte, da produção de H₂S.
- ✓ O H₂S e o NO atuam reduzindo a concentração de MDA na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol. Entretanto o efeito do NO, depende em parte, da produção de H₂S.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- GUSLANDI, M. Effect of ethanol on the gastric mucosa. **Dig. Dis. Sci**, v. 5, p. 21-32, 1987.
- MEDEIROS, JVR.; BEZERRA, V.H.; GOMES, A.S.; BARBOSA, A.L.R.; LIMA-JUNIOR, R.C.P.; SOARES, P.M.G.; BRITO, G.A.C.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; SOUZA, M.H.L.P. Hydrogen sulphide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of k_{atp} channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **JPET**, in press, 2009.
- 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.
- SMITH, G.S.; TORNWALL, M.S.; BARRETO, J.C.; MILLER, T.A. Gastric Injury and Protection against Alcohol and Acid: Influence of Perturbations in Glutathione Metabolism. **Journal of Surgical Research**, v. 61, p. 395–403, 1996.
- TEYSSEN, S.; SINGER, M.V. Alcohol-related diseases of the oesophagus and stomach. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.**, v. 17, p.557–573, 2003.
- OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; FLORÊNCIO, M.G.; LIMA JR, R.C.P.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v. 49, p. 105–111, 2004.
- SZABO S, TRIER, J.S.; FRANKEL, P. W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, v. 214, p. 200, 1981.

PALAVRAS-CHAVE: sulfeto de hidrogênio, óxido nítrico, etanol.