

ADRIANA MENDES VINAGRE

EFEITO DE DERIVADOS FENILPIRAZOLÔNICOS SOBRE O  
ESVAZIAMENTO GÁSTRICO DE LÍQUIDO EM RATOS

CAMPINAS  
2011

ADRIANA MENDES VINAGRE

EFEITO DE DERIVADOS FENILPIRAZOLÔNICOS SOBRE O  
ESVAZIAMENTO GÁSTRICO DE LÍQUIDO EM RATOS

Tese apresentada a Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção de Título de  
Doutora em Farmacologia.

ORIENTADOR: PROF.DR. EDGARD FERRO COLLARES

CAMPINAS  
UNICAMP  
2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

V73e Vinagre, Adriana Mendes  
Efeito de derivados fenilpirazolônicos sobre o esvaziamento  
gástrico de líquido em ratos. / Adriana Mendes Vinagre. -- Campinas,  
SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Edgard Ferro Collares  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade  
de Ciências Médicas.

1. Esvaziamento gástrico. 2. Ratos. 3. Complacência. I. Collares,  
Edgard Ferro. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. III. Título.

**Título em Inglês: Effect of phenylpyrazolone derivatives on gastric emptying of liquids in rats**

**Keywords:** • Gastric emptying  
• Rats  
• Compliance

**Titulação: Doutor em Farmacologia**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Edgard Ferro Collares**  
**Prof. Dr. Joaquim Murray Bustorff Silva**  
**Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro**  
**Prof. Dr. Luiz Ernesto de Almeida Troncon**  
**Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira**

**Data da defesa: 28.02.2011**

---

## Banca Examinadora de Tese de Doutorado

---

Adriana Mendes Vinagre

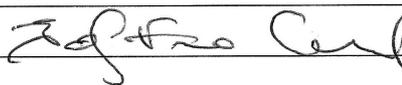
---

**Orientador(a)(a): Prof(a). Dr(a). Edgard Ferro Collares**

---

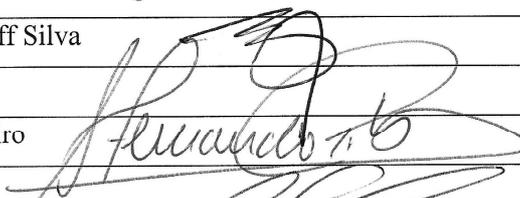
### Membros:

Professor (a) Doutor (a) Edgard Ferro Collares

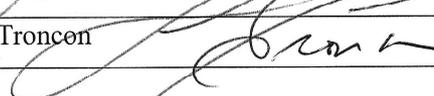


Professor (a) Doutor (a) Joaquim Murray Bustorff Silva

Professor (a) Doutor (a) Antonio Fernando Ribeiro



Professor (a) Doutor (a) Luiz Ernesto de Almeida Troncen



Professor (a) Doutor (a) Ricardo Brandt de Oliveira



Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 28/02/2011**

---

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus grandes amores  
Miguel e Luiza.**

## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao meu orientador Prof. Dr. Edgard Ferro Collares, pelo apoio incondicional em todos os momentos, agradeço especialmente pelo exemplo de generosidade, humildade e inteligência.

Ao amigo, anjo e amor Miguel, pelo exemplo de garra e superação e também pelo amor e colo diários, que auxiliaram muito para a realização desse trabalho.

À minha querida filha, motivo de toda minha inspiração.

Aos meus pais amorosos, por me apoiarem em todos os momentos.

Um agradecimento especial a minha irmã Cristiane, a rede na corda bamba que é a minha vida. OBRIGADA!

Aos meus queridos sogro Geraldo e sogra Mada, pelo apoio de todas as horas.

A todos os “meus estagiários”, amigos que acompanharam toda a trajetória de trabalho e que me apoiaram na realização dessa tese, especialmente a Arthur Kmit e Anna Carolina Degan Passafaro.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, que me acolheu e auxiliou durante todos esses anos de doutorado na Farmacologia, sempre dando aquele “empurrãozinho”.

Aos membros da banca, pela consideração imediata ao serem contatados.

Aos colegas do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, que sempre deram auxílio nesses anos de trabalho.

Aos ratinhos de laboratório, que deram a sua vida por essa pesquisa.

A FAEPEX, pelo apoio financeiro.

**RESUMO**

O esvaziamento gástrico (EG) é um processo de transferência do conteúdo gástrico para o intestino delgado, resultante da ação de mecanismos inibidores e estimuladores que controlam a atividade motora do estômago, piloro e duodeno. A dipirona, um derivado da fenilpirazolona, por via intravenosa (*iv*) e intra-cérebro-ventricular (*icv*), em ratos, retarda o esvaziamento gástrico (EG) de uma refeição líquida (salina). Quando administrada por via *iv*, o fenômeno foi abolido pela vagotomia sub-diafragmática e lesão eletrolítica do núcleo para-ventricular do hipotálamo. Em observação adicional, foi demonstrado que este efeito foi bloqueado pela injeção *icv* de baclofen, um agonista de receptores GABA<sub>B</sub>. O derivado fenilpirazolônico antipirina injetado *iv* também retarda o EG de líquido e este efeito foi reduzido significativamente pela vagotomia sub-diafragmática e abolido pela injeção *icv* de baclofen. Adicionalmente, demonstramos que a administração *iv* de 4-aminoantipirina (um metabólito da dipirona) diminui o EG de líquido em ratos e, da mesma forma que com a antipirina, foi reduzido significativamente pela vagotomia sub-diafragmática e abolido pela injeção *icv* de baclofen. Em situações em que há alteração no EG, a participação do estômago no processo pode ser inferida através da determinação *in vivo* do volume e da complacência gástrica, como indicadores do tônus gástrico. O tônus desta região é resultado, em grande parte, da atividade do nervo vago. Demonstramos que, para as condições de estudo as três drogas aumentam a complacência gástrica. O conjunto destes estudos sugere a participação do sistema nervoso central (SNC) e do nervo vago no fenômeno de retardo do EG induzido por estas drogas. Como somente a dipirona induziu o mesmo efeito quando administrada *icv* e o retardo do EG induzido pelas três drogas *iv* foi abolido pela vagotomia sub-diafragmática, em continuidade especulamos que o estímulo inibitório do EG, quando da administração por via *iv*, chegue ao SNC através de vias aferentes. A capsaicina é uma neurotoxina que administrada a ratos recém nascidos resulta em degeneração irreversível da maioria dos neurônios aferentes periféricos com axônios não mielinizados (fibras C) e de uma minoria de fibras escassamente mielinizadas (fibras A $\delta$ ). Constatamos que a administração desta neurotoxina, no período neonatal, a ratos, aboliu o efeito destas três drogas administradas *iv*, mas não da dipirona *icv*, sugerindo a participação das vias aferentes no fenômeno e de que o mecanismo (ou mecanismos) envolvido no efeito da administração dipirona no SNC difere daquele quando a droga é administrada *iv*.

Embora os estudos relacionados ao efeito dos derivados fenilpirazolônicos sobre o EG, indicarem a participação do nervo vago no fenômeno, sabe-se que os efeitos do sistema

nervoso simpático e parassimpático sobre os sistemas podem ser sinérgicos, exclusivos e até mesmo concomitantes. O sistema nervoso simpático, que tem efeito inibitório sobre o EG, libera norepinefrina nas terminações pós-ganglionares. Foram identificados subtipos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenoceptores em diferentes níveis do trato gastrointestinal que podem ter participação importante no controle da motricidade gástrica. Há evidências que neurônios aferentes e eferentes do nervo vago possuam beta-adrenoceptores, sendo que o subtipo  $\beta_2$ -adrenoceptor parece ser o predominante. Avaliando a participação do sistema adrenérgico no retardo do EG, os resultados do estudo sugerem: 1) que a simpatectomia química ou o pré-tratamento com propranolol (antagonista não seletivo  $\beta$ -adrenérgico) aboliram o efeito da dipirona e antipirina e reduziram o da 4-aminoantipirina sobre o EG; 2) como pouco provável que retardo do EG induzido por estas drogas ocorra por ativação de  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - e  $\beta_3$ -adrenoceptores periféricos.

Estes últimos resultados aventam a possibilidade que no efeito destas drogas haja envolvimento da ativação de receptores  $\beta_1$ - e/ou  $\beta_2$ -adrenérgicos no SNC e, que o mesmo, não ocorra em grande parte do efeito da 4-aminoantipirina.

## **ABSTRACT**

Gastric emptying (GE) is the process of transfer of the gastric contents to small intestine, as result of inhibitory and stimulatory mechanisms that control the stomach, pylorus and duodenum motor activity. Dipyron, a phenylpyrazole derivative, administrated intravenously (*iv*) and intracerebroventricularly (*icv*), in rats, slows the gastric emptying (GE) of a liquid meal (saline). When administrated *iv*, this phenomenon was abolished by sub-diaphragm vagotomy and electrolytic lesion of the hypothalamus paraventricular nucleus. In an additional study, it was demonstrated that this effect was blocked by *icv* injection of baclofen, a GABA<sub>B</sub> receptor agonist. The phenylpyrazole derivative antipyrine when injected by *iv* slows the GE of liquid also, and this effect was significantly decreased by sub-diaphragm vagotomy and abolished by baclofen *icv* injection. Moreover, we demonstrated that the 4-aminoantipyrine (a dipyron metabolite) administration *iv* decrease the GE of liquids in rats and as antipyrine, it was significantly reduced by sub-diaphragm vagotomy and abolished by baclofen *icv* injection. When happen alterations on GE, the stomach activity in this process can be inferred by *in vivo* determination of gastric volume and complacency, as indicators of gastric tone. The tone of this region is a result, mostly, of vagus nerve activity. We showed that in our studies conditions, the three drugs increased gastric complacency. Putting these results together we suggested the action of central nervous system (CNS) and vagus nerve in the GE retardation induced by these drugs. Taking into account that only dipyron induced the same effect when administrated *icv* and that GE retardation induced by the three drugs was abolished by sub-diaphragm vagotomy, we speculated whether the GE inhibitory stimulus, when the drugs were administrated *iv*, reach the CNS through afferent pathway. The capsaicin is a neurotoxin which when administrated to new born rats, results in irreversible degeneration of the most part of peripheral afferent neurons with unmyelinated axons (fiber C) and a minority of thinly myelinated fibers (fiber A $\delta$ ). Our studies showed that the administration of this neurotoxin, during neonatal period, nullify the effect of these three drugs when administrated by *iv*, but didn't when dipyron was gave by *icv*, what suggests the role of afferent pathways in this phenomenon and that the mechanism (or mechanisms) involved in the effect of dipyron administration on CNS is different when the drug is administrated by *iv*.

Although the studies related to phenylpyrazole derivative effects on the GE indicated the action of vagus nerve on this phenomenon, we know that the effects of sympathetic and parasympathetic system on the systems can be synergics, exclusives and to concomitant. The sympathetic nervous system, which has inhibitory effect on the GE, releases

norepinephrine in the postganglionic endings. It was identified subtypes of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoreceptors in different sites in gastrointestinal tract that may have important roles in the control of gastric motor. It's evidences that afferent and efferent neurons of vagus nerve have beta-adrenoreceptors and the subtype  $\beta_2$ -adrenoreceptor seems to be the predominant. Evaluating the participation of adrenergic system on the GE retardation, the results of our study suggest: 1) the chemistry sympathectomy or the early treatment with propanolol ( $\beta$ -adrenergic non selective antagonist) abolished the effect of dipyrone and antipyrine and reduced the effect of 4-aminoantipyrine on the GE; 2) it's almost unlikely that the slow GE induce by these drugs occur by activation of  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ - ,  $\beta_2$ - e  $\beta_3$  peripherics adrenoreceptors. The last results suggest the possibility that in this drugs effects have involvement of receptor  $\beta_1$ - and/or  $\beta_2$ -adrenergics activation on the CNS and that this don't occur at mostly of 4-aminoantipyrine effect.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AA	4-aminoantipirina
<i>ad lib</i>	<i>ad libitum</i>
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ANOVA	Análise de variância
At	Antipirina
ATE	Atenolol
ATP	Adenosina trifosfato
AVP	Arginina vasopressina
bac	Baclofen
BUT	Butoxamina
C	Controle
CCK	Colecistocinina
CDV	Complexo dorsal do vago
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Cps	Capsaicina
CMM	Complexo motor migratório
Dp	Dipirona
EG	Esvaziamento Gástrico
GABA <sub>A</sub>	Receptor A do ácido gama-aminobutírico
GABA <sub>B</sub>	Receptor B do ácido gama-aminobutírico
GABA <sub>C</sub>	Receptor C do ácido gama-aminobutírico

GUA	Sulfato de guanetidina
<i>icv</i>	Intra-cérebro-ventricular
<i>iv</i>	Intravenoso
NDV	Núcleo dorsal do vago
NO	Óxido nítrico
NPV	Núcleo para-ventricular do hipotálamo
NTS	Núcleo do trato solitário
NOS	Núcleo supra-ótico
PRO	Propranolol
REB	Ritmo elétrico basal
RG	Retenção gástrica
RP	Refeição de prova
S	Salina
SBCAL	Sociedade brasileira de ciência em animais de laboratório
<i>sc</i>	Subcutânea
SEM	Erro padrão da média
SNE	Sistema nervoso entérico
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
SR	Glândula supra-renal
TGI	Trato gastrointestinal
VIP	Polipeptídeo vaso ativo intestinal
VgX	Vagotomia sub-diafragmática

5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HT <sub>3</sub>	Receptor 3 da 5-hidroxitriptamina
V	Veículo

## SUMÁRIO

---

	Página
<b>RESUMO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>13</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>33</b>
<b>Artigo:</b> Effect of 4-aminoantipyrine on gastric compliance and gastric emptying in rats. Braz J Med Biol Res 2007.	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>41</b>
<b>Artigo:</b> Phenylpyrazolone derivatives inhibit gastric emptying in rats by a capsaicin-sensitive afferent pathway. Braz J Med Biol Res 2009	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>46</b>
<b>Artigo:</b> Avaliação do envolvimento dos receptores adrenérgicos no retardo do esvaziamento gástrico de líquido induzido pelos derivados fenilpirazolonicos (dipirona, 4-aminoantipirina e antipirina) em ratos.	
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>63</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>70</b>

## **INTRODUÇÃO**

## 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Comer é obviamente uma das coisas mais importantes que realizamos e é a obtenção de nutrientes e água que garante a manutenção da vida. O trato gastrointestinal (TGI) é a maquinaria necessária para realização dessa atividade e é a interface dinâmica entre o corpo e o ambiente externo. As características do TGI que garantem o bom funcionamento desse sistema são os mecanismos de motricidade, secreção, digestão e absorção (1).

À medida que os organismos se especializam, desenvolvem capacidades de armazenamento e transformação de nutrientes complexos em substâncias absorvíveis pelas células. Em humanos, a obtenção de nutrientes atingiu grande especialização, sendo capaz de armazenar, digerir, assimilar e, através do sistema cardiovascular, transportar todos os nutrientes para o meio interno (2).

O estômago é a porção medial do TGI dos mamíferos não ruminantes e a importância desse órgão já era reconhecida na antiguidade. Assim, no Egito, em rituais fúnebres, era um dos órgãos guardados nos vasos canópicos, juntamente com fígado, pulmões e intestinos, indicando, com isso, a necessidade de tal órgão para a outra vida (3).

A primeira descrição de sua estrutura anatômica foi feita em 1547 por Andréas Vesalius em seu livro *De Humani Corporis Fabrica* (4). Lazzaro Spalanzani, em seu *Dissertationi de Física Animale e Vegetale*, em 1780, demonstrou experimentalmente a diferença entre os processos de fermentação, digestão e trituração (5). Em 1823, Prout, Tiedmann e Gmelin identificaram o ácido clorídrico como sendo o ácido do estômago (5-6). Os princípios fisiológicos da secreção ácida e as proteções do estômago só foram estabelecidos efetivamente em meados de 1960, quando Charles Code e Horace Davenport publicaram seus trabalhos (7-8).

## 2. ESTÔMAGO E SUA ANATOMIA

Anatomicamente, o estômago é dividido em cinco regiões distintas (figura 1): 1- cárdia e junção gastroesofágica; 2-fundo, que é a porção proximal do estômago; 3- corpo, que é a área maior do estômago; 4- antro, que se estende da *incisura angularis* até a junção do piloro com o duodeno; 5- piloro (3,9). As glândulas secretoras de ácido estão localizadas no fundo e no corpo, e o epitélio endócrino de secreção alcalina e as células G secretoras de gastrina estão no antro. O piloro é um anel muscular que separa o estômago do duodeno e a *incisura angularis* é a junção entre o corpo, que secreta o ácido clorídrico, e o antro que não secreta (3,10).

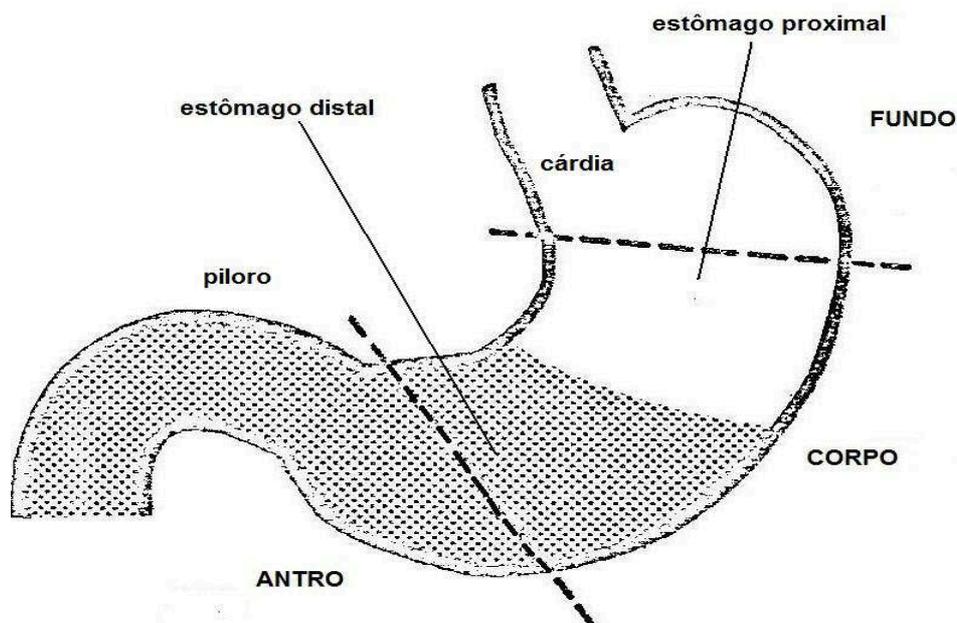


Figura 1: Divisão esquemática anatômica e funcional do estômago. Modificada de Weisbrodt NW (10).

A mucosa gástrica é funcionalmente dividida em duas regiões: secretora de ácido e não secretora de ácido. A primeira é formada por glândulas compostas por células secretoras de pepsinogênio (células principais), secretoras de ácido (células parietais), secretoras de histamina (células enterocromafins-like)

e células epiteliais de superfície. A segunda região é formada por glândulas simples secretoras de muco e  $\text{HCO}_3^-$  (responsáveis pela barreira mucosa) e células G secretoras de gastrina (3).

A musculatura da parede gástrica está organizada da seguinte forma: uma camada mais externa de células musculares longitudinais (ausente na porção anterior e posterior do estômago), uma mais proeminente a camada média de musculatura circular (ausente na região para-esofágica) e a camada mais interna de musculatura oblíqua, que está em contato com a submucosa (10).

O estômago é ricamente vascularizado pelas artérias: celíaca, hepática comum, gástrica e esplênica. A drenagem venosa é feita para a veia porta através de suas tributárias: a veia esplênica e a mesentérica superior. A drenagem linfática desse órgão é feita para um grupo de gânglios linfáticos localizados na pequena e grande curvatura, região supra-pilórica e sub-pilórica (3,10).

## **2.1. ESTÔMAGO E O SISTEMA NERVOSO INTRÍNSECO E EXTRÍNSECO**

A atividade elétrica e contrátil do estômago está sob controle de uma rede hierárquica, integrada de centros neurais (11). O estômago é controlado por inervação intrínseca e extrínseca. A inervação intrínseca é feita pelos plexos do sistema nervoso entérico (SNE), mientérico e submucoso, localizados na parede do sistema digestivo que integra as contrações das camadas musculares, o transporte através da mucosa e circulação sanguínea intramural. Os plexos possuem neurônios conectados a inter-neurônios e a neurônios efetores nos próprios plexos, liberando uma série de neurotransmissores como acetilcolina, peptídeo vasoativo intestinal (VIP), adenosina trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO), entre outros (12).

A inervação extrínseca é feita pelas fibras parassimpáticas do nervo vago (figura 2) e por fibras simpáticas originadas no plexo celíaco, que se conectam aos

inter-neurônios dos plexos intramurais. O sistema nervoso central (SNC) apresenta conexões com os inter-neurônios do SNE e, desta forma, participa da modulação do EG, através do nervo vago, com fibras aferentes com projeções no núcleo do trato solitário (NTS) e eferentes com origem no núcleo dorsal do vago (NDV), e do sistema nervoso simpático (SNS) com fibras aferentes em conexão e eferentes com origem na medula. Estes núcleos e sistemas estão sob influência de estruturas mais superiores do SNC, como o núcleo para-ventricular do hipotálamo (NPV). Sabe-se, atualmente, que o SNE controla efetivamente a atividade motora digestiva e que o sistema extrínseco tem apenas papel modulador (11).

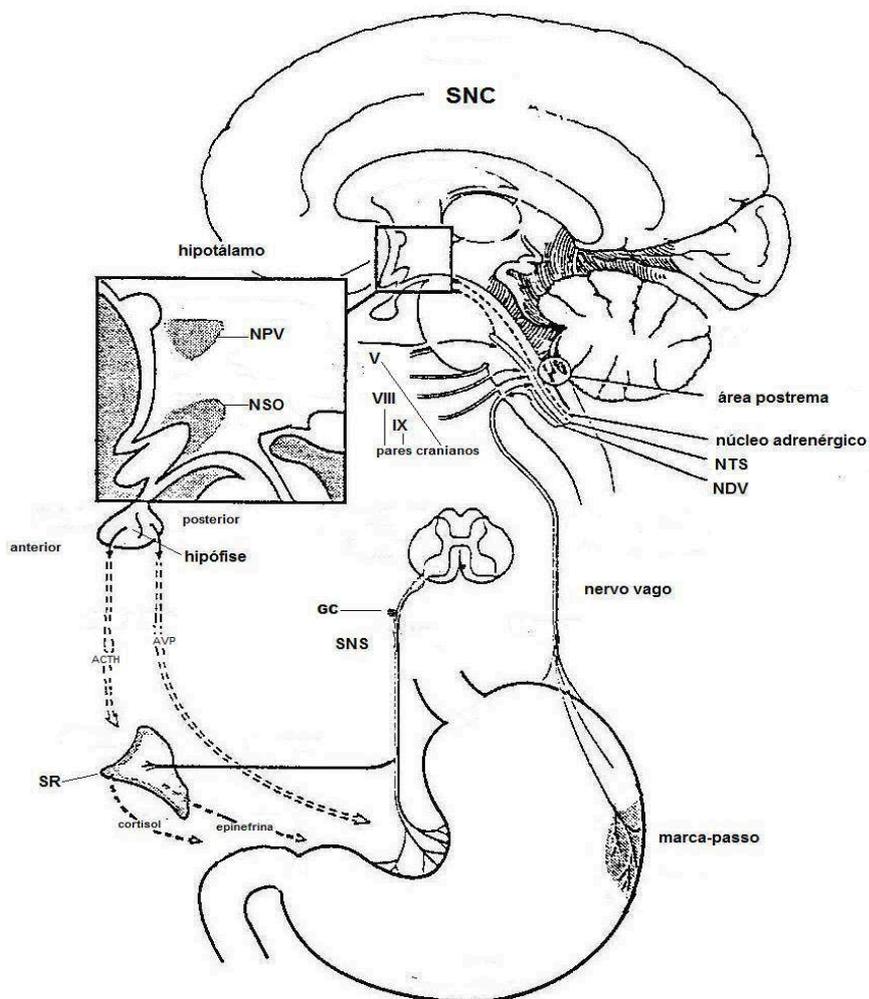


Figura 2: Modulação hormonal e nervosa (sistema nervoso extrínseco), da atividade motora e secretora do estômago por estruturas do sistema nervoso central (SNC). Modificada de Koch KL (13) (ACTH, hormônio adeno-corticotrófico; AVP, arginina vasopressina; GC, gânglio celiaco; NDV, núcleo dorsal do vago; NPV, núcleo paraventricular do hipotálamo; NOS, núcleo supra-ótico; NST, núcleo do trato solitário; SNS, sistema nervoso simpático; SR, supra-renal).

O vago não atua apenas estimulando as contrações do estômago através das suas fibras colinérgicas; possui fibras adrenérgicas de ação inibitória e também fibras não-colinérgicas não-adrenérgicas, que liberam, entre outros, neurotransmissores inibitórios da musculatura gástrica: o NO, ATP e VIP (12,14). Há evidências que a liberação de ATP e NO por essas fibras está relacionada ao relaxamento rápido da fibra muscular lisa do estômago proximal, provavelmente, o relaxamento receptivo (ver tópico sobre esvaziamento gástrico de líquidos). A liberação de VIP está relacionada ao relaxamento mais tardio, relaxamento adaptativo (1).

O SNS, que tem efeito inibitório sobre o EG, libera norepinefrina nas terminações pós-ganglionares (15-17). As fibras adrenérgicas do trato gastrointestinal são todas extrínsecas e a maioria dos corpos celulares destas terminações está na cadeia ganglionar simpática pré-vertebral, sendo que o gânglio celiaco é que provê fibras para o estômago (16). Contudo, também algumas fibras adrenérgicas originam-se no gânglio cervical e chegam ao estômago através do nervo vago (17). Em adição, neurônios catecolaminérgicos na região caudal do NDV, em ratos, projetam-se seletivamente para o corpo gástrico (18). Foram identificados subtipos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenoceptores em diferentes níveis do trato gastrointestinal que podem ter participação importante no controle da motricidade gástrica (17). A ativação de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos pré-sinápticos induz várias respostas no trato gastrointestinal. Admite-se que a ativação dos  $\alpha_2$ -adrenoceptores pré-sinápticos localizados no nervo vago resulta na redução de liberação de acetilcolina do nervo colinérgico terminal. A ativação do subtipo  $\alpha_{2B}$ -adrenoceptor determina proteção da mucosa gástrica e a ativação

do subtipo  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor pode ser responsável pela inibição do EG (19). Entretanto, há possibilidade de que, em adição à ativação de  $\alpha_2$ -adrenoceptores pré-sinápticos, também os pós-sinápticos estejam envolvidos na redução da motricidade gástrica (20).

Por outro lado, em ratos, há evidências que neurônios aferentes e eferentes do nervo vago possuam  $\beta$ -adrenoceptores, sendo que o subtipo  $\beta_2$ -adrenoceptor parece ser o predominante. Estes receptores adrenérgicos têm transporte bidirecional através dos axônios do nervo. A presença destes receptores no gânglio vagal inferior, potencialmente, explica o mecanismo de ação de antagonistas  $\beta$ -adrenoceptores na terapêutica da hipertensão (21). Contudo, não há informações da presença destes receptores em fibras vagais conectadas com o estômago. Adicionalmente, tem sido observado que  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - e  $\beta_3$ -adrenoceptores localizam-se principalmente nas células musculares lisas no trato digestório (17). Recentemente, surgiram indicações de altos níveis de expressão de mRNA  $\beta_3$ -adrenoceptores nas fibras musculares do fundo gástrico e níveis moderados no piloro (22). Os  $\beta_3$ -adrenoceptores, entre os subtipos beta-adrenérgicos, são os que predominantemente participam do relaxamento induzido por catecolaminas no fundo gástrico de ratos (23). O fundo gástrico constitui a maior porção do estômago proximal responsável pela acomodação do bolo alimentar e, em parte, pelo EG de líquido (10,24). Não há evidências conclusivas de que o sistema simpático participe dos mecanismos fisiológicos do EG. Forster *et al* (25) demonstraram que a simpatectomia química crônica e aguda realizada com sulfato de guanetidina não alteraram o padrão do EG de refeições líquidas protéicas, hiper-osmóticas e ácidas. A retirada do gânglio celíaco alterou o padrão dessas refeições, contudo, pode ser devido à ação de fibras aferentes vagais e esplênicas que passam pelo gânglio (25)

A atividade motora gástrica, além de ser controlada por fatores neurais, encontra-se também sob a regulação de hormônios produzidos no trato gastrointestinal que atuam também como neurotransmissores. Grande parte deles atua sobre a motricidade gástrica apenas em doses farmacológicas. A

colecistocinina (CCK) produzida pelas células endócrinas I no duodeno parece desempenhar, em doses fisiológicas, atividade inibitória sobre o EG, bem como a serotonina liberada pelas células enterocromafins like, através de sua ação sobre receptores vagais. As fibras aferentes pelas quais a CCK exerce seus efeitos sobre a motricidade gástrica são de dois tipos Tipo A (insensível à capsaicina) e do tipo C (sensível à capsaicina) (26). Estudos recentes mostraram que o GLP-I (glucagon like peptide) e PYY (peptide YY) têm efeito inibitório sobre as contrações do íleo e reflexamente do EG. Além disso, grelina, encontrada principalmente na mucosa do estômago proximal, e motilina demonstraram ser ativadoras do EG, especificamente das contrações do complexo motor migratório (CMM) (27).

## **2.2. ESTÔMAGO E SUA FUNÇÃO MOTORA: O ESVAZIAMENTO GÁSTRICO**

A função do estômago é atuar como reservatório dos alimentos ingeridos e fazer a quebra química e mecânica de seu conteúdo, gerando um quimo fluido que será entregue ao duodeno de uma forma controlada (27).

A atividade motora básica desse órgão tem sua expressão máxima no esvaziamento gástrico (EG), que é um processo de transferência do conteúdo gástrico ao duodeno, resultante da ação de mecanismos estimuladores e inibitórios que controlam a atividade do estômago, piloro e duodeno (10). Possivelmente, o EG é uma das funções mais importantes desse órgão. Para que se inicie o EG do quimo é necessário que este esteja misturado ao suco gástrico e que as partículas sólidas estejam suficientemente trituradas para passar pelo piloro. O impacto metabólico do EG está relacionado diretamente à quantidade de refeição que chega ao duodeno. Para isso, é importante a integração das contrações do estômago, piloro e duodeno. As células nervosas extrínsecas e intrínsecas e as células secretoras de hormônios são as responsáveis pela

coordenação dos movimentos necessários para realização do EG e a secreção do suco gástrico (2, 26, 28).

Todo o controle da atividade motora gástrica tem como alvo de ação as células musculares lisas. Essas células possuem um potencial de membrana negativo como todas as células do corpo, contudo, este não é constante, flutua ritmicamente, isto é, despolarizando e repolarizando. Cada onda de despolarização e repolarização é denominada onda lenta, e estas são desencadeadas numa frequência de 3 ciclos por minuto estabelecendo, com isso, um ritmo elétrico basal (REB) ou atividade rítmica basal na musculatura do estômago, que pode desencadear uma contração, dependendo dos estímulos que está recebendo (2). As contrações geradas pela atividade elétrica do estômago podem ser de quatro tipos: fásicas, fásicas peristálticas, tônicas geradas sem potencial de ação e tônicas geradas com muito potencial de ação (2,10).

Esse órgão é dividido em duas regiões funcionais que correspondem às diferentes funções (Figura 2): a proximal, que compreende o fundo e parte do corpo responsável principalmente pela acomodação do bolo alimentar e EG de líquido, e a distal que inclui parte inferior do corpo, antro e o piloro e está ligada ao esvaziamento de sólidos. Há uma importante diferença de atividade elétrica e mecânica das células da região proximal em relação à distal (Figura 3) (10).

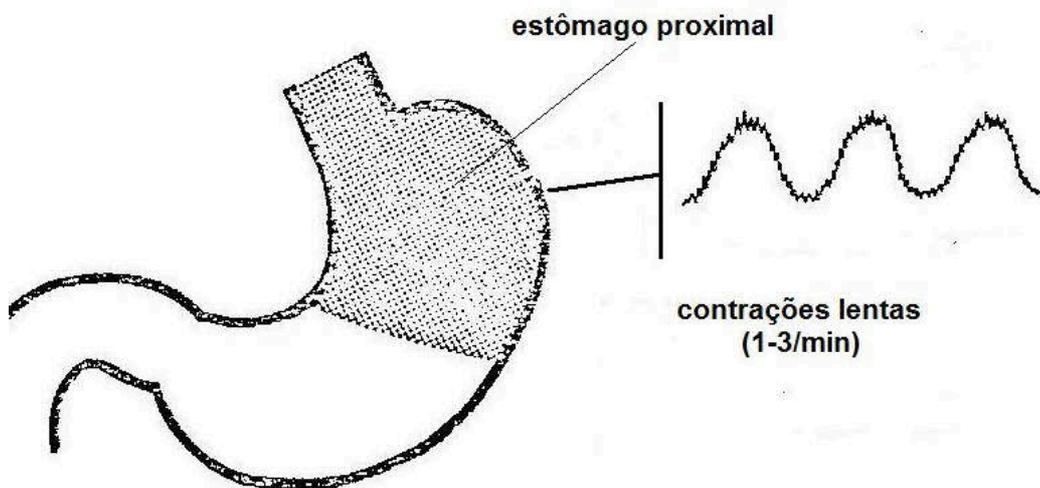


Figura 3: Atividade motora do estômago proximal. Modificada de Minami H & McCallum RW (29).

A atividade motora principal do estômago proximal é de acomodação do bolo alimentar, como citado anteriormente, sendo que essa porção apresenta contrações tônicas geradas pelo próprio potencial de membrana. Mesmo com a chegada do alimento, a pressão interna é essencialmente igual à intra-abdominal, graças ao fato de que esta região possui dois reflexos importantes que garantem essa característica. O primeiro é o reflexo receptivo que ocorre quando o bolo alimentar é deglutido e, com isso é desencadeado um estímulo vago-vagal de curta duração que relaxa a musculatura do esfíncter gastroesofágico e da porção proximal do estômago para receber o alimento. O segundo é o reflexo adaptativo, que ocorre com a chegada do alimento ao estômago. Os estímulos aferentes deste reflexo são gerados por mecano-receptores sensíveis ao estiramento na parede do estômago e por osmo- e químio-receptores do duodeno. As fibras eferentes não-colinérgicas não adrenérgicas provavelmente liberam NO e VIP, que participam do fenômeno. Estes reflexos permitem armazenar quantidades crescentes de alimento, com variação mínima da pressão intra-gástrica (10).

Devido à presença de contrações fásicas peristálticas ultra-lentas (0,5-1,0/min) nessa região, ocorre uma pequena atividade de mistura dos alimentos no local (10).

O EG de líquido é essencialmente diferente do EG de sólido. Assim que uma refeição líquida chega ao estômago, ela é rapidamente distribuída por toda cavidade do órgão, pelas contrações fásicas ultra-lentas do estômago proximal. O volume é um importante facilitador do EG de líquido. Refeições líquidas não calóricas iniciam o esvaziamento de forma mono-exponencial quase que imediatamente, sendo diretamente proporcional ao volume. Assim, o volume de uma solução salina que sai do estômago por unidade de tempo é diretamente proporcional ao volume presente em seu interior (3).

Diferentemente do estômago proximal, a porção distal tem uma atividade contrátil pronunciada, primariamente mediada pela acetilcolina. O início das ondas lentas se dá na zona de marca-passo do estômago, constituída pelas células intersticiais de Cajal, que são células nervosas modificadas e estão localizadas na porção média da grande curvatura do órgão (27,30)

Com a chegada do bolo alimentar, iniciam-se inúmeras contrações fásicas peristálticas de diferentes intensidades. Em humanos, inicialmente, o estômago se contrai (contrações fásicas) durante as ondas lentas de maneira irregular e, minutos depois de iniciada a refeição, o ritmo se estabiliza em 3 contrações por minuto, ocorrendo quase que continuamente, propelindo e misturando o conteúdo gástrico, conduzindo-o a ultrapassar o piloro (2) (figura 4).

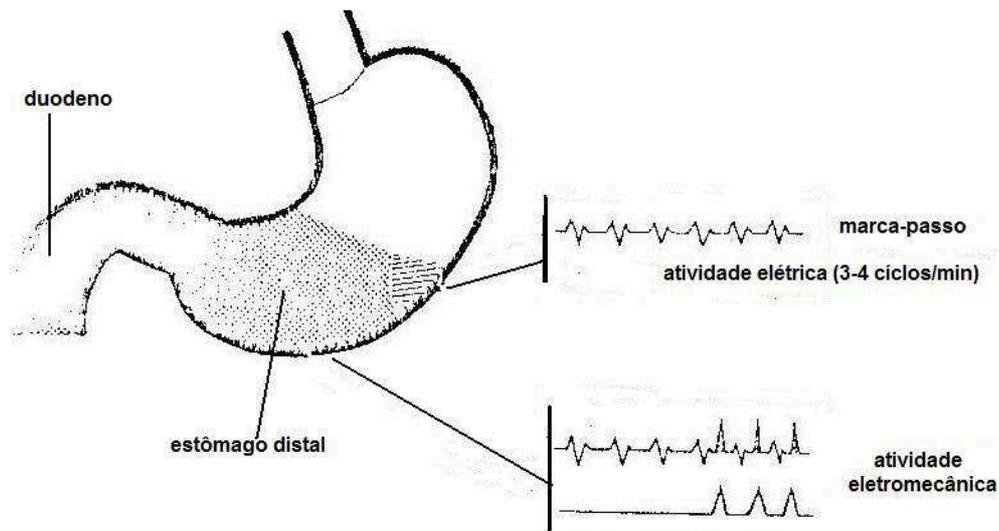


Figura 4: Atividade elétrica do marca-passo gástrico e eletromecânica do estômago distal. Modificada de Minami H & McCallum RW (29).

O piloro está, por sua vez, contraído tonicamente e abre ocasionalmente por ação do NO e VIP, quando a onda peristáltica do antro chega até ele; deste modo, o alimento, se não é transferido para o duodeno, retorna ao corpo, fenômeno denominado retropropulsão, que facilita a trituração das partículas sólidas, reduzindo-as a fragmentos suficientemente pequenos para passar pelo piloro (figura 5) (10,27).



Figura 5: Atividade mecânica no esvaziamento gástrico de sólido. Modificada de Kelly KA.(31).

O EG de sólidos é realizado pelo estômago distal e ocorre em duas fases: a primeira, uma fase de retenção, em que os alimentos sólidos são redistribuídos pelo órgão e reduzidos a partículas menores que 1-2 mm, e a segunda, em que os alimentos são esvaziados de forma linear (3).

Quando o estômago está completamente vazio, no estado de jejum, aproximadamente 4 horas depois da ingestão do alimento, inicia-se um fenômeno motor cíclico denominado complexo motor migratório (CMM). O CMM é dividido em três fases: Fase 1, chamada também de quiescente; fase 2, com contrações intermitentes de alta amplitude; e, finalmente, a fase 3, que caracteriza-se por contrações fortes e em alta frequência, cerca de três por minuto no estômago, chegando a apresentar 11-12 ciclos por minuto no duodeno . Essas contrações interdigestivas levam as partículas não digeridas do estômago ao duodeno para serem transportadas ao cólon (10,30).

### **2.3. REGULAÇÃO DO ESVAZIAMENTO GÁSTRICO**

Quando a primeira porção de quimo chega ao duodeno, suas propriedades físico-químicas são fatores determinantes para as modificações da função motora do órgão, ajustando o EG às capacidades de digestão e absorção do intestino delgado.

Os estímulos sensitivos que o alimento ingerido gera são baseados em suas características como: volume, estado líquido ou sólido, temperatura, osmolaridade, pH e composição de macro-nutrientes, que definem o padrão do EG da refeição (figura 5) (25, 30).

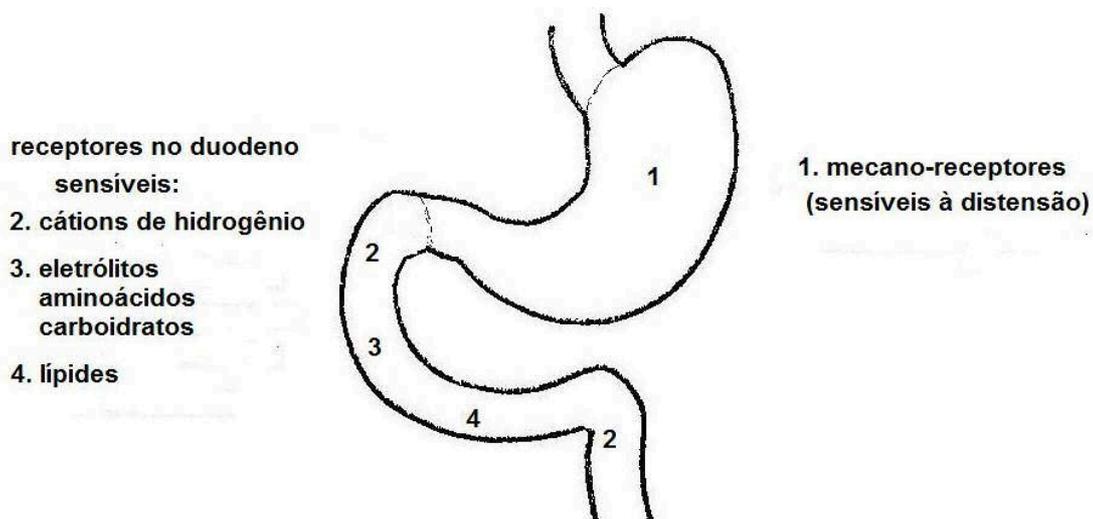


Figura 5: Localização esquemática dos receptores que modulam o EG. Modificada de Minami H & McCallum RW (29).

O intestino delgado tem uma capacidade limitada de absorver carboidratos, proteínas e gorduras; deste modo, a composição química dos alimentos interfere no ritmo do EG e isso ocorre através de estímulos neurais e hormonais que inibem as contrações da musculatura gástrica, para adequar o esvaziamento à capacidade de assimilação do duodeno (2).

Os líquidos isocalóricos alcançam o duodeno mais rapidamente e o EG de líquidos hipo- ou hiper-osmóticos é mais lento por ativação de receptores osmóticos no duodeno, no ultimo caso, provavelmente para não haver sobrecarga iônica na região (2).

A ativação de receptores duodenais desencadeia estímulos para liberação de colecistocinina (CCK) e 5-hidroxitriptamina (5-HT) que vão ativar receptores CCK<sub>1</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, respectivamente, nas terminações aferentes do nervo vago, modulando o EG (32-33). Há indicações de que ocorre uma inibição do EG desencadeada pela liberação local no íleo de GLP e PYY, com a chegada do conteúdo intraluminal à região (3).

Desordens na motricidade gástrica podem estar associadas a alterações da taxa de EG. Quando o EG não ocorre de forma apropriada, alguns sintomas como náusea, saciedade precoce, anorexia, vômitos e outros podem aparecer. (10). Os fatores mais comuns que alteram a taxa de EG são aqueles que, por alguma razão, causam a obstrução da saída do alimento, como em alguns casos de câncer gástrico e úlcera péptica. Além disso, inflamações e lesões causadas por úlcera gástrica podem levar à obstrução do lúmen gástrico (10). A gastroparesia é uma desordem crônica do estômago, caracterizada pelo retardo do EG, no entanto, sem uma obstrução mecânica do órgão (30). Essa desordem pode aparecer em uma série de alterações clínicas de diferentes naturezas, como *diabetes mellitus*, após cirurgia gástrica ou são idiopáticas. O retardo do EG também aparece em casos de dispepsia funcional em aproximadamente 25%-40% dos pacientes (34).

Algumas cirurgias gástricas alteram o EG. Assim, a vagotomia parcial ou total desse órgão acelera o EG de líquidos, devido perda do relaxamento receptivo e aumento do tônus do estômago proximal e, também, perda do ritmo e direção das contrações do distal. A gastrectomia do estômago distal, com anastomose direta no jejuno ou duodeno, acelera o EG de líquido ou sólido dependendo do local da cirurgia. A piloroplastia não altera as funções do estômago proximal; no entanto, o EG de sólido é acelerado (35).

Além disso, muitos fármacos são capazes de alterar o EG. Entre os antiinflamatórios não esteroidais (AINES), por exemplo, Santos et al demonstraram que alguns inibidores seletivos para COX-2 retardam o EG de líquido em ratos (36). Em cães, o mesmo inibidor de COX, também demonstrou alteração no EG de líquido (37). Outros, como aspirina, acetaminofen e indometacina também interferem no EG, por mecanismos pouco conhecidos (38-40).

## 2.4. DERIVADOS FENILPIRAZOLÔNICOS E O Esvaziamento Gástrico de Líquido

Entre os AINES, foi observado que a dipirona, em doses elevadas, determina retarde do EG em ratos (43). Empregando solução salina como refeição de prova, confirmamos este efeito (44). Esta droga, sintetizada há mais de 80 anos, é um derivado fenilpirazolônico com atividade analgésica e antipirética, em parte decorrentes da ação da própria dipirona ou de seus metabólitos sobre o SNC (45-48).

Adicionalmente, observamos que por via intravenosa (*iv*) e intra-cerebro-ventricular (*icv*), em ratos, essa droga retarda o EG de uma refeição líquida. Quando administrada por via *iv*, o fenômeno foi abolido pela vagotomia e lesão eletrolítica do NPV (49). Em outro estudo, foi demonstrado que este efeito foi bloqueado pela injeção *icv* de baclofen, um agonista de receptores GABA<sub>B</sub> (50).

Takanaka *et al.* (51), estudando o efeito da antipirina (dimetilantipirina), outro derivado fenilpirazolônico, no EG de ratos, observaram retardo após sua administração. Soares *et al* confirmaram que a antipirina retarda EG de uma refeição de prova salina em ratos (52). O conjunto destes estudos sugere a participação do SNC e do nervo vago no fenômeno.

A dipirona é uma pró-droga que administrada via oral é rapidamente hidrolisada no suco gástrico, formando a 4-metilaminoantipirina e absorvida sob esta forma. A 4-metilaminoantipirina é demetilada, na sua maior parte no fígado, diretamente para 4-aminoantidipirina com geração posterior de outros metabólitos (46,48). Participam destes processos metabólicos iso-enzimas do citocromo P450 (48,53). As propriedades farmacológicas da dipirona são atribuídas aos metabólitos ativos 4-metilaminoantipirina e 4-aminoantidipirina (46,48).

Não há informações, na literatura, do efeito dos metabólitos da dipirona sobre o EG, embora, em ratos, tenha sido demonstrado que derivados da fenilpirazolona induzem retardo, como demonstrado no estudo de Soares *et al* (52). Num estudo prévio, demonstramos que a administração *iv* de 4-aminoantipirina diminui o EG de líquido em ratos (54).

Em situações em que há alteração no EG, a participação do estômago no processo pode ser inferida através da determinação *in vivo* do volume e da complacência gástrica, como indicadores do tônus gástrico (55). O tônus gástrico reflete variações nas contrações tônicas da área proximal do estômago, responsável pela acomodação do bolo alimentar, como antes descrito. De um modo geral, a diminuição do tônus é acompanhada de EG mais lento de líquido (56). Por outro lado, o aumento mecânico do tônus gástrico por funduplicatura, em ratos, foi acompanhado do aumento do EG de líquido (55). É possível que o retardo do EG determinado pela dipirona, antipirina e 4-aminoantipirina seja decorrente da diminuição do tônus gástrico.

Como, das três drogas, somente a dipirona induziu o mesmo efeito quando administrada *icv*, e o retardo do EG induzido por essas drogas *iv* foi abolido pela vagotomia sub-diafragmática (49,52,54), é possível especular que o estímulo inibitório do EG, na administração *iv*, chegue ao SNC através de vias aferentes periféricas.

A capsaicina é uma neurotoxina que administrada a ratos recém nascidos resulta em degeneração irreversível da maioria dos neurônios aferentes periféricos com axônios não mielinizados (fibras C) e de uma minoria de fibras escassamente mielinizadas (fibras A $\delta$ ). Esta neurotoxina constitui uma sonda importante para investigação funcional dos neurônios aferentes sensíveis à mesma, e que, em adição à transmissão de estímulos nociceptivos, também estão envolvidos na saciedade e termo-regulação e nos reflexos cardiovasculares, viscerais e neuro-endócrinos (57).

Finalmente, como há evidências de que o SNS, através de receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos (17-23), pode interferir na motricidade gástrica, especulativamente, é possível que a ativação de um destes receptores adrenérgicos possa estar envolvida no efeito sobre o EG de salina, induzido pelos derivados fenilpirazolônicos.

Sendo assim, dando continuidade à investigação dos possíveis mecanismos envolvidos no retardo do EG induzido pela dipirona, 4-aminoantipirina e antipirina, foram desenvolvidos os trabalhos apresentados nos Capítulos 1, 2 e 3.

## **OBJETIVOS**

## **Geral:**

Avaliar os mecanismos pelos quais os derivados fenilpirazônicos atuam causando retardo do EG.

## **Específicos para cada capítulo:**

### **Capítulo 1**

- Comparar o efeito, sobre o EG, da dipirona e 4-aminoantipirina por via *iv* e *icv*;
- Avaliar o efeito *iv* das duas drogas sobre a complacência do estômago de ratos anestesiados;
- Determinar o efeito da administração *iv* de 4-aminoantipirina sobre o EG quanto à dose-resposta e tempo-resposta;
- Avaliar a participação do nervo vago e dos receptores GABA<sub>B</sub> do SNC, sobre o efeito no EG da administração *iv* de 4-aminoantipirina.

### **Capítulo 2**

- Avaliar o efeito sobre o EG da injeção *iv* da dipirona, 4-aminoantipirina e antipirina em doses equimolares (240 µmol/kg) em ratos, pré-tratados com capsaicina no período neonatal;
- Avaliar o efeito sobre o EG da injeção *icv* de dipirona (4 µmol/animal) em ratos, pré-tratados com capsaicina no período neonatal;

### **Capítulo 3**

- Verificar a participação dos receptores adrenérgicos sobre o retardo do EG induzido pela dipirona, 4-aminoantipirina e antipirina.

## **CAPITULO 1**

# Effect of 4-aminoantipyrine on gastric compliance and liquid emptying in rats

A.M. Vinagre<sup>2</sup>  
and E.F. Collares<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Pediatria, <sup>2</sup>Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental,  
<sup>3</sup>Centro de Investigação em Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas,  
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

## Abstract

Correspondence  
E.F. Collares  
Departamento de Pediatria  
Faculdade de Ciências Médicas  
UNICAMP  
13083-970 Campinas, SP  
Brasil  
Fax: +55-19-3521-7322  
E-mail: efcollares@hotmail.com

Publication supported by FAPESP.

Received September 29, 2006  
Accepted May 9, 2007

Dipyron (Dp) delays gastric emptying (GE) in rats. There is no information about whether 4-aminoantipyrine (AA), one of its metabolites, has the same effect. The objectives of the present study were to assess the effects of AA and Dp on GE when administered intravenously (iv) and intracerebroventricularly (icv) (240  $\mu$ mol/kg and 4  $\mu$ mol/animal, respectively) and on gastric compliance when administered iv (240  $\mu$ mol/kg). GE was determined in male Wistar rats weighing 250-300 g (5-10 per group) after icv or iv injection of the drug by measuring percent gastric retention (GR) of a saline meal labeled with phenol red 10 min after administration by gavage. Gastric compliance was estimated in anesthetized rats (10-11 per group), with the construction of volume-pressure curves during intragastric infusion of a saline meal. Compliance was significantly greater in animals receiving Dp (mean  $\pm$  SEM = 0.26  $\pm$  0.009 mL/mmHg) and AA (0.24  $\pm$  0.012 mL/mmHg) than in controls (0.19  $\pm$  0.009 mL/mmHg). AA and Dp administered iv significantly increased GR (64.4  $\pm$  2.5 and 54.3  $\pm$  3.8%, respectively) compared to control (34  $\pm$  2.2%), a phenomenon observed only with Dp after icv administration. Subdiaphragmatic vagotomy reduced the effect of AA (GR = 31.4  $\pm$  1.5%) compared to sham-treated animals. Baclofen, a GABA<sub>B</sub> receptor agonist, administered icv significantly reduced the effect of AA (GR = 28.1  $\pm$  1.3%). We conclude that Dp and AA increased gastric compliance and AA delayed GE, with the participation of the vagus nerve, through a pathway that does not involve a direct action of the drug on the central nervous system.

Key words  
· Gastric emptying  
· Gastric compliance  
· 4-Aminoantipyrine  
· Dipyron  
· Vagus nerve

## Introduction

Dipyron (Dp), a phenylpyrazolone derivative, administered intravenously (iv) and intracerebroventricularly (icv) to rats, delays the gastric emptying (GE) of a liquid meal. When the drug was administered iv the phenomenon was abolished by vagotomy and by electrolytic lesion of the paraventricular

nucleus of the hypothalamus (1). Furthermore, it was demonstrated that this effect is blocked by icv injection of baclofen (bac), a GABA<sub>B</sub> receptor agonist (2).

GE is the process of gastric content transfer to the small intestine caused by the coordinated motor activity of the stomach, pylorus and duodenum (3). In situations in which there is an alteration of GE, the par-

participation of the stomach in the process can be inferred by their *in vivo* determination of volume and of gastric compliance as indicators of gastric tonus (4). Gastric tonus reflects variations in the tonic contractions of the proximal area of the stomach, which is responsible for accommodation of the food bolus. The tonus of this region is the result of the balance of stimulatory (increasing) and inhibitory (reducing) activities, with regulation mostly occurring via the vagus nerve. In general, the reduction of tonus is accompanied by a slower GE of fluid (5). On the other hand, the mechanical increase of gastric tonus by fundoplication in rats was accompanied by an increased liquid GE (4). It is possible that the delayed GE determined by Dp is due to a reduction of gastric tonus.

Dp (sodium salt of antipyrinyl-methylaminomethane-sulfonic acid) is a pro-drug that is rapidly hydrolyzed by the gastric juice when administered by the oral route, forming 4-methylaminoantipyrine and being absorbed in this form (6,7). 4-Methylaminoantipyrine is directly demethylated, mostly in the liver, to 4-aminoantipyrine (AA), with the later generation of other metabolites. Cytochrome P450 metabolic isoenzymes participate in this process (7,8). The pharmacological properties of Dp are attributed to its active metabolites 4-methylaminoantipyrine and AA (6,7).

There are no literature reports about the effect of Dp metabolites on GE although it has been demonstrated that phenylpyrazolone derivatives induce delayed GE (9,10). In a previous study by our group, we demonstrated that the administration of AA reduces the GE of liquid in rats (11).

On this basis, the objectives of the present study carried out on rats were: 1) to compare the effect of Dp and AA administered *iv* and *icv* on GE, 2) to assess the *iv* effect of the two drugs on the stomach compliance of anesthetized rats, 3) to determine the effect of *iv* administration of AA on GE in terms of dose-response and time-response, and 4) to assess

the participation of the vagus nerve and of GABA<sub>B</sub> receptors of the central nervous system (CNS) in the effect of *iv* administration of AA on GE.

## Material and Methods

Male Wistar rats weighing 250-300 g were used. The experimental protocols applied in the present study obeyed the recommendations of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). Before being submitted to the surgical procedures for vagotomy or for the implantation of a cannula into the lateral ventricle of the brain, the animals were sedated with an *ip* injection of thiopental, 75 mg/kg. After the procedures or after entry in the study the animals were kept in individual cages with free access to water and ration. For the study of gastric compliance, the animal was anesthetized with a mixture of 85 mg/kg ketamine + 10 mg/kg xylazine administered *ip*.

Dp (Sigma, St. Louis, MO, USA), AA (Sigma) and bac (Sigma) were diluted with sterile physiological saline as a vehicle at the time of the study. The doses, in  $\mu\text{mol}$ , applied *iv* and *icv* were established on the basis of previous studies with Dp (1,2). GE and stomach compliance were determined after a 24-h fast, although the animals continued to receive water *ad libitum* up to 30 min before the studies.

In all the studies described below, except for the time-response effect, GE was assessed in each animal 10 min after the *iv* or *icv* administration of the drug or vehicle. For the comparison of the effect of *iv* administration on GE, 240  $\mu\text{mol/kg}$  Dp or AA (80 and 48.77 mg/kg, respectively) or vehicle (control) were administered through a caudal vein. In the study of the *icv* effect, a stainless steel cannula (22 G) was implanted into the right lateral ventricle of each animal eight days before the experiment using previously established coordinates (1). An internal microinjection cannula (28 G) con-

ected by polyethylene tubing to a 25- $\mu$ L Hamilton syringe was used for icv injection. A 10- $\mu$ L volume of vehicle (control) or Dp solution (4  $\mu$ mol = 1333.2  $\mu$ g) or AA solution (4  $\mu$ mol = 812.8  $\mu$ g) was used.

In the dose-response study, 30 (6.09 mg/kg), 60 (12.19 mg/kg), 120 (24.38 mg/kg), and 240  $\mu$ mol/kg (48.77 mg/kg) AA were administered iv. Control animals received vehicle by the same route.

For the evaluation of the participation of the vagus nerve, the rats were submitted to subdiaphragmatic section of the ventral and dorsal branches of the vagus (VgX group) two weeks before the experiment. The sham group consisted of rats submitted to surgery without sectioning of the vagus. Each of these groups was divided into two groups receiving vehicle (control) and AA at the dose of 240  $\mu$ mol/kg (48.77 mg/kg) iv, respectively.

The participation of GABA<sub>B</sub> receptors in the CNS in the effect of AA on GE was assessed by using icv injection of 10  $\mu$ L vehicle (bac0), or of a solution containing 2  $\mu$ g baclofen (bac2), followed by iv vehicle (control), or an AA solution of 240  $\mu$ mol/kg. For the study of the time-response effect, 240  $\mu$ mol/kg (48.77 mg/kg) AA or vehicle were injected iv and GE was determined 10, 30, 60, 120, and 240 min after administration.

GE was evaluated indirectly in awake animals by determining percent gastric retention (GR) of 2 mL/kg of a saline test meal labeled with phenol red at the concentration of 60  $\mu$ g/mL, 10 min after administration by gavage using a standardized technique (12). The absorbance of the dye was read with a spectrophotometer at 560-nm wavelength.

Compliance was measured by the technique described by Bustorff-Silva et al. (4). After a 24-h fast, the animals were anesthetized and submitted to tracheotomy, abdominal incision, lavage of the stomach after pylorus ligation, and fixation in the distal esophagus of an orogastric polyethylene tube (2-mm inner diameter and 25 cm in length)

filled with saline and connected through a three-way stop cock to an infusion pump (model LF 2001; Lifemed, São Paulo, SP, Brazil) and to a monitor for pressure recording (Biomonitor 7; BESE, São Paulo, SP, Brazil). Thirty minutes after these procedures, each animal received an iv infusion through the external jugular of vehicle (control group), or of Dp or AA at the dose of 240  $\mu$ mol/kg. Ten minutes after iv application, saline solution at 37°C was infused into stomach at the rate of 2 mL/100 g weight  $\text{min}^{-1}$  intermittently every 20 s at 1-min intervals. The infusion was stopped every 20 s (1/3 of the volume) and the system was equilibrated for 50 s, with recording of intragastric pressure (IGP). IGP values corresponding to 1/3 and 2/3 of the volume and to the total volume were recorded and the procedure was repeated two more times at 30-min intervals. The results for each animal corresponded to the mean of the three IGP measurements at each point. Volume-pressure curves were constructed to estimate gastric compliance, which was calculated by the following formula: compliance (mL/mmHg) =  $(V_1 - V_0) / (P_1 - P_0)$ , where  $V_0$  = initial volume and  $V_1$  = final volume,  $P_0$  = initial IGP and  $P_1$  = final IGP.

At the end of the experiments all animals were sacrificed and 10  $\mu$ L 1% Evans blue solution was injected by the same route in those that had received icv injection. The brain was removed and fixed in 10% formalin for 24 h. After fixation, coronal sections of the brain were obtained and icv injection was confirmed when the dye was seen in the 4th ventricle.

Data are reported as mean  $\pm$  SEM and were analyzed statistically by ANOVA followed by the Tukey test, when necessary, for pair comparisons. The  $\alpha$  value was set at 5%.

## Results

Data regarding their effect of Dp and AA are presented in Figure 1A. Dp and AA

caused significantly greater GR compared to control. The increase in GR was more marked in the AA group (mean  $\pm$  SEM,  $64.4 \pm 2.5\%$ ) but was not significant compared to Dp ( $54.3 \pm 3.8\%$ ). A comparative evaluation of the icv effect of Dp and AA is presented in Figure 1B. A significant increase in GR was observed in the Dp group compared to control, a fact that was not observed after the admin-

istration of AA.

Figure 2 presents the volume-pressure curves for the rats treated with Dp and AA and for the saline controls. The pressures obtained with drug application in the three measurements were significantly lower than control. In addition, gastric compliance was significantly greater in the animals treated with Dp (mean  $\pm$  SEM,  $0.26 \pm 0.009$  mL/mmHg,  $N = 11$ ) and AA ( $0.24 \pm 0.012$  mL/mmHg,  $N = 10$ ) compared to the saline control ( $0.19 \pm 0.009$  mL/mmHg,  $N = 10$ ). The two drugs did not differ from one another regarding the effects on the volume-pressure curves and on gastric compliance.

There was a significant increase in GR in the animals treated with AA at the doses of 60, 120, and 240  $\mu$ mol/kg compared to control (Figure 3A), with a positive and significant correlation ( $r = 0.92$ ). We also observed that, at the dose of 240  $\mu$ mol/kg, the GR of the saline test meal was marked and significant at 10, 30, and 60 min compared to the respective controls, with a reduction at 120 min, and being no longer significant at 240 min (Figure 3B).

VgX reduced the effect of AA on GR, although a significant difference continued to be present compared to the animals submitted to the same surgical procedure and treated with vehicle (Figure 4A). There was a significant reduction of GR in VgX animals treated with AA compared to the sham group also treated with the drug (VgX + AA vs sham + AA) and nonsignificant reduction of GR between the control groups (VgX + control vs sham + control). This reduction was more intense, about 2.5-fold, among the animals treated with AA (a 56% reduction of mean GR) than in the control groups (a 22.3% reduction of mean GR).

The results regarding the effect of the icv administration of bac on the effect of AA are illustrated in Figure 4B. The bac0 AA group had a significantly greater GR compared to the bac0 control group. On the other hand, the GR of the bac2 AA group did not differ

Figure 1. Gastric retention of a saline test meal 10 min after administration to rats by gavage. A, Ten minutes before the evaluation of gastric retention, the animals received iv administration of vehicle (C), 240  $\mu$ mol/kg dipyrone (Dp, 80 mg/kg) or 4-aminoantipyrine (AA, 48.8 mg/kg). B, A metal cannula was implanted into the right lateral ventricle of all rats 8 days before the experiment. The animals received icv administration of 10  $\mu$ L vehicle (C) or an equal volume of a solution containing 4  $\mu$ mol (1.33 mg) Dp or 4  $\mu$ mol (813  $\mu$ g) AA. Gastric retention was evaluated 10 min after the icv injections. Data are reported as mean  $\pm$  SEM for 10 animals per group. \* $P < 0.05$  compared to control (Tukey test).

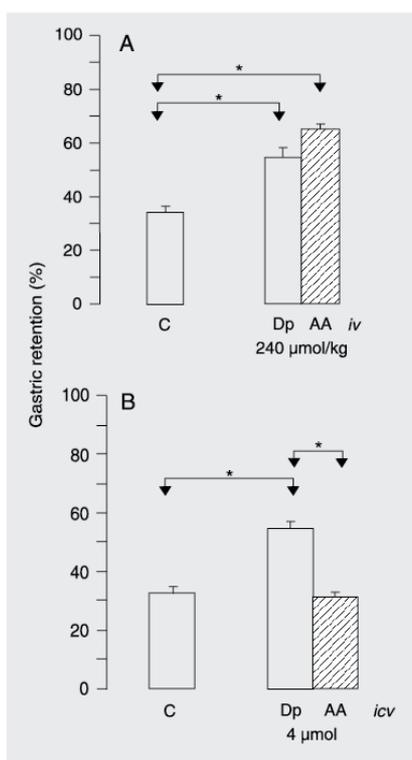
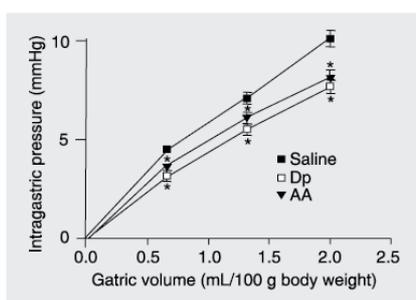


Figure 2. Volume-pressure curves after intragastric instillation of increasing saline volumes in anesthetized rats injected with dipyrone (Dp) iv or 4-aminoantipyrine (AA) at the dose of 240  $\mu$ mol/kg body weight or with vehicle (saline). Data are reported as mean  $\pm$  SEM; Dp ( $N = 11$ ), AA ( $N = 10$ ), saline ( $N = 10$ ); \* $P < 0.05$  compared to the saline control (Tukey test).



significantly from control (bac2 control). Bac administered *icv* significantly reduced GR in the animals treated *iv* with AA (bac0 AA vs bac2 AA), as also observed in the control group treated with *iv* saline (bac0 control vs bac2 control). However, the reduction was 2-fold greater among those treated with AA (a 56.4% reduction of mean GR) than among those that received saline (a 24.5% reduction of mean GR).

## Discussion

AA and Dp administered *iv* at equimolar doses caused a similar delay of GE of the same test liquid meal (Figure 1A). AA is one of the Dp metabolites that reaches 60% of plasma concentration in the CNS after the administration of this pro-drug (13). In a previous paper (1), we demonstrated that Dp at a dose 16-fold higher than that administered *iv* delays liquid GE, but this phenomenon was not observed with AA. These results were confirmed in the present study (Figure 1B).

Intravenous administration at equimolar doses of the two phenylpyrazolone derivatives to anesthetized animals induced an increase in gastric compliance nearly equal. Since gastric compliance reflects accommodation of the proximal stomach (fundus and part of the body), an area that is also responsible for GE of liquid (3), it is possible that the effect of these derivatives on GE or on part of it is the consequence of an increased relaxation of this functional part of the stomach.

The effect of AA on GE was dose dependent but was more intense and uniform during the first hour after administration (Figure 3A and B). In some aspects the results differed from those previously reported by us for Dp (1), i.e., at the dose of 60  $\mu\text{mol/kg}$  the effect of AA was significant compared to control, and 120 min after administration of the AA dose of 240  $\mu\text{mol/kg}$  the difference from control was maintained even though there was a reduction of the

effect of the drug.

There is evidence of vagus involvement in the delay of GE induced by AA since vagotomy reduced the effect of the drug, which was 2.5-fold greater than that observed in the animals that did not receive the

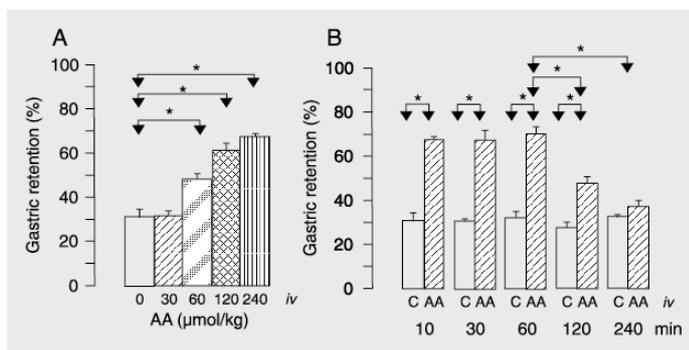


Figure 3. Gastric retention of a saline test meal 10 min after administration to rats by gavage. A, Ten minutes before the evaluation of gastric retention, the animals received vehicle (C) or 30, 60, 120, and 240  $\mu\text{mol/kg}$  4-aminoantipyrine (AA) *iv*. B, Ten, 30, 60, 120, and 240 min before the evaluation of gastric retention, the animals received vehicle (C) or 240  $\mu\text{mol/kg}$  AA *iv*. Data are reported as mean  $\pm$  SEM for 5 animals per group. \*P < 0.05 compared to control (Tukey test).

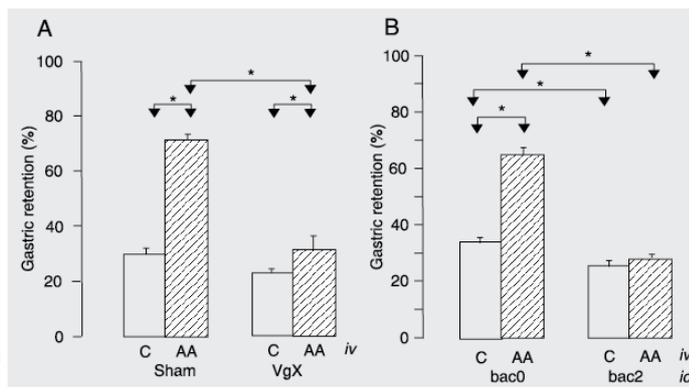


Figure 4. Gastric retention of a saline test meal 10 min after administration to rats by gavage. A, Two weeks before the experiment the animals were submitted to sham surgery or to subdiaphragmatic vagotomy (VgX). Ten minutes before the evaluation of gastric retention, the rats in each group received vehicle (C) or 4-aminoantipyrine (AA), 240  $\mu\text{mol/kg}$  *iv*. B, A metal cannula was implanted into the right lateral ventricle of all rats 8 days before the experiment. The animals received an injection of 10  $\mu\text{L}$  vehicle (bac0) or an equal volume of a solution containing 2  $\mu\text{g}$  baclofen (bac2) *icv* injected over a period of 30 s, and vehicle (C) or a solution of AA, 240  $\mu\text{mol/kg}$  (AA, 48.77 mg/kg) *iv*. Gastric retention was evaluated 10 min after the *iv* injections. Data are reported as mean  $\pm$  SEM for 10 animals per group. \*P < 0.05 compared to control (Tukey test).

drug (Figure 4A). However, the difference continued to be significant compared to control. In a previous study, we observed that vagotomy fully abolished the effect of Dp (1). On this basis, it is not possible to exclude the apparently discrete action of AA, independent of the vagus nerve, on smooth muscle fibers and/or on the enteric nervous system of the stomach and duodenum, about which no information is available. The *in vitro* effect of Dp using preparations of intestinal segments (gastric musculature, jejunum and ileum) and of the ureter was minimal or absent (14-17).

Additionally, it was demonstrated that the delay in GE determined by AA was blocked by the administration of bac in the CNS (Figure 4B), as also reported for Dp (2). In the CNS, bac activates GABA<sub>B</sub> receptors, promoting modulation of neurotransmission by hyperpolarization of the postsynaptic membranes or inhibition of neurotransmitter release at the presynaptic endings (18). There is evidence that GABA participates in the control of gastric motility at the level of the nucleus tractus solitarius, a CNS structure that receives afferent information through the vagus nerve (19-21).

Although the mechanisms by which Dp and AA cause a delay in GE are unknown, it is possible to speculate that the phenomenon is due to the effect of a disequilibrium between the efferent stimulatory/inhibitory system of the vagus on gastric tonus, with origin in the CNS. Supporting this is the fact that vagotomy and their activation of GABA<sub>B</sub> receptors reduced the delay in GE caused by Dp (1,2) and by AA. Additionally, since AA had no effect when administered *iv*, it is

possible that the stimulation of the delay in GE produced by this metabolite reaches the CNS through an afferent pathway.

This hypothesis may be relevant also for antipyrine, another phenylpyrazolone derivative studied in our laboratory (22). In that study antipyrine showed some similarities to AA such as producing no effect when administered directly into the CNS and a reduced effect after vagotomy and after bac administration. However, antipyrine showed one difference compared to AA, i.e., the effect was more intense at 10 min after the administration of antipyrine, possibly due to the fact that the pharmacokinetics of antipyrine differs from that of AA (22).

On the other hand, it is reasonable to assume that the more prolonged effect of AA, which was not fully abolished by vagotomy, is due to the use of a higher dose in relation to the amount of this metabolite, which would be generated slowly in the internal medium from Dp. On this basis, Dp administered *iv* would produce a delay in GE not only through a possible direct action on the CNS (1), but also by the peripheral action of at least one of its metabolites (AA). This hypothesis, plus the possible participation of other metabolites, make it questionable that their effect of Dp on GE would occur by a direct action on the CNS, as previously proposed (1), actually functioning as a pro-drug.

Our data suggest that AA and Dp administered *iv* increase gastric compliance, and AA, with the participation of the vagus nerve, induces delayed GE of liquid in rats through a pathway that does not involve a direct action of the drug on the CNS.

## References

1. Collares EF, Vinagre AM. Evidence of the effect of dipyrone on the central nervous system as a determinant of delayed gastric emptying observed in rats after its administration. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 1375-1382.
2. Collares EF, Vinagre AM. Effect of the GABA<sub>B</sub> agonist baclofen on dipyrone-induced delayed gastric emptying in rats. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 99-104.
3. Weisbrodt NW. Gastric emptying. In: Johnson LR (Editor), *Gastrointestinal physiology*. 5th edn. St. Louis: Mosby; 1997. p 33-42.
4. Bustorff-Silva J, Perez CA, Fonkalsrud EW, Hoh C, Raybould HE.

- Gastric emptying after fundoplication is dependent on changes in gastric volume and compliance. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 1232-1235.
5. Azpiroz F. Control of gastric emptying by gastric tone. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 185-195.
  6. Brogden RN. Pyrazolone derivatives. *Drugs* 1986; 32 (Suppl 4): 60-70.
  7. Levy M, Zylber-Katz E, Rosenkranz B. Clinical pharmacokinetics of dipyrone and its metabolites. *Clin Pharmacokinet* 1995; 28: 216-234.
  8. Kraul H, Pasanen M, Sigusch H, Stenback F, Park SS, Gelboin HV, et al. Immunohistochemical properties of dipyrone-induced cytochromes P450 in rats. *Hum Exp Toxicol* 1996; 15: 45-50.
  9. Kato R, Takanaka A, Onoda KI, Omori Y. Drug affecting the gastric emptying rate and drug absorption. *Jpn J Pharmacol* 1972; 22: 434-436.
  10. Takanaka A, Onoda K, Kainuma E, Lienard F, Omori Y. Effect of phenylpyrazolone derivatives on gastric emptying rate and drug absorption in rats. *Jpn J Pharmacol* 1973; 23: 745-747.
  11. Vinagre AM, Collares EF. Efeito da 4-aminoantipirina sobre o esvaziamento de ratos. XIX Annual Meeting of the Federação de Sociedades de Biologia Experimental. August 25-28; Águas de Lindóia, SP, Brazil. 2004. p 09.050 (Abstract).
  12. Bucarechi F, Collares EF. Effect of *Phoneutria nigriventer* spider venom on gastric emptying in rats. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 205-211.
  13. Cohen O, Zylber-Katz E, Caraco Y, Granit L, Levy M. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of dipyrone metabolites after a single oral dose of dipyrone. *Eur J Clin Pharmacol* 1998; 54: 549-553.
  14. Alexander K, Khreis A, Traut G. The combined effect of noramidopyrine-methanesulfonate with choline and acetylcholine. *Arzneimittelforschung* 1963; 13: 493-497.
  15. Schiantarelli P, Murmann W, Magi S. Investigation of rociverine + dipyrone for antispasmodic and analgesic interactions. *Arzneimittelforschung* 1979; 29: 760-765.
  16. Hertle L, Nawrath H. Effect of Baralgin on isolated preparations of the upper urinary tract in man. *Urol Int* 1984; 39: 84-90.
  17. Herbert MK, Weis R, Holzer P, Roewer N. Peristalsis in the Guinea pig small intestine in vitro is impaired by acetaminophen but not aspirin and dipyrone. *Anesth Analg* 2005; 100: 120-127.
  18. Couve A, Moss SJ, Pangalos MN. GABA<sub>B</sub> receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci* 2000; 16: 296-312.
  19. Sivarao DV, Krowicki ZK, Hornby PJ. Role of GABA<sub>A</sub> receptors in rat hindbrain nuclei controlling gastric motor function. *Neurogastroenterol Motil* 1998; 10: 305-313.
  20. Bertolino M, Kellar KJ, Vicini S, Gillis RA. Nicotinic receptor mediates spontaneous GABA release in the rat dorsal motor nucleus of the vagus. *Neuroscience* 1997; 79: 671-681.
  21. Yuan CS, Liu D, Attele AS. GABAergic effects on nucleus tractus solitarius neurons receiving gastric vagal inputs. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 736-741.
  22. Soares AC, Vinagre AM, Collares EF. Effect of antipyrine on the gastric emptying of liquid in rats. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 1507-1512.

## **CAPITULO 2**

# Phenylpyrazolone derivatives inhibit gastric emptying in rats by a capsaicin-sensitive afferent pathway

A.M. Vinagre<sup>2</sup> and E.F. Collares<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Departamento de Pediatria, <sup>2</sup>Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

## Abstract

Dipyron (Dp), 4-aminoantipyrine (AA) and antipyrine (At) administered *iv* and Dp administered *icv* delay gastric emptying (GE) in rats. The participation of capsaicin (Cps)-sensitive afferent fibers in this phenomenon was evaluated. Male Wistar rats were pretreated sc with Cps (50 mg/kg) or vehicle between the first and second day of life and both groups were submitted to the eye-wiping test. GE was determined in these animals at the age of 8/9 weeks (weight: 200-300 g). Ten minutes before the study, the animals of both groups were treated *iv* with Dp, AA or At (240  $\mu$ mol/kg), or saline; or treated *icv* with Dp (4  $\mu$ mol/animal) or saline. GE was determined 10 min after treatment by measuring % gastric retention (GR) of saline labeled with phenol red 10 min after orogastric administration. Percent GR (mean  $\pm$  SEM, N = 8) in animals pretreated with Cps and treated with Dp, AA or At (35.8  $\pm$  3.2, 35.4  $\pm$  2.2, and 35.6  $\pm$  2%, respectively) did not differ from the GR of saline-treated animals pretreated with vehicle (36.8  $\pm$  2.8%) and was significantly lower than in animals pretreated with vehicle and treated with the drugs (52.1  $\pm$  2.8, 66.2  $\pm$  4, and 55.8  $\pm$  3%, respectively). The effect of *icv* administration of Dp (N = 6) was not modified by pretreatment with Cps (63.3  $\pm$  5.7%) compared to Dp-treated animals pretreated with vehicle (62.3  $\pm$  2.4%). The results suggest the participation of capsaicin-sensitive afferent fibers in the delayed GE induced by *iv* administration of Dp, AA and At, but not of *icv* Dp.

Key words: Gastric emptying; Dipyron; 4-Aminoantipyrine; Antipyrine; Capsaicin

## Introduction

The phenylpyrazolone derivatives dipyron (Dp), 4-aminoantipyrine (AA) and antipyrine (At) administered intravenously (*iv*; 240  $\mu$ mol/kg) delay the gastric emptying (GE) of a saline test meal in rats (1-4). Taken together, these studies suggest the participation of the central nervous system (CNS) and of the vagus nerve in the phenomenon. Considering that among the three drugs only Dp induced the same effect when the drugs were administered intracerebroventricularly (*icv*, 4  $\mu$ mol/animal) and the delay in GE induced by these drugs administered *iv* was abolished by subdiaphragmatic vagotomy (1,3,4), it is possible that the inhibitory stimulus of a drug administered *iv* on GE reaches the CNS through peripheral afferent pathways.

Capsaicin (Cps) is a neurotoxin that, when administered to newborn rats, results in irreversible degeneration of most peripheral afferent neurons with non-myelinated axons (C fibers) and of a minority of scarcely myelinated

fibers (A $\delta$  fibers). Capsaicin treatment of newborn rats has been widely used to explore the functional implications of Cps-sensitive afferent neurons. Afferent functions that are impaired by neonatal Cps comprise warmth reception and thermoregulation, cardiovascular reflexes, visceral reflexes, neuroendocrine reflexes, and satiety (5).

In a preliminary study, we demonstrated that the effect of Dp, AA and At administered *iv* on GE was completely blocked in young adult rats pretreated with Cps during the neonatal period, indicating the possibility that afferent fibers sensitive to the neurotoxin may transport the peripheral stimulus that determines the delay of emptying (6).

The objectives of the present study were to determine the effect on GE of *iv* injection of Dp, AA and At at equimolar doses (240  $\mu$ mol/kg) and of *icv* injection of Dp (4  $\mu$ mol/animal) in rats pretreated with Cps during the neonatal period.

Correspondence: E.F. Collares, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brasil. E-mail: efcollares@hotmail.com

Part of these data was presented at the XXI Annual Meeting of Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Águas de Lindóia, SP, Brazil, August 23-26, 2006.

Received February 18, 2009. Accepted September 23, 2009. Available online October 26, 2009.

## Material and Methods

Male Wistar rats were used. The experimental protocols applied in the present study followed the recommendations of SBCAL (Brazilian Society of Laboratory Animals Sciences) ([www.ib.unicamp.br/ceea/principios](http://www.ib.unicamp.br/ceea/principios)). Before the surgical procedure for implantation of a cannula in the lateral ventricle of the brain, the animal was sedated with an intraperitoneal (*ip*) injection of thiopental, 75 mg/kg. After cannula implantation or entry into the study, all animals were maintained in individual cages with ration and water available *ad libitum* but they were removed 24 h and 30 min, respectively, before GE evaluation.

Solutions of the drug used for pretreatment, Cps, and the drugs used for treatment, dipyrone, 4-aminoantipyrine and antipyrine (all from Sigma, USA), were prepared on the day of the experiment and protected from light when indicated.

Pretreatment consisted of the subcutaneous (*sc*) injection of Cps at the dose of 50 mg/kg or of vehicle (10% ethanol, 10% Tween 80 in saline) between the first and second day of life (7). After pretreatment the animals were kept in the laboratory, fed by their dams (4 animals per dam) for 4 weeks, and then for an additional 4/5 weeks after weaning, receiving ration and water *ad libitum* in individual cages. To determine the neurotoxic effect of Cps, sensitivity to pain was assessed on the day preceding the determination of GE by the eye-wiping test in both groups using a 1% NaOH

solution as an eye irritant (8).

The GE study was conducted on these animals at the age of 8/9 weeks when they weighed 200-300 g. Ten minutes before the study of GE the two groups were treated *iv* with equivalent doses of 240  $\mu\text{mol/kg}$  Dp (80 mg/kg), AA (48.77 mg/kg), At (45.17 mg/kg), or saline, as described in previous studies (1-4).

Eight days before the study of the effect of *icv* injected Dp, each animal in the groups pretreated with Cps during the neonatal period or with vehicle was implanted with a cannula in the right lateral ventricle using previously established coordinates (1). In the *icv* treatment, 10  $\mu\text{L}$  saline or 4  $\mu\text{mol}$  Dp (1333.2  $\mu\text{g}$ ) was used for each animal in the two groups and GE was evaluated 10 min after the end of the *icv* administration, as described in a previous study (1).

GE was assessed indirectly in awake animals by determining the percent gastric retention (% GR) of a test meal of saline labeled with phenol red (60  $\mu\text{g/mL}$ ) in a volume of 2 mL/100 g rat weight administered by gavage according to a standardized technique (9). Two modifications were introduced in the methodology previously used: 1) the reading for the determination of the concentration of phenol red dye was performed with a spectrophotometer at 560 nm and 2) before sacrifice the animals were sedated with halothane.

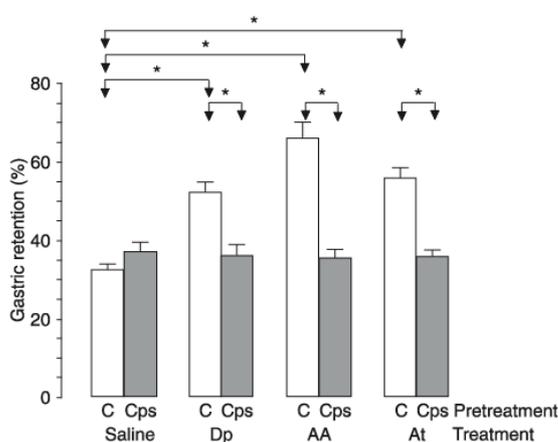
At the end of the experiment all animals were sacrificed and 10  $\mu\text{L}$  1% Evans blue solution was injected by the same route in the animals that had received the *icv* injection. The brains of the animals in this group were removed, fixed in 10% formalin for 24 h and cut into coronal sections, and the site of the *icv* injection was confirmed when the dye was detected in the IV ventricle.

Data are reported as means  $\pm$  SEM and were analyzed statistically by ANOVA followed by the Tukey test, when necessary. The level of significance was set at  $\alpha = 5\%$  for both tests.

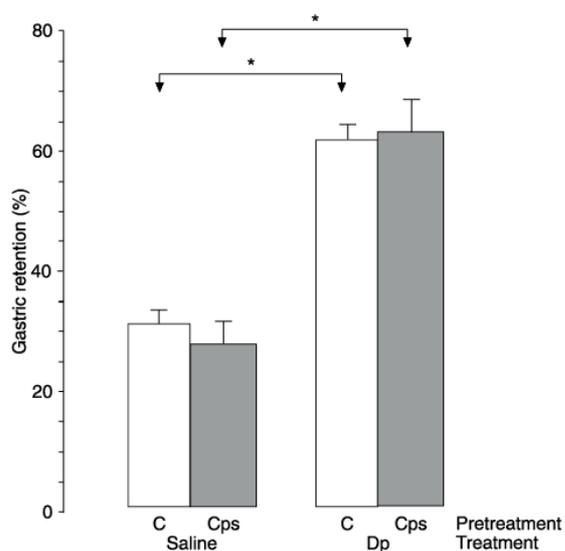
## Results

In the eye-wiping test, the group of animals pretreated with Cps during the neonatal period presented 0-3 eye wipes in 10 s (median = 0, N = 44) in order to counteract the irritating effect of a 1% NaOH solution and the group pretreated with vehicle presented 7-14 eye wipes in 10 s (median = 10, N = 44). The animals pretreated with Cps that did not present eye wipes (<4) in 10 s (8) were excluded from the study. The application of this functional test permitted the formation of two well distinct groups regarding the destruction of Cps-sensitive fibers.

Percent GR (mean  $\pm$  SEM, N = 8) was significantly higher in the animals pretreated with vehicle and treated with Dp, AA, or At (52.1  $\pm$  2.8, 66.2  $\pm$  4, and 55.8  $\pm$  3%, respectively) compared to saline-treated controls (32.2  $\pm$  1.8%; Figure 1), indicating delayed GE of the test meal induced by these phenylpyrazolone derivatives. Animals pretreated with Cps



**Figure 1.** Gastric retention of a saline test meal 10 min after administration to rats by gavage. The animals were pretreated with 50 mg/kg body weight capsaicin (Cps) or vehicle (C) between the first and second day of life. Eight weeks later, 10 min before the determination of gastric emptying, they were treated *iv* with saline or equivalent doses of 240  $\mu\text{mol/kg}$  dipyrone (80 mg/kg; Dp), 4-aminoantipyrine (48.77 mg/kg; AA), or antipyrine (45.17 mg/kg; At). Data are reported as means  $\pm$  SEM for 8 animals per group. \*P < 0.05 (Tukey test).



**Figure 2.** Gastric retention of a saline test meal 10 min after administration to rats by gavage. The animals were pretreated with 50 mg/kg body weight capsaicin (Cps) or vehicle (C) between the first and second day of life. Eight weeks later, 10 min before the determination of gastric emptying, they were treated *icv* with saline or 4  $\mu$ mol (1333.2  $\mu$ g/animal) dipyrone (Dp). Data are reported as means  $\pm$  SEM for 6 animals per group. \* $P < 0.05$  (Tukey test).

and treated with Dp, AA, or At presented GR values ( $35.8 \pm 3.2$ ,  $35.4 \pm 2.2$ , and  $35.6 \pm 2\%$ , respectively) that did not differ from their respective saline-treated controls ( $36.8 \pm 2.8\%$ ) but were significantly lower compared to their vehicle-pretreated controls that received the drugs. There was no significant difference between animals pretreated with vehicle or Cps and treated with saline.

Gastric retention data reported as percent (mean  $\pm$  SEM,  $N = 6$ ) after *icv* administration of Dp and saline are presented in Figure 2. Treatment with Dp of animals pretreated with vehicle caused significantly greater GR ( $62.3 \pm 2.4\%$ ) and Cps ( $63.3 \pm 5.7\%$ ) compared to their respective controls vehicle + saline ( $31.2 \pm 2.4\%$ ) and Cps + saline ( $27.7 \pm 3.9\%$ ). There was no significant difference between the vehicle-pretreated and Cps-pretreated groups that received the same treatment.

## Discussion

In the present study, we chose permanent injury to afferent pathways during the neonatal period. This option was based on our observation that the preparation of adult animals (administration of atropine and sedation) for *sc* injection of Cps (a total of 125 mg/kg) at fractionated doses over a period of 2-3 days (5,7) delayed GE *per se*, impairing the assessment of the effect of the drugs.

The results demonstrating the abolition of the effect of *iv* administration of Dp, AA and At on GE in animals pretreated with Cps (Figure 1) suggest the participation of afferent fibers sensitive to this neurotoxin in the transport of the peripheral stimulus that induces delayed GE. This fact permits us to conclude that, when the three drugs are administered *iv*, the phenomenon is not a consequence of their direct action on the smooth muscle fibers of the stomach or on the CNS. Previous studies had already shown that *icv* injection of AA and At does not interfere with GE of a saline test meal (1,3,4), indicating that these two phenylpyrazolone derivatives do not have a central effect.

Dipyrone was the only drug with an effect on GE when administered *icv* (1,3,4), a phenomenon that was not modified in the present study with the destruction of afferent fibers (Figure 2). This result and the observation that the effect of Dp administered *iv* was abolished by the destruction of afferent fibers by Cps make it questionable that the drug administered *iv* can induce delayed GE by a direct action on the CNS as we had previously proposed (1). Thus, the mechanism involved in the effect of Dp administered *icv* probably differs from that involved in the effect of the drug administered *iv*.

In this model, permanent injury to the afferent fibers occurs indistinctly in the extrinsic nervous system (vagus nerve and fibers of spinal projection) (7,10). If we assume that the afferent stimulus, which determines the effect of these three drugs on GE, originates in the digestive tract, it is not possible to determine the pathway it follows.

Section of afferent and efferent fibers by subdiaphragmatic vagotomy abolished the effect of these drugs (1,3,4). Cholecystokinin (CCK) activates the CCK<sub>1</sub> receptors on the Cps-sensitive vagal afferent nerve endings of the intestine and participates in the mechanism of GE control (11,12). 5-Hydroxytryptamine (5-HT; serotonin) also participates in the mechanism of GE control, activating 5-HT<sub>3</sub> receptors on the afferent spinal and vagal nerve endings (13). On this basis, it is tempting to speculate that CCK and 5-HT, which participate in the feedback mechanism of GE by activating the respective receptors on the afferent nerve endings of the vagus nerve, may be involved in this effect. In a preliminary study, we demonstrated that *iv* pretreatment with the doses of devazepide (1 mg/kg) or ondansetron (1 mg/kg) reported in the literature under other experimental conditions (14,15) to be effective for the selective blockade of CCK<sub>1</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors, respectively, did not abolish or attenuate the delay in GE induced by *iv* administration of Dp, AA and At (16,17). This observation suggests that these receptors may not be involved in the effect of these phenylpyrazolone derivatives on GE.

The observation of the participation of Cps-sensitive afferent fibers in the effect of these drugs on GE and the possible mechanisms involved raise additional speculations, which are outside the scope of the present communication.

## References

1. Collares EF, Vinagre AM. Evidence of the effect of dipyrone on the central nervous system as a determinant of delayed gastric emptying observed in rats after its administration. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 1375-1382.
2. Collares EF, Vinagre AM. Effect of the GABA<sub>B</sub> agonist baclofen on dipyrone-induced delayed gastric emptying in rats. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 99-104.
3. Soares AC, Vinagre AM, Collares EF. Effect of antipyrine on the gastric emptying of liquid in rats. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 1507-1512.
4. Vinagre AM, Collares EF. Effect of 4-aminoantipyrine on gastric compliance and liquid emptying in rats. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 903-909.
5. Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 143-201.
6. Collares EF, Vinagre AM. Derivados fenilpirazolônicos inibem o esvaziamento gástrico em ratos, através de uma via aferente sensível a capsaicina. *XXI Annual Meeting of the Federação de Sociedades de Biologia Experimental*. Águas de Lindóia, SP, Brazil, August 23-26, 2006. p 40.009 (Abstract).
7. Gamse R, Leeman SE, Holzer P, Lembeck F. Differential effects of capsaicin on the content of somatostatin, substance P, and neurotensin in the nervous system of the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1981; 317: 140-148.
8. Lutz TA, Althaus J, Rossi R, Scharrer E. Anorectic effect of amylin is not transmitted by capsaicin-sensitive nerve fibers. *Am J Physiol* 1998; 274: R1777-R1782.
9. Bucaretychi F, Collares EF. Effect of *Phoneutria nigriventer* spider venom on gastric emptying in rats. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 205-211.
10. Holzer P, Bucsecs A, Lembeck F. Distribution of capsaicin-sensitive nerve fibres containing immunoreactive substance P in cutaneous and visceral tissues of the rat. *Neurosci Lett* 1982; 31: 253-257.
11. Raybould HE, Tache Y. Cholecystokinin inhibits gastric motility and emptying via a capsaicin-sensitive vagal pathway in rats. *Am J Physiol* 1988; 255: G242-G246.
12. Raybould HE, Lloyd KC. Integration of postprandial function in the proximal gastrointestinal tract. Role of CCK and sensory pathways. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 713: 143-156.
13. Raybould HE, Glatzle J, Robin C, Meyer JH, Phan T, Wong H, et al. Expression of 5-HT<sub>3</sub> receptors by extrinsic duodenal afferents contribute to intestinal inhibition of gastric emptying. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G367-G372.
14. Reidelberger RD, Kelsey L, Heimann D, Hulce M. Effects of peripheral CCK receptor blockade on gastric emptying in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R66-R75.
15. Hayes MR, Moore RL, Shah SM, Covasa M. 5-HT<sub>3</sub> receptors participate in CCK-induced suppression of food intake by delaying gastric emptying. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: R817-R823.
16. Vinagre AM, Collares E. Efeito do pré-tratamento com dezapride, um antagonista para receptores CCK-1, sobre o retardo do esvaziamento gástrico induzido pela dipirona, 4-aminoantipirina e antipirina em ratos. *XXII Annual Meeting of the Federação de Sociedades de Biologia Experimental*. Águas de Lindóia, SP, Brazil, August 22-25, 2007. p 40.003 (Abstract).
17. Collares E, Vinagre AM. Efeito do pré-tratamento com ondansetrona, um antagonista para receptores 5-HT<sub>3</sub>, sobre o retardo do esvaziamento gástrico induzido pela dipirona, 4-aminoantipirina e antipirina em ratos. *XXIII Annual Meeting of the Federação de Sociedades de Biologia Experimental*. Águas de Lindóia, SP, Brazil, August 20-23, 2008. p 32.006 (Abstract).

## **CAPITULO 3**

AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS NO  
RETARDO DO ESVAZIAMENTO GÁSTRICO DE LÍQUIDO INDUZIDO PELOS  
DERIVADOS FENILPIRAZOLÔNICOS (DIPIRONA, 4-AMINOANTIPIRINA E  
ANTIPIRINA) EM RATOS.

Adriana Mendes Vinagre  
Edgard Ferro Collares

Departamento de Pediatria, Departamento de Farmacologia e Núcleo de Medicina  
e Cirurgia Experimental, Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Universidade  
Estadual de Campinas (UNICAMP).

Apoio financeiro: FAEPEX-UNICAMP

## RESUMO

A dipirona (Dp), 4-aminoantipirina (AA) e antipirina (At) retardam o esvaziamento gástrico (EG) de líquido em ratos. Neste estudo, foi avaliada a participação adrenérgica no fenômeno. Foram utilizados ratos Wistar, machos, 6-8 animais/grupo. A simpatectomia química foi feita com sulfato de guanetidina (100mg/kg/dia,sc) (GUA) administrada durante dois dias e a cirúrgica com ressecção do gânglio celíaco (CGX) antes dos tratamentos (trat). Os pré-tratamentos (pré-trat) com antagonistas adrenérgicos *iv*, 15 min antes do trat, foram realizados nos grupos: PRA (prazosin, 1 mg/kg); YOH (yohimbine, 3 mg/kg); PRO (propranolol, 4 mg/kg); ATE (atenolol, 10 mg/kg); BUT (butoxamina, 8 mg/kg); SRA (SR59230A, 2 mg/kg); V (veículo, 1mL/kg). Os grupos foram trat *iv* com Dp, AA ou At (240 µmol/kg) ou salina (S). EG foi avaliado dez min após trat pela medida da % de retenção gástrica (%RG) de salina marcada com fenol vermelho, 10 min após administração por gavagem. Os valores da %RG (média±SEM) indicaram que o pré-trat com GUA aboliu o efeito no EG da Dp (31.7 ± 1.6%) e At (33.2 ± 2.3%) em relação aos pré-trat V (47.1 ± 2.3% e 54.7 ± 3.6%, respectivamente) e reduziu significativamente o efeito da AA (48.1 ± 3.2%), em relação ao controle (67.2 ± 3.1%). PRO aboliu o efeito da Dp (29.1 ± 1.7%) e At (30.5 ± 1.7%) em relação aos pré-trat V (46.9 ± 2.7% e 49 ± 3.2%, respectivamente) e reduziu significativamente o efeito da AA (48.4 ± 2.6%), em relação a V+AA (59.5 ± 3.1%). O pré-trat com antagonistas PRA ( $\alpha_1$ - e  $\alpha_{2B}$ -adrenérgico), YOH (não seletivo  $\alpha_2$ -adrenérgico), ATE ( $\beta_1$ -adrenérgico), BUT ( $\beta_2$ -adrenérgico), SRA ( $\beta_3$ -adrenérgico) e a simpatectomia cirúrgica não alteraram o efeito dos derivados sobre o EG. Os resultados sugerem: 1) que a simpatectomia química ou pré-trat com propranolol (antagonista não seletivo  $\beta$ -adrenérgico) aboliram o efeito da Dp e At e reduziram o da AA sobre o EG; 2) como pouco provável que retardo do EG induzido por estas drogas ocorra por ativação de  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - e  $\beta_3$ -adrenoceptores periféricos.

Key words: Esvaziamento gástrico; Dipirona; 4-Aminoantipirina; Antipirina; Simpatectomia; Receptores adrenérgicos;  $\beta$ -Adrenoceptores.

## INTRODUÇÃO

Os derivados fenilpirazolônicos dipirona, 4-aminoantipirina e antipirina retardam o esvaziamento gástrico (EG) de líquido em ratos (1-3). Os mecanismos envolvidos são desconhecidos, embora haja evidências: 1) que estas drogas aumentem a complacência gástrica; 2) da participação do nervo vago, do sistema nervoso central (SNC) e de vias aferentes sensíveis à capsaicina, no fenômeno (1-6).

O complexo dorsal do vago (CDV) é formado pelo núcleo do trato solitário (NTS) com neurônios que recebem informações de vias aferentes, área postrema, núcleo ambiguus e núcleo dorsal do vago (NDV) onde estão localizados os motoneurônios estimuladores e inibitórios, cujos axônios constituem as vias eferentes do nervo vago, conectando-se com os neurônios motores e interneurônios do plexo mientérico (7).

O sistema nervoso simpático, que tem efeito inibitório sobre o EG, libera norepinefrina nas terminações pós-ganglionares (8-10). As fibras adrenérgicas do trato gastrointestinal são todas extrínscas e a maioria dos corpos celulares destas terminações está na cadeia ganglionar simpática pré-vertebral, sendo que o gânglio celíaco é que provê fibras para o estômago (9). Contudo, algumas fibras adrenérgicas originam-se no gânglio cervical e chegam ao estômago através do nervo vago (10). Em adição, neurônios catecolaminérgicos na região caudal do NDV em ratos projetam seletivamente para o corpo gástrico (11). Foram identificados subtipos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenoceptores em diferentes níveis do trato gastrointestinal que podem ter participação importante no controle da motricidade gástrica (10). A ativação de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos pré-sinápticos induz várias respostas no trato gastrointestinal. Admite-se que a ativação dos  $\alpha_2$ -adrenoceptores pré-sinápticos localizados no nervo vago, resulta na redução de liberação de acetilcolina do nervo colinérgico terminal. A ativação do subtipo  $\alpha_{2B}$ -adrenoceptor determina proteção da mucosa gástrica e a ativação do subtipo  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor pode ser responsável pela inibição do EG (12). Entretanto, há possibilidade de que em adição a ativação de  $\alpha_2$ -adrenoceptores pré-sinápticos

também os pós-sinápticos estejam envolvidos na redução da motricidade gástrica (13).

Por outro lado, em ratos, há evidências que neurônios aferentes e eferentes do nervo vago possuam beta-adrenoceptores, sendo que o subtipo  $\beta_2$ -adrenoceptor parece ser o predominante. Estes receptores adrenérgicos têm transporte bidirecional através dos axônios do nervo. A presença destes receptores no gânglio vagal inferior, potencialmente, explicam o mecanismo de ação de antagonistas  $\beta$ -adrenoceptores na terapêutica da hipertensão (14). Contudo, não há informações da presença destes receptores em fibras vagais conectadas com o estômago. Adicionalmente, tem sido observado que  $\beta_1$ -  $\beta_2$ -  $\beta_3$ -adrenoceptores localizam-se principalmente nas células musculares lisas no trato digestivo (10). Recentemente, surgiram indicações de altos níveis de expressão de mRNA  $\beta_3$ -adrenoceptores nas fibras musculares do fundo gástrico e níveis moderados no piloro (15). Os  $\beta_3$ -adrenoceptores, entre os subtipos beta-adrenérgicos, são os que predominantemente participam do relaxamento induzido por catecolaminas no fundo gástrico de ratos (16). O fundo gástrico constitui a maior porção do estômago proximal que é responsável pela acomodação do bolo alimentar e, em parte, pelo EG de líquido (17-18).

Sendo assim, especulativamente é possível que o sistema nervoso simpático (SNS), através da ativação de um destes receptores adrenérgicos, possa estar envolvido no efeito sobre o EG de salina, induzido pelos derivados fenilpirazolônicos.

Para definir a participação do sistema nervoso simpático no fenômeno induzido pela dipirona, 4-aminoantipirina e antipirina em ratos, os objetivos do presente estudo foram avaliar neste fenômeno: 1) a simpatectomia química com guanetidina, que bloqueia a liberação de norepinefrina nas fibras adrenérgicas; 2); os pré-tratamentos com os antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, prazosin (antagonista  $\alpha_1$ - e  $\alpha_{2B}$ -adrenérgico), e yohimbine (antagonista não seletivo  $\alpha_2$ -adrenérgico); 3) os pré-tratamentos com os antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos, propranolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico não seletivo), atenolol (antagonista seletivo  $\beta_1$ -adrenérgico), butoxamina (antagonista seletivo  $\beta_2$ -adrenérgico) e SR59230A (antagonista

seletivo  $\beta_3$ -adrenérgico); 4) a simpatectomia cirúrgica, com ressecção do gânglio celíaco.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos Wistar, machos, de 250-300g, adaptados por pelo menos duas semanas às condições do laboratório. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA/Unicamp, Protocolo nº 1372-1.

Os animais submetidos a procedimento cirúrgico foram previamente sedados com injeção intra-peritoneal (*ip*) de thiopental 75mg/kg. Após o procedimento cirúrgico ou entrada no estudo, todos animais foram mantidos em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum* (*ad lib*) retiradas 24 horas e 30 min, respectivamente, antes da avaliação do EG .

As drogas dipirona, 4-aminoantipirina, antipirina, guanetidina, prazosin, yohimbina, propranolol, atenolol, butoxamina e SR59230A (todas fornecidas por Sigma, USA) foram diluídas em veículo no dia em que foram empregadas e protegidas da luz, quando indicado. As doses empregadas para cada droga foram baseadas na literatura ou testadas no laboratório.

No estudo com simpatectomia química, o pré-tratamento (pré-trat) com sulfato de guanetidina (grupo GUA), 100 mg/kg (diluído em salina com o pH ajustado em 7.4) foi realizado durante dois dias consecutivos na dose diária de 100 mg/kg administrado, por via subcutânea (*sc*) (19) às 4:00 horas PM. Os animais controles (C) receberam veículo (grupo V) pela mesma via. No último dia, a partir da 1:00 hora PM, os animais foram colocados em jejum alimentar recebendo água *ad lib* até 30 min antes da determinação do EG.

No estudo com simpatectomia cirúrgica prévia, os animais foram divididos em dois grupos: Grupo CGX submetido duas semanas antes do tratamento (*trat*) a ressecção por laparotomia do gânglio celíaco sob visão com lupa, e grupo sham (SH) com cirurgia simulada.

Os pré-tratamentos (pré-trat) com os antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos foram realizados com os animais em jejum alimentar de 24 horas, recebendo água *ad lib* até 30 min antes, divididos em três grupos: grupo PRA, pré-trat com prazosin

(antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico), 1mg/kg, dose recomendada na literatura (20); grupo YOH, pré-trat com yohimbina (antagonista não seletivo  $\alpha_2$ -adrenérgico), 3 mg/kg, dose recomendada na literatura (20); grupo controle, pré-trat com salina como veículo (V). Os pré-trat foram feitos *iv* 15 min antes dos tratamentos.

Os pré-trat com antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos foram realizados também com os animais em jejum alimentar de 24 horas, recebendo água *ad lib* até 30 min antes. Nesta avaliação, foram feitos três estudos: no primeiro estudo para o pré-trat com um antagonista não seletivo  $\beta$ -adrenérgico, os animais foram divididos em dois grupos: grupo PRO, pré-trat com propranolol, 4 mg/kg (dose ajustada em estudo prévio) e grupo controle, pré-trat com salina como veículo (V). No segundo estudo para os pré-trat com antagonistas seletivo  $\beta_1$ - e  $\beta_2$ -adrenérgicos, os animais foram divididos em três grupos: grupo ATE, pré-trat com atenolol (antagonista seletivo  $\beta_1$ -adrenérgico), 10 mg/kg, dose correspondente ao dobro da recomendada na literatura (21) ; grupo BUT, pré-trat com butoxamina (antagonista seletivo  $\beta_2$ -adrenérgico) , 8 mg/kg como indicado pela literatura (22); grupo controle, pré-trat com salina como veículo (V). No terceiro estudo para o pré-trat com antagonista seletivo  $\beta_3$ -adrenérgico, os animais foram divididos em dois grupos: grupo SRA, pré-tratado com SR59230A, 2mg/kg, dissolvido em DMSO e diluído em salina 0,9% (1:4), dose ajustada a partir da literatura (23) e grupo V: pré-tratado com veículo (1 parte de DMSO + 4 partes de salina). Nestes estudos, os pré-trat também foram feitos *iv* 15 min antes dos tratamentos.

Todos os grupos foram tratados (trat) *iv* com 240  $\mu$ mol/kg de dipirona (Dp) ou 4-aminoantipirina (AA) ou antipirina (At) ou solução salina estéril (S) utilizada como veículo. A dose das drogas utilizadas no trat foi baseada em estudos anteriores (1-3). Dez min após a última injeção *iv*, foi determinado o EG.

O EG foi avaliado indiretamente, no animal acordado, através da determinação da % de retenção gástrica (RG) de uma refeição de prova (RP) salina marcada com fenol vermelho (60  $\mu$ g/ml), volume de 2ml/100g de peso de rato, administrada por gavagem, utilizando técnica padronizada (24) com modificações (6).

Na avaliação estatística foi empregado ANOVA e para comparação entre os pares, o teste de Tukey ( $\alpha= 0,05$ , para os dois testes).

## RESULTADOS

Na figura 1, são apresentados os resultados do pré-tratamento *sc* com sulfato de guanetidina. Os valores da RG (média±SEM, N=8) mostraram que o pré-trat com guanetidina não modificou o EG nos animais tratados com veículo ( $29.5 \pm 1.3\%$ ) em relação aos seus controles ( $24.9 \pm 1.8\%$ ). Por outro lado, aboliu o efeito da Dp ( $31.7 \pm 1.6\%$ ) e At ( $33.2 \pm 2.3\%$ ) em relação aos seus controles pré-trat com veículo ( $47.1 \pm 2.3\%$  e  $54.7 \pm 3.6\%$ , respectivamente) e reduziu significativamente o efeito da AA ( $48.1 \pm 3.2\%$ ), em relação ao seu controle ( $67.3 \pm 3.1\%$ ).

Os resultados da % de RG, apresentados em média ± SEM (N=8), nos ratos pré-trat PRA ou YOH e trat com Dp ( $49 \pm 3.8$  e  $49.6 \pm 3.6$  %, respectivamente), AA ( $64.1 \pm 2.8$  e  $52.1 \pm 4.6\%$ , respectivamente) e At ( $50 \pm 5.1$  e  $51.2 \pm 3.8\%$ , respectivamente), não diferiram daqueles que receberam veículo como pré-trat e trat com as mesmas drogas ( $51 \pm 2.2\%$ ,  $62.5 \pm 3.1\%$ , e  $49.7 \pm 3.4\%$ , respectivamente). Os animais pré-trat PRA ou YOH e trat com salina ( $21.9 \pm 1$  e  $34.6 \pm 1.3$  %, respectivamente) não diferiram significativamente dos pré-trat V e trat S ( $28.4 \pm 1.1$  %).

Na figura 2, são apresentados os resultados do pré-tratamento *iv* com propranolol. Os valores da RG (média±SEM, N=8) mostraram que o pré-trat o propranolol *iv* não modificou o EG nos animais tratados com veículo ( $24.6 \pm 1.2\%$ ), em relação aos seus controles ( $25.5 \pm 1.6\%$ ). Por outro lado, aboliu o efeito da Dp ( $29.1 \pm 1.7\%$ ) e At ( $30.5 \pm 1.7\%$ ) em relação aos seus controles pré-trat com veículo ( $46.9 \pm 2.7\%$  e  $49 \pm 3.2\%$ , respectivamente) e reduziu significativamente o efeito da AA ( $48.4 \pm 2.6\%$ ), em relação ao seu controle ( $59.5 \pm 3.1\%$ ).

Os resultados da % de RG, em média ± SEM (N=8), nos ratos pré-trat ATE ou BUT e trat S não apresentaram alteração significativa da RG ( $29.6 \pm 3.4\%$  e  $23.9 \pm 1.5\%$ , respectivamente) em relação aos animais pré-trat V e trat S ( $25.5 \pm 1.7\%$ ). As RG nos animais pré-trat ATE ou BUT e trat com Dp ( $44.9 \pm 3.4\%$  e  $46.4 \pm 3.8\%$ , respectivamente), AA ( $53.4 \pm 2.5\%$  e  $52.5 \pm 2.5\%$ , respectivamente) ou At

( $49.7 \pm 3.2\%$  e  $45.5 \pm 3.1\%$ , respectivamente) não diferiram significativamente dos seus controles (Dp=  $49.8 \pm 3.5\%$ ; AA= $55.3 \pm 4\%$  e At= $44.9 \pm 3.4\%$ ).

O pré-trat com SRA *iv* não modificou a RG (,média $\pm$ SEM, N=6) nos animais tratados com salina ( $34.5 \pm 3.8\%$ ) em relação aos seus controles ( $26.7 \pm 5.1\%$ ) e não modificou o efeito da Dp ( $56.5 \pm 7.8\%$ ), AA ( $66.9 \pm 3.3\%$ ) e At ( $57.2 \pm 4\%$ ), em relação aos seus controles pré-trat com veículo ( $55.2 \pm 1.9\%$ ,  $66.8 \pm 5\%$  e  $54.2 \pm 5.5\%$ , respectivamente).

Na simpatectomia cirúrgica, os resultados da % de RG apresentados em média  $\pm$  SEM (N=8), nos ratos do grupo CGX trat com Dp ( $42,9 \pm 3\%$ ), AA ( $45,1 \pm 3\%$ ) e At ( $47.3 \pm 3.3\%$ ) não diferiram significativamente daqueles do grupo SH tratados com as mesmas drogas ( $51 \pm 3.9\%$ ,  $55.3 \pm 4\%$ , e  $44.7 \pm 4\%$ , respectivamente). Da mesma forma, os animais CGX trat com salina ( $21.9 \pm 1.7\%$ ) não diferiram significativamente dos do grupo SH trat com o veículo ( $26.2 \pm 2.2\%$ ).

## DISCUSSÃO

O tratamento por poucos dias com guanetidina produz bloqueio da liberação de norepinefrina de nervos simpáticos periféricos (19). No presente estudo, a simpatectomia química com o pré-tratamento *sc* com esta droga (100 mg/kg) por dois dias (19) aboliu o retardo do EG da refeição salina induzido pela Dp e At e reduziu significativamente o efeito da AA (figura 1), sugerindo a possibilidade do envolvimento do sistema nervoso simpático no fenômeno.

O pré-tratamento com prazosin, um antagonista  $\alpha_1$ - e  $\alpha_{2B}$ -adrenérgico ou yohimbina, um antagonista não seletivo  $\alpha_2$ -adrenérgico (12-13) não interferiu no efeito da Dp, AA e At no EG, indicando como pouco provável o envolvimento destes receptores no retardo do esvaziamento induzido por estas drogas.

Por outro lado, com resultado semelhante ao observado no pré-tratamento com guanetidina, o com propranolol aboliu o efeito da Dp e At sobre o EG e reduziu significativamente o da AA (figura 2). O propranolol é um antagonista clássico  $\beta$ -adrenérgico não seletivo, com boa afinidade para os subtipos  $\beta_1$ - e  $\beta_2$ -adrenoceptores e baixa para o subtipo  $\beta_3$ -adrenérgico (25). Entretanto, o pré-

tratamento com os antagonistas seletivos atenolol e butoxamina  $\beta_1$ - e  $\beta_2$ -adrenérgicos (10,22), respectivamente, não modificaram o efeito das três drogas, indicando que estes subtipos de receptores podem não estar envolvidos no fenômeno. Da mesma forma, o pré-tratamento com SR59230A, antagonista seletivo  $\beta_3$ -adrenérgico para roedores (25), não modificou o efeito dos derivados fenilpirazolônicos sobre o EG, sugerindo também como pouco provável o envolvimento destes receptores. Contrapõe a esta conclusão, a constatação que SR59230A *in vitro* atua como um agonista  $\beta$ -adrenoceptor atípico no fundo gástrico e duodeno de cobaias (26). Contudo, se isto fosse válido em ratos *in vivo*, teríamos nos nossos resultados um aumento da RG nos animais que receberam SR59230A tratados com salina ou derivados, em relação aos seus controles, o que não ocorreu.

Em adição, o mesmo foi constatado nos animais submetidos a simpatectomia cirúrgica, indicando a possibilidade de que o sistema nervoso simpático (gânglio celíaco), responsável pelo controle adrenérgico da parte superior do tubo digestivo, não esteja envolvido.

Até o momento, os resultados do presente estudo permitem algumas especulações.

O tratamento crônico com guanetidina produz bloqueio da liberação de norepinefrina de nervos periféricos, sem afetar os neurônios adrenérgicos no SNC e a medula adrenal em ratos adultos. Embora os níveis de noradrenalina no SNC não se alterarem após administração crônica de guanetidina a ratos adultos, lesão nos neurônios serotonérgicos e encefalinérgicos ocorre na área postrema (27-29). A área postrema é parte integrante do CDV em que as transmissões sinápticas nos micro-circuitos deste complexo envolvem mais de 30 neurotransmissores (7). Assim, especulativamente, é possível que os resultados com a simpatectomia química aguda no presente estudo sejam decorrentes do efeito tóxico da guanetidina na área postrema, interferindo, através do vago, no efeito dos derivados fenilpirazolônicos no EG. Navegantes *et al* (19) empregaram o modelo, que foi referência para nosso estudo, por uma especificidade da guanetidina para bloquear a liberação de norepinefrina dos nervos periféricos, sem afetar neurônios

adrenérgicos no SNC de ratos adultos. Contudo, isto foi uma inferência dos autores, já que utilizou como base para esta conclusão, estudos com administração crônica desta droga a ratos adultos (27-29). Assim, é possível que no modelo utilizado haja comprometimento da liberação deste mediador no SNC, explicando a discrepância de resultados que obtivemos entre os modelos de simpatectomia.

Para explicar os resultados com o pré-tratamento com propranolol, temos que admitir a possibilidade deste  $\beta$ -antagonista estar agindo no SNC. Há fortes evidências que dopamina, norepinefrina e epinefrina têm participação fundamental na regulação e coordenação de diversas áreas do SNC (30). Utilizando a técnica de hibridização *in situ*, foram identificados  $\alpha_{1B}$ -,  $\alpha_{1D}$ -,  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ -,  $\alpha_{2C}$ -,  $\beta_1$ - e  $\beta_2$ -adrenoceptores em várias áreas do SNC de ratos (31). A participação destes receptores em alguma função do estômago é desconhecida, com exceção da evidência funcional de que  $\alpha_{2B}$ -adrenoceptor, identificado no NTS (31), pode estar envolvido no efeito protetor da mucosa gástrica, induzido pela clonidina (32). Entre os bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, o propranolol é altamente lipofílico, propriedade que permite atravessar rapidamente a barreira hemo-encefálica em contraste com atenolol, um antagonista  $\beta_1$ -adrenoceptor seletivo, hidrofílico (33). Atribui-se a este fato a ocorrência, no uso terapêutico do propranolol em humanos, de alguns efeitos colaterais (33-34). Diante disto, em termos especulativos, é possível que os resultados obtidos no pré-tratamento com o propranolol sejam consequentes do bloqueio no SNC de  $\beta_1$ - e/ou  $\beta_2$ -adrenoceptores.

Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem: 1) que a simpatectomia química e o pré-tratamento com propranolol aboliram o efeito da dipirona e antipirina e reduziram o da 4-aminoantipirina sobre o EG; 2) como pouco provável que retardo do EG induzido por estas drogas ocorra por ativação de  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - e  $\beta_3$ -adrenoceptores periféricos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Collares EF, Vinagre AM. Evidence of the effect of dipyron on the central nervous system as a determinant of delayed gastric emptying observed in rats after its administration. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36:1375-1382.
2. Soares ACF, Vinagre AM, Collares EF. Effect of antipyrine on the gastric emptying of liquid in rats. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39:1507-1512.
3. Vinagre AM, Collares EF. Effect of 4-aminoantipyrine on the gastric compliance and liquid emptying in rats. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40:903-909.
4. Collares EF, Vinagre AM. Effect of the GABA<sub>B</sub> agonist baclofen on dipyron-induced delayed gastric emptying in rats. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 99-104.
5. Vinagre AM, Collares EF. Efeito da dipirona, antipirina e 4-aminoantipirina na complacência gástrica de ratos adultos jovens. *XXI Annual Meeting of the Federação de Sociedades de Biologia Experimental*, Águas de Lindóia, SP, Brazil, August 23-26, 2006, p. 40.011 (Abstract).
6. Vinagre AM, Collares EF. Phenyipyrazolone derivatives inhibit gastric emptying in rats by a capsaicin-sensitive afferent pathway. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42:1086-1089.
7. Wood JD, Alpers DH, Andrews PLR. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 1999; 45(Suppl II):II6-II16.
8. Grundy D, Scratcherd T. The role of the vagus and sympathetic nerves in the control of gastric motility. In: Akkermans LMA, Johnson AG, Read NW, Editors. *Gastric and Gastrointestinal Motility*. *Surg Sci Series* 1984; 4:21-33.
9. Weisbrodt NW. Regulation: Nerves and smooth muscle. In: Johnson LR, Editor. *Gastrointestinal Physiology, Fifth Edition*, Mosby, St. Louis, 1997; 15-22.
10. De Ponti F, Giaroni C, Cosentino M, Lecchini S, Frigo G. Adrenergic mechanisms in the control of gastrointestinal motility: From basic science to clinical applications. *Pharmacol Ther* 1996; 69:59-78.

11. Guo JJ, Browning KN, Rogers RC, Travagli A. Catecholaminergic neurons in rat dorsal nucleus of vagus project selectively to gastric corpus. *Am J Physiol* 2001; 280:G361-G367.
12. Fülöp K, Zádori Z, Rónai AZ, Gyires K. Characterisation of  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes involved in gastric emptying, gastric motility and gastric mucosal defense. *Eur J Pharmacol* 2005; 528:150-157.
13. Zádori ZS, Shujaa N, Fülöp K, Dunkel P, Gyires K. Pre- and postsynaptic mechanisms in the clonidine- and oxymetazoline-induced inhibition of gastric motility in the rat. *Neurochem Inter* 2007; 51:297-305.
14. Lawrence AJ, Watkins D, Jarrot B. Visualization of beta-adrenoceptor binding sites on human inferior vagal ganglia and their axonal transport along the rat vagus nerve. *J Hypert* 1995;13:631-635.
15. Evans BA, Papaioannou M, Bonazzi VR, Summers RJ. Expression of  $\beta_3$ -adrenoceptor mRNA in rat tissues. *Brit J Pharmacol* 1996; 117:210-216.
16. Ozakca I, Arioglu E, Guner S, Altan VM, Ozcelikay AT. Role of beta-3-adrenoceptor in catecholamine-induced relaxations in gastric fundus from control and diabetic rats. *Pharmacology* 2007; 80:227-238.
17. Ehrlein HJ, Akkermans LMA. Gastric emptying. In: Akkermans LMA, Johnson AG, Read NW, Editors. Gastric and Gastrointestinal Motility. *Surg Sci Series* 1984; 4:74-84.
18. Weisbrodt NW. Gastric emptying. In: Johnson LR, Editor. *Gastrointestinal Physiology, Fifth Edition*, Mosby, St Louis, 1997: 33-42.
19. Navegantes LCC, Resano NMZ, Migliorini RH, Kettelhut IC. Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on different proteolytic systems in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1999; 277:E883-E889.
20. Gondim FAA, Rodrigues CL, da Graça JRV, Camurça FD, de Alencar HMP, dos Santos AA, Rola FH. Neuronal mechanisms involved in the delay gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid after thoracic spinal cord transaction in awake rats. *Auton Neurosci Bas Clin* 2001; 87: 52-58.
21. van Steeg TJ, Freijer J, Danhof M, de Lange ECM. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of S(-)-atenolol in rats: reduction of

- isoprenaline-induced tachycardia as a continuous pharmacodynamic endpoint. *Brit J Pharmacol* 2007; 151:356-366.
22. Canfield P, Price C. The effect of sympathomimetic agents on gastric acid secretion in rats. *Scand J Gastroenterol* 1984;18 (Suppl 89):23-26.
  23. Nackley-Neely AG, Tan KS, Fecho K, Flood P, Diatchenko L, Maixner W. Catechol-O-methyltransferase inhibition increases pain sensitivity through activation of both  $\beta_2$  and  $\beta_3$  adrenergic receptors. *Pain* 2007; 128:199-208.
  24. Bucarechi F, Collares EF. Effect of *Phoneutria nigriventer* spider venom on gastric emptying in rats. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 205-211.
  25. Ursino MG, Vasina V, Raschi E, Crema F, De Ponti F. The  $\beta_3$ -adrenoceptor as a therapeutic target: Current perspectives. *Pharmacol Res* 2009; 59:221-234.
  26. Horinouchi T, Koike K. Agonistic activity of SR59230A at atypical  $\beta$ -adrenoceptors in guinea pig gastric fundus and duodenum. *Eur J Pharmacol* 2001; 416: 165-168.
  27. Johnson EM, O'Brien F. Evaluation of the permanent sympathectomy produced by the administration of guanethidine to adult rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; 196:53-61.
  28. Newton BW, Melvin JE, Hamill RW. Central neurotoxic effects of guanethidine: altered serotonin and enkephalin neurons within the area postrema. *Brain Res* 1987; 404:151- 161.
  29. Picklo MJ. Methods of sympathetic degeneration and alteration. *J Auton Nerv Syst* 1997; 62:111-125.
  30. Grace AA, Gerfen CR, Aston-Jones G. Catecholamines in central nervous system. *Adv Pharmacol* 1998; 42:655-670.
  31. Nicholas AP, Hökfelt T, Pieribone VA. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with *in situ* hybridization. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17:245-255.

32. Gyires K, Müllner K, Rónai AZ. Functional evidence that gastroprotection can be induced by activation of  $\alpha_{2B}$ -adrenoceptor subtypes in the rat. *Eur J Pharmacol* 2000; 396:131-135
33. McAinsh J, Cruickshank JM. Beta-blockers and central nervous system side effects. *Pharmacol Ther* 1990; 46:163-197.
34. Ko DT, Hebert PR, Coffey CS, Sedrakyan A, Curtis JP, Krumholz HM.  $\beta$ -blocker therapy and symptoms of depression, fatigue, and sexual dysfunction. *JAMA* 2002; 288:351-357.

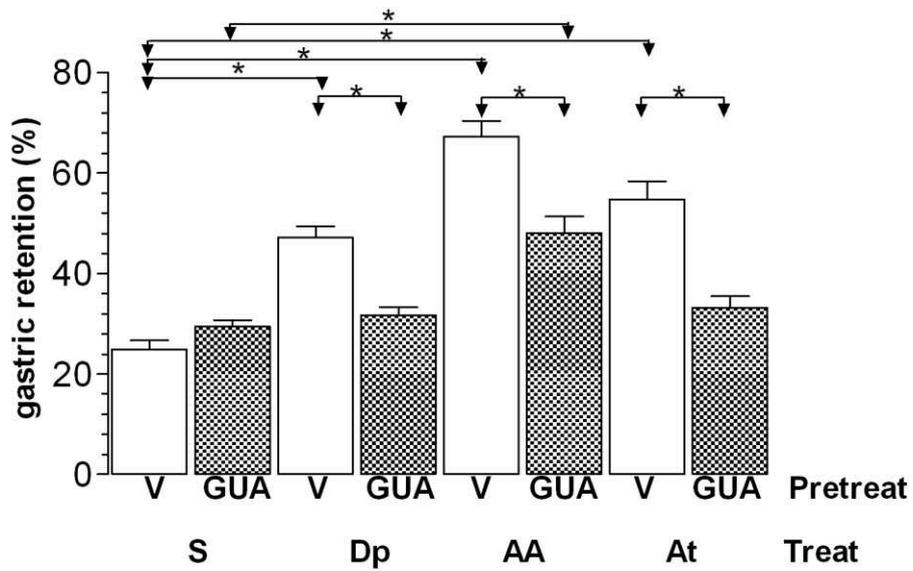


Figura 1. Retenção gástrica (%), em média±SEM, de uma refeição de prova salina, após 10 min da administração a ratos por gavage. Os animais foram pré-tratados (pretreat) sc com salina como veículo (V) ou sulfato de guanetidina 100 mg/kg (GUA) por dia, durante dois dias, antes dos tratamentos (treat), por via *iv*, com salina (S) ou 240micromol/kg de dipirona (Dp), 4-aminoantipirina (AA) ou antipirina (At). A administração da refeição de prova foi feita 10 min após o tratamento. Dados são apresentados em média±SEM para 8 animais em cada grupo. \* =  $p < 0.05$  (teste de Tukey).

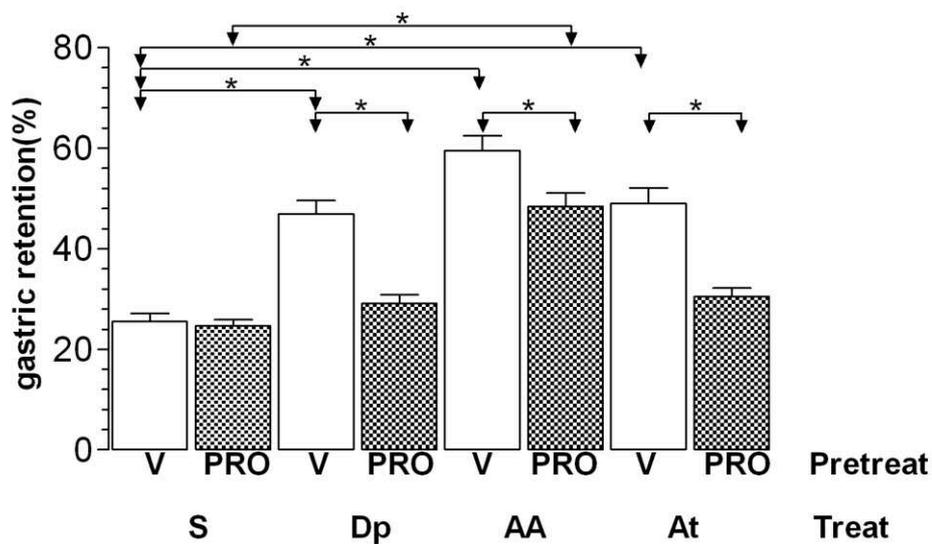


Figura 2. Retenção gástrica (%), em média $\pm$ SEM, de uma refeição de prova salina, após 10 min da administração a ratos por gavagem. Os animais foram pré-tratados (pretreat) *iv* com salina como veículo (V) ou propranolol 4 mg/kg (PRO), 15 min antes dos tratamentos (treat), por via *iv*, com salina (S) ou 240micromol/kg de dipirona (Dp), 4-aminoantipirina (AA) ou antipirina (At). A administração da refeição de prova foi feita 10 min após o tratamento. Dados são apresentados em média $\pm$ SEM para 8 animais em cada grupo. \*= $p < 0.05$  (teste de Tukey).

## **DISCUSSÃO GERAL**

A dor, definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), é uma experiência sensitiva e emocional desagradável, onde há percepção de um estímulo nocivo associado a uma lesão, podendo causar distúrbios orgânicos ou psicológicos (58).

Motivados a encontrar drogas que pudessem reduzir ou eliminar essa sensação dolorosa, pesquisadores, durante o século XIX, aumentaram seus esforços para extração e identificação de medicamentos a partir de plantas com esta finalidade (59).

Seguindo esse caminho, com a síntese química, surgiu a família dos derivados fenilpirazolônicos. A primeira droga da família foi sintetizada em 1883, na Alemanha, denominada antipirina. Em 1897, foi desenvolvido outro derivado - a aminopirina - mas com a desvantagem de ser pouco solúvel em água (45).

A procura de um composto mais solúvel em água levou à produção da dipirona, um fármaco com ação analgésica, antipirética, antiinflamatória e anti-espasmódica, que foi introduzido na Alemanha em 1920 (59). Por estas propriedades, tem sido utilizada em vários países da Europa e da América Latina. Esse fármaco, apesar de muito utilizado, curiosamente, apresenta poucas publicações no PubMed, em relação a outras drogas com a mesma indicação. Infelizmente, as publicações em que são investigados os possíveis mecanismos envolvidos são escassas e, no conjunto, indicam que são praticamente desconhecidos.

Um fenômeno observado há mais de 20 anos foi de que os derivados fenilpirazolônicos antipirina e dipirona determinam retardo no EG em ratos (43,51). No nosso laboratório, confirmamos estas observações iniciais, constatamos que o mesmo fenômeno ocorre com a 4-aminoantipirina (um metabólito da dipirona) e ampliamos os estudos na procura dos possíveis mecanismos envolvidos (49-50,52, 60-61).

Quanto a este efeito, observamos que as três drogas apresentam algumas características comuns, com pequenas diferenças, ou seja:

- 1- O retardo do EG guarda relação com a dose administrada *iv* ( $r > 0.8$ );
- 2- Na dose *iv* de 240  $\mu\text{mol/kg}$ , não houve diferença significativa no efeito das três drogas;
- 3- Em relação ao tempo, após administração *iv* de 240  $\mu\text{mol/kg}$ , a dipirona apresentou o efeito mais intenso e constante na primeira hora, o mesmo ocorrendo com a 4-aminoantipirina que, contudo, foi ainda significativo até duas horas. Com a antipirina este efeito foi observado mais intensamente aos 10 min;
- 4- A vagotomia sub-diafragmática aboliu (dipirona) ou reduziu (4-aminoantipirina e antipirina) o efeito das três drogas;
- 5- A dipirona foi a única a ter o mesmo efeito quando administrada *icv*;
- 6- O pré-tratamento *icv* com baclofen, agonista GABA<sub>B</sub>, aboliu o efeito *iv* das três drogas e o efeito *icv* da dipirona;
- 7- As três drogas, administradas *iv*, induzem aumento da complacência gástrica em ratos anestesiados.

Dando continuidade à investigação, observamos que a destruição de fibras aferentes sensíveis à capsaicina, no período neonatal, aboliu o efeito *iv* das drogas e não interferiu no efeito da dipirona administrada *icv* (62). Esta constatação sugere a participação de fibras aferentes no fenômeno e que o mecanismo do efeito da dipirona, administrada no SNC, é distinto daquele quando a via de administração da droga foi *iv*. Neste modelo, a lesão ocorre indistintamente em fibras aferentes do nervo vago e naquelas com projeção para a medula espinal (63-64).

Como observamos, a vagotomia aboliu ou reduziu o efeito das três drogas sobre o EG, e assumindo que os estímulos aferentes originam-se no trato digestório, especulamos se o fenômeno não seria decorrente da liberação anormal de CCK e 5-HT no intestino delgado. Em condições fisiológicas, a

liberação destes é induzida por componentes do bolo alimentar. A CCK ativa receptores  $CCK_1$  nas terminações nervosas aferentes do vago no intestino, sensíveis à capsaicina, e a 5-HT, ativa receptores  $5-HT_3$  nas terminações aferentes espinais e do nervo vago, sensíveis a esta neurotoxina (32-33). Contudo, em estudos preliminares, demonstramos que os pré-tratamentos com devazepida (antagonista seletivo  $CCK_1$ ) ou ondansetrona (antagonista seletivo  $5-HT_3$ ) não aboliram ou atenuaram o efeito de retardo do EG induzido pela dipirona, 4-aminoantipirina e antipirina (65-66). Esta constatação sugere que estes receptores podem não estar envolvidos no fenômeno.

O baclofen, no SNC e periféricamente, não interfere na resposta à ativação no intestino delgado de receptores químico-sensíveis, como aqueles ativados pela CCK e 5-HT, que participam da regulação do esvaziamento (67-69). Este fato, em conjunto com a constatação acima, e da anterior de que o baclofen aboliu o efeito *iv* das três drogas sobre o EG, leva-nos a especular que este efeito pode estar sendo veiculado por fibras aferentes mecano-sensíveis.

O sexto estudo (70) (incompleto) da série sugere: 1) que a simpatectomia química ou o pré-tratamento com propranolol (antagonista não seletivo  $\beta$ -adrenérgico) aboliram o efeito da dipirona e antipirina e reduziram o da 4-aminoantipirina sobre o EG; 2) como pouco provável que retardo do EG induzido por estas drogas ocorra por ativação de  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - e  $\beta_3$ -adrenoceptores periféricos.

Com estes resultados, é possível que no efeito da dipirona e da antipirina sobre o EG haja envolvimento da ativação de receptores  $\beta_1$ - e/ou  $\beta_2$ -adrenérgicos no SNC e que isto possa não estar ocorrendo em grande parte do efeito da 4-aminoantipirina.

Para finalizar, com os resultados que tivemos até o momento, as propostas futuras de investigação seriam:

1- Continuar a abordagem da participação do sistema adrenérgico, avaliando a administração de antagonistas  $\beta_1$ - e  $\beta_2$ -adrenérgicos *icv*, sobre o efeito das drogas *iv*;

2- Avaliar a participação das fibras aferentes mecano-sensíveis, no fenômeno de retardo do EG induzido por estas drogas.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

1. A dipirona, 4-aminoantipirina e antipirina retardam o EG de uma refeição líquida inerte em doses equimolares *iv* e aumentam a complacência gástrica;
2. A dipirona foi a única, entre as três drogas estudadas, que retardou o EG por ação direta do SNC;
3. O fenômeno de retardo do EG induzido por estas drogas administradas *iv* é total ou parcialmente mediado pelo nervo vago, por uma via que não envolve a ação direta dessas drogas no SNC;
4. A ativação de receptores GABA<sub>B</sub> no SNC bloqueou o efeito das três drogas;
5. Há participação de fibras aferentes sensíveis à capsaicina, no retardo do EG induzido pela administração *iv* das três drogas;
6. Essas fibras aferentes não estão envolvidas no efeito sobre o esvaziamento, quando a dipirona é administrada no SNC;
7. A simpatectomia química e o pré-tratamento com propranolol aboliram o efeito *iv* da dipirona e antipirina, e reduziram o da 4-aminoantipirina sobre o EG;
8. É pouco provável que retardo do EG induzido por estas drogas *iv* ocorra por ativação de  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ 1- ,  $\beta$ 2- e  $\beta$ 3-adrenoceptores periféricos.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Schneeman BO. Gastrointestinal physiology and functions. *Bri J Nutr* 2002; 88(Suppl 2):S159-S163.
2. Smout AJPM, Akkermans LMA. *Fisiologia y patologia de la motilidad gastrointestinal*. Petersfield, UK: Wrightson Biomedical Publishing Ltda 1992.
3. Soybel DI. Anatomy and physiology of the stomach. *Surg Clin North Am* 2005; 85: 875-894.
4. Rosenfeld L. The last alchemist-the first biochemist: J.B. van Helmond (1577-1644). *Clin Chem* 1985; 31:1755-1760.
5. Modlin IM. From Prout to the proton pump: a history of the science of gastric acid secretion and the surgery peptic ulcer. *Surg Ginecol Obstet* 1990; 170: 81-96.
6. Rosenfeld L. William Prout: early 19<sup>th</sup> century physician chemist. *Clin Chem* 2003; 49: 699-705.
7. Code CF, Higgins JA, Moll JC, Orvis AL, Scholer JF. The influence of acid on the gastric absorption of water, sodium and potassium. *J Physiol* 1963; 166: 110-119.
8. Davenport HW, Warner HA, Code CF. Functional significance of gastric mucosal barrier to sodium. *Gastroenterology* 1964; 47: 142-152.
9. Ribeiro AF. Esvaziamento gástrico de líquidos em ratos submetidos à ligadura do ducto biliar (Tese-Doutorado). Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 1999.
10. Weisbrodt NW. Gastric Emptying. In: Johnson LR. *Gastrointestinal Physiology*. Fifth Edition. Mosby: St Louis 1997, 33-42.
11. Wood JD, Alpers DH, Andrews PL. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 1999; 45 (Suppl II): II6-II16.
12. Grundy D, Al-Chaer ED, Aziz Q, Collins SM, Ke M, Taché Y, Wood JD. Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology* 2006; 130: 1391-411.
13. Koch KL. Illusory self-motion and motion sickness: a model for brain-gut interactions and nausea. *Dig Dis Sci* 1999; 44 (8 Suppl):53S-57S.
14. Currò D, Ipavec V, Preziosi P. Neurotransmitters of non-adrenergic non-cholinergic relaxation of proximal stomach. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2008; 12 (Suppl 1): 53-62.
15. Grundy D, Seratcherd T. The role of the vagus and sympathetic nerves in the control of gastric motility. In: Akkermans LMA, Johnson AG, Read

- NW, Editors. Gastric and Gastroduodenal Motility. Surg Sci Series 1984; 4:201-232.
16. Weisbrodt NW. Regulation: Nerves and smooth muscle. In: Johnson LR, Editor. Gastrointestinal Physiology, Fifth Edition, Mosby, St. Louis, 1997;15-22.
  17. De Ponti F, Giaroni C, Cosentino M, Lecchini S, Frigo G. Adrenergic mechanisms in the gastrointestinal motility: From basic science to clinical applications. Pharmacol Ther 1996; 69:59-78.
  18. Guo JJ, Browning KN, Rogers RC, Travagli A. Catecholaminergic neurons in rat dorsal nucleus of vagus project selectively to gastric corpus. Am J Physiol 2001; 280:G361-G367.
  19. Fülöp K, Zádori Z, Rónai AZ, Gyires K. Characterisation of  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes involved in gastric emptying, gastric motility and gastric mucosal defense. Eur J Pharmacol 2005; 528:150-157.
  20. Zádori ZS, Shujaa N, Fülöp K, Dunkel P, Gyires K. Pre- and postsynaptic mechanisms in the clonidine- and oxymetazoline-induced inhibition of gastric motility in the rat. Neurochem Inter 2007; 51:297-305.
  21. Lawrence AJ, Watkins D, Jarrot B. Visualization of beta-adrenoceptor binding sites on human inferior vagal ganglia and their axonal transport along the rat vagus nerve. J Hypert 1995; 13:631-635.
  22. Evans BA, Papaioannou M, Bonazzi VR, Summers RJ. Expression of  $\beta_3$ -adrenoceptor mRNA in rat tissues. Brit J Pharmacol 1996; 117:210-216.
  23. Osakca I, Arioglu E, Guner S, Altan VM, Ozcelikay AT. Role of beta-3-adrenoceptor in catecholamine-induced relaxations in gastric fundus from control and diabetic rats. Pharmacology 2007; 80: 227-238.
  24. Ehrlein HJ, Akkermans LMA. Gastric emptying. In: Akkermans LMA, Johnson AG, Read NW, Editors. Gastric and Gastroduodenal Motility. Surg Sci Series 1984; 4:74-84.
  25. Forster ER, Green T, Dockray GJ. Efferent pathways in the reflex control of gastric emptying in rats. Am J Physiol 1991; 260: G499-G504.
  26. Simasko SM, Ritter RC. Cholecystokinin activates both A- and C-type vagal afferents neurons. Am J Physiol 2003; 285:G1204-G1213.
  27. Hellstrom PM, Gryback P, Jacobsson H. The physiology of gastric emptying. Best Pract Res Clin Anaesthesiol 2006; 20 : 397-407.
  28. Szarka LA, Camilleri M. Methods for measurement of gastric motility. Am J Physiol 2009; 296 : G461-G475.

29. Minami H, McCallum RW. The physiology and pathophysiology of gastric emptying in humans. *Gastroenterology* 1984; 86:1592-1610.
30. Parkman HP, Jones MP. Tests of gastric neuromuscular function. *Gastroenterology* 2009; 136: 1526-1543.
31. Kelly KA. Gastric emptying of liquids and solids: roles of proximal and distal stomach. *Am J Physiol* 1980; 239: G71-G76.
32. Raybould HE, Lloyd KC. Integration of postprandial function in the proximal gastrointestinal tract. Role of CCK and sensory pathways. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 713:143-156.
33. Raybould HE, Glatzle J, Robin C, Meyer JH, Phan T, Wong H, Sternini C. Expression of 5-HT<sub>3</sub> receptors by extrinsic duodenal afferents contribute to intestinal inhibition of gastric emptying. *Am J Physiol* 2003; 284:G367-G372.
34. Stanghellini V, Tosetti C, Paternico A, Barbara G, Morselli-Labati AM, Moneti N, Morengo M, Corinaldesi R. Risk indicators of delayed gastric emptying of solids in patients with functional dyspepsia. *Gastroenterology* 1996; 110:1036-1042.
35. Kelly KA. Effect of gastric surgery on motility and emptying. In: Akkermans LMA, Johnson AG, Read NW. *Gastric and gastroduodenal motility*. New York, NY. Praeger 1984,241-262.
36. Santos CL, Medeiros BA, Palheta-Junior RC, Macedo GM, Nobre-e-Souza MA, Troncon LE, Santos AA, Souza MH. Cyclooxygenase-2 inhibition increases gastric tone and delays gastric emptying in rats. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 225-232.
37. Xu J, Chem JD. Effects of Cyclooxygenase-2 inhibitor on glucagon-induced delayed emptying and gastric dysrhythmia in dogs. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 144-151.
38. Hawkey CJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology* 2000; 119: 521-535.
39. Shea-Donohue T, Steel L, Montcalm-Mazzilli E, Dubois A. Aspirin-induced changes in gastric function: roles of endogenous prostaglandins and mucosal damages. *Gastroenterology* 1990; 98:284-292.
40. Hessel G, Collares EF. Gastric emptying in rats with acetaminophen-induced hepatitis. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 1133-1139.
41. Souza MH, Troncon LE, Cunha FQ, Oliveira RB. Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 1383-1390.

42. Vinagre AM, Collares EF. Efeito da indometacina sobre o esvaziamento gástrico de líquidos em ratos. XVIII Reunião da Federação das Sociedades de Biologia Experimental. 27-30 de agosto 2003, Curitiba.
43. Rupp VS, Schroth HJ, Hildebrandt U, Garth H, Feifel G. Einfluss von metamizol auf magenentleerung und dünndarmtransit bei der ratte. *Arzneimittel-Forschung (Drug Res)* 1987, 37: 1051-1053.
44. Collares EF, Vinagre AM. Efeito da dipirona sobre o esvaziamento gástrico de ratos. XIII Reunião Anual da FESBE 1998, Caxambú, MG, Brasil, 175.
45. Weithmann KU, Alpermann HG. Biochemical and pharmacological effects of dipyrone and its metabolites in model systems related arachidonic acid cascade. *Arzneimittelforschung* 1985; 35: 947-952.
46. Brogden RN. Pyrazolone derivatives. *Drugs* 1986; 32 (Suppl 4): 60-70.
47. Shimada SG; Otterness IG, Stitt JT. A study of the mechanism of action of the mild analgesic dipyrone. *Agents Actions* 1994; 41: 188-192.
48. Levy M, Zylber-Katz E, Rosenkranz B. Clinical pharmacokinetics of dipyrone and its metabolites. *Clin Pharmacokinet* 1995; 28:216-234.
49. Collares EF, Vinagre AM. Evidence of the effect of dipyrone on the central nervous system as a determinant of delayed gastric emptying observed in rats after its administration. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36:1375-1382.
50. Collares EF, Vinagre AM. Effect of the GABA<sub>B</sub> agonist baclofen on dipyrone-induced delayed gastric emptying in rats. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38:99-1004.
51. Takanaka A, Onoda K, Kainuma E, Lienard F, Omori Y. Effect of phenylpyrazolone derivates on gastric emptying rate and drug absorption in rats. *Jpn J Pharmacol* 1973; 23:745-747.
52. Soares ACF, Vinagre AM, Collares EF. Effect of antipyrine on the gastric emptying of liquid in rats. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39:1507-1512.
53. Kraul H, Pasanen M, Sigusch H, Stenbäck F, Park SS, Gelboin HV, Pelkonen O. Immunohistochemical properties of dipyrone-induced cytochromes P450 in rats. *Hum Exp Toxicol* 1996; 15: 45-50.
54. Vinagre AM, Collares EF. Efeito da 4-aminoantipirina sobre o esvaziamento de ratos. XIX Annual Meeting of the Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia, SP, Brazil, 2004, August 25-28.

55. Bustorff-Silva J, Perez CA, Fonkalsrud EW, Hoh C, Raybould HE. Gastric emptying after fundoplication is dependent on changes in gastric volume and compliance. *J Pediatr Surg* 1999; 34:1232-1235.
56. Azpiroz F. Control of gastric emptying by gastric tone. *Dig Dis Sci* 1994; 39(12 Suppl):18S-19S.
57. Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 1991; 43:143-201.
58. IASP pain terminology, acesso em 14/12/10. Disponível em [URL:http://www.iasp-pain.org](http://www.iasp-pain.org).
59. Borne, RF. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: Foye, WO, Lemke, TL, Willians, DA, Editor: *Medical Chemistry*, Willians and Wilkins, Baltimore-MD, 535-580.
60. Vinagre AM, Collares EF. Efeito da dipirona, antipirina e 4-aminoantipirina na complacência gástrica de ratos adultos jovens. *XXI Annual Meeting of the Federação de Sociedades de Biologia Experimental*, Águas de Lindóia, SP, Brazil, August 23-26, 2006, p. 40.011 (Abstract).
61. Vinagre AM, Collares EF. Effect of 4-aminoantipyrine on gastric compliance and liquid emptying in rats. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40:903-909.
62. Vinagre AM, Collares EF. Phenyipyrazolone derivatives inhibit gastric emptying in rats by a capsaicin-sensitive afferent pathway. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42:1086-1089.
63. Gamse R, Leeman SE, Holzer P, Lembeck F. Differential effects of capsaicin on the content of somatostatin, substance P, and neurotensin in the nervous system of rats. *Naunynschmiedeberg's Arch Pharmacol* 1981; 317:140-148.
64. Holzer P, Bucsics A, Lembeck F. Distribution of capsaicin-sensitive nerve fibres containing immunoreactive substance P in cutaneous and visceral tissues of the rat. *Neurosci Lett* 1982; 31:253-257.
65. Vinagre AM, Collares, EF. Efeito do pré-tratamento com devazepide, um antagonista para receptores CCK-1, sobre o retardo do esvaziamento gástrico induzido pela dipirona, 4-aminoantipirina e antipirina em ratos. *XXII Annual Meeting of the Federação de Sociedades de Biologia Experimental*. August 22-25; Águas de Lindóia, SP, Brazil. 2007. p 40.003 (Abstract).
66. Collares EF, Vinagre AM. Efeito do pré-tratamento com ondansetrona, um antagonista para receptores 5-HT<sub>3</sub>, sobre o retardo do esvaziamento gástrico induzido pela dipirona, 4-aminoantipirina e antipirina em ratos. *XXIII Annual Meeting of the Federação de*

Sociedades de Biologia Experimental. August 20-23; Águas de Lindóia, SP, Brazil. 2008. p 32.006 (Abstract).

67. Partosoedarso ER, Young RL, Blackshaw LA. GABA<sub>B</sub> receptors on vagal afferent pathways: peripheral and central inhibition. *Am J Physiol* 2001; 280:G658-G668.
68. Lee KJ, Vos R, Janssens J, Tack J. Differential effects of baclofen on lower oesophageal sphincter pressure and proximal gastric motility in humans. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18:199-207.
69. Collares EF, Vinagre AM. Effect of baclofen on liquid and solid gastric emptying in rats. *Arq Gastroenterol* 2010; 47:290-296.
70. Vinagre AM. Avaliação do envolvimento dos receptores adrenérgicos no retardo do esvaziamento gástrico de líquido induzido pelos derivados fenilpirazolônicos (dipirona, 4-aminoantipirina e antipirina) em ratos. (não publicado).

## DECLARAÇÃO

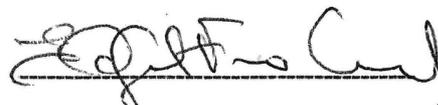
As cópias de artigos de minha autoria e co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais em congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha tese de doutorado intitulada "Efeito de derivados fenilpirazolônicos sobre o esvaziamento gástrico de líquido em ratos", não infringem os dispositivos da Lei Nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer.

Campinas, 28 de fevereiro de 2011



Autor: Adriana Mendes Vinagre

RG: 27111878-7



Orientador: Edgard Ferro Collares

RG: 2361417