

PAULA RUBYA DE SOUZA CÂMARA

**PARTICIPAÇÃO DOS MEDIADORES VASOATIVOS
ENDÓGENOS NA DEFESA DA MUCOSA GÁSTRICA
DURANTE A GASTROPATIA HIPERTENSIVA PORTAL**

CAMPINAS

2005

PAULA RUBYA DE SOUZA CÂMARA

**PARTICIPAÇÃO DOS MEDIADORES VASOATIVOS
ENDÓGENOS NA DEFESA DA MUCOSA GÁSTRICA
DURANTE A GASTROPATIA HIPERTENSIVA PORTAL**

*Tese apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Doutor em
Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas*

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo P. Ferraz

CAMPINAS

2005

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C14p

Câmara, Paula Rubya de Souza

Participação dos mediadores vasoativos endógenos na defesa da mucosa gástrica durante a gastroplastia hipertensiva portal . / Paula Rubya de Souza Câmara. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : José Geraldo Paraíso Ferraz

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Prostaglandinas. 2. Óxido nítrico. 3. Endotelinas. 4. Neuropeptídeos. 5. Hipertensão portal. 6. Mucosa gástrica. I. Ferraz, José Geraldo Paraíso. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

LOCAL E DATA: Campinas, 16 de Junho de 2005.

BANCA EXAMINADORA:

PROF. DR. JOSÉ GERALDO P. FERRAZ (ORIENTADOR) -----

PROF. DR. DURVAL ROSA BORGES (UNIFESP/EPM) -----

PROF. DR. JOSE PEDRAZZOLI JÚNIOR (USF) -----

PROF. DR. LOURENÇO SBRAGIA NETO (FCM-UNICAMP) -----

PROFA. DRA. ELZA COTRIN SOARES (FCM-UNICAMP) -----

DEDICATÓRIA

Dedico esta minha tese,

A Deus.....

Pois apesar de estar distante de minha família, ele nunca me deixou sentir solidão e por diversas vezes senti a sua presença sobre mim, sempre me dando forças para sorrir e tomar as decisões certas, mesmo quando o coração se sentia angustiado.

Por ter colocado pessoas boas no meu caminho, as quais me ajudaram e se tornaram minhas amigas.

Por ter-me ensinado a respeitar o próximo e a lhe auxiliar sempre que preciso fosse, honrando o juramento que fiz ao me formar e vivendo em paz com a minha consciência.

Muito obrigada meu Deus por tudo o que fizestes na minha vida e que eu sei que sempre o farás.

Aos meus familiares e amigos.....

Aos meus pais Maria Assis e Paulo Câmara, aos quais não existem palavras para agradecer e sim buscar respeitá-los onde quer que eu esteja, fazendo com que continuem tendo sempre muito orgulho de mim.

Aos meus irmãos e cunhadas Paulo Henrique e Iris, Francisco Eduardo e Karine e Edson Hugo e Shenian, e aos meus sobrinhos Thainá, Thales e Gustavo, que, da forma deles, sempre torceram por mim.

Ao Iguatemi Eduardo, por ter-me dado o carinho e incentivo que necessitei para enfrentar muitos obstáculos.

Aos meus amigos, tios e primos que sempre torceram por mim e...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Geraldo Paraíso Ferraz, que acolheu-me no seu grupo de pesquisa, e dessa forma obtive a oportunidade de conviver com profissionais diferenciados e de usufruir da excelente estrutura do Laboratório de Gastroenterologia Experimental do Gastrocentro da Unicamp, para o desenvolvimento desta tese de doutorado.

Ao Prof. Dr. Licio Augusto Velloso, chefe da pós-graduação do Dep. de Clínica Médica da FCM-Unicamp, pela ajuda pessoal e pela atenção que sempre me foi concedida, pelo privilégio de por-me em contato com profissionais excepcionais e por participar da minha banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto, do Dep. de Cirurgia da FCM-Unicamp, pela sua colaboração realizando a medida da pressão portal dos animais e pela sua disponibilidade e simpatia.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, do Dep. de Farmacologia da FCM-Unicamp por participar da minha banca de qualificação, pelas suas constantes colaborações nas minhas teses de mestrado e doutorado e

Ao Prof. Dr. Marcelo N. Muscará, do Dep. de Farmacologia do ICB-USP, pela sua atenção, respeito e colaboração na minha tese;

À Dra. Simone A. Teixeira, do Dep. de Farmacologia do ICB-USP, pela amizade, respeito, ensinamentos, colaboração,.....que me foram concedidos.

Ao Prof. Dr. José Murilo R. Zeitune, chefe da comissão de pesquisa do Gastrocentro-Unicamp por participar na minha banca de qualificação, pela sua receptividade, modéstia, polidez, cordialidade e apoio oferecidos durante toda a nossa convivência.

Ao Prof. Dr. Stiphen Listop, Chefe do Dep. de Farmacologia da FCM-Unicamp, pelas suas constantes colaborações na parte bioquímica da minha tese.

À Profa. Dra. Ivonete Batista Araújo, da Faculdade de Farmácia da UFRN, pelas suas instigantes aulas de Farmacologia, as quais direcionaram-me na minha vocação profissional e inspiraram-me a vir buscar mais conhecimento nesta área de estudo.

Aos Prof. Dr. Hélio Waldman e ao Dr. Raul Camelo, do DECOM da Faculdade de Engenharia Elétrica da Unicamp, pelo seu apoio computacional e gráfico.

Aos meus amigos Gerson, Natalícia, Cynthia, Célia, Midori, Elisabeth e Mara do Gastrocentro pela atenção, carinho, amizade, dedicação,..... sempre oferecidas.

Aos amigos dos Deptos de farmacologia da Unicamp (Alessandra, Carla, Enilton, Elen, Ivani, Letícia, Fernanda, Sara e Sissi) e da USP (Simoninha, Ana Augusta, Bruno, carli, Jamila, Lídia, Paula e Rodrigo) pela maravilhosa convivência e por me concederem carinho, respeito e amizade.

Ao Antônio da Galeno, pela imprescindível ajuda com a viabilização das minhas amostras.

À FAPESP, por ter patrocinado este meu projeto de pesquisa e minha estada nesta instituição.

Por fim, mas não menos importante, à Unicamp que me acolheu fazendo-me parte do seu corpo discente, e pelas excelentes estruturas física, de corpo docente, e de recursos humanos oferecidos a todos os profissionais que buscam o conhecimento.

“ Ninguém está sozinho quando pensa ”

Luís da Câmara Cascudo

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>liii</i>
ABSTRACT.....	<i>lvii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	61
1.1- Hipertensão portal	63
1.1.1- Alterações vasculares na hipertensão portal.....	63
1.1.2- Complicações clínicas associadas à hipertensão portal	64
1.2- Gastropatia hipertensiva portal.....	67
1.3- Mecanismos envolvidos na defesa da mucosa gástrica.....	68
1.3.1- Primeiro nível de defesa da mucosa.....	69
1.3.2- Segundo nível de defesa da mucosa.....	69
1.3.3- Terceiro nível de defesa da mucosa.....	70
1.3.4- Quarto nível de defesa da mucosa.....	70
1.3.5- Quinto nível de defesa da mucosa.....	70
1.3.6- Citoproteção.....	71
1.4- Trasmissão neurohumoral do trato gastrintestinal.....	71
1.4.1- Sistema nervoso parasimpático.....	72
1.4.2- Sistema nervoso simpático.....	72

1.4.3- Sistema nervoso entérico.....	73
1.4.4- Sistema nervoso somatosensorial.....	73
1.4.4.1- Neurônios sensoriais e seus receptores.....	74
1.4.4.2- Inflamação neurogênica.....	75
1.4.4.3- Capsaicina.....	76
1.4.4.3.1- Origem.....	76
1.4.4.3.2- Ações da capsaicina sobre os neurônios sensoriais.....	76
1.4.4.3.3- Excitação evocada pela capsaicina.....	77
1.4.4.3.4- Dessensibilização evocada pela capsaicina....	78
1.5- Mediadores vasoativos endógenos no trato gastrintestinal.....	78
1.5.1- Eicoisanóides.....	79
1.5.1.1- Prostaglandinas.....	79
1.5.1.2- Leucotrienos.....	81
1.5.2- Endotelinas.....	82
1.5.3- Citocinas.....	84
1.5.4- Óxido nítrico.....	85
1.5.5- Neuropeptídeos.....	87
1.5.5.1- Síntese dos neuropeptídios.....	87

1.5.5.2- Localização dos neuropeptídios.....	88
1.5.5.3- As Taquicininas.....	88
1.5.5.3.1- Origem e seus receptores.....	88
1.5.5.3.2- Localização de receptores de taquicininas no TGI.....	89
1.5.5.3.3- Síntese, liberação e degradação das taquicininas.....	89
1.5.5.3.4- Ações farmacológicas da taquicina substância P.....	90
1.5.5.3.5- Antagonistas de receptores de taquicininas....	91
1.5.5.3.6- Contribuição da substância P no fluxo sanguíneo gástrico.....	92
1.5.5.4- Peptídio Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP)...	92
1.5.5.5- Peptídio Vasoativo Intestinal (VIP).....	93
1.5.5.6- Polipeptídio Ativador de Adenilato-ciclase Pituitária (PACAP).....	94
1.5.5.7- Neuropeptídio Y (NPY).....	94
1.5.5.8- Somatostatina (SOM).....	95
2 - OBJETIVOS.....	97
2.1- Objetivo Geral.....	99

2.2- Objetivo Específico.....	99
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	101
3.1- Procedência dos animais utilizados.....	103
3.2- Indução da hipertensão portal.....	103
3.2.1- Estenose calibrada de veia porta.....	103
3.2.2- Ligadura e ressecção do ducto biliar.....	104
3.3- Preparação de câmara gástrica ex vivo e protocolo experimental....	104
3.4- Pedida do fluxo sanguíneo gástrico.....	105
3.5- Medida da pressão arterial média.....	107
3.6- Medida da pressão portal.....	107
3.7- Tratamentos.....	107
3.7.1- Tratamento crônico com L-NAME.....	107
3.7.2- Tratamento agudo com Indometacina.....	108
3.7.3- Tratamento agudo e crônico com Endotoxina.....	108
3.7.4- Tratamento agudo com os agonistas e antagonistas dos receptores ETA e ETB de Endotelinas	109
3.7.5- Tratamento neonatal com Capsaicina	109
3.7.6- Tratamento agudo com o antagonista de receptor de taquicininas NK1.....	109

3.8- Determinação de nitritos nas soluções de banho.....	109
3.9- Determinação protéica gástrica.....	110
3.10- Extração e quantificação da concentração gástrica de endotelinas- 1 E –3.....	110
3.11- Extração e quantificação da concentração gástrica de prostaglandinas.....	110
3.12- Reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa (RT- PCR).....	111
3.12.1 -Extração do RNA total.....	111
3.12.2- Transcrição do cDNA.....	112
3.12.3- PCR.....	112
3.12.4- Separação dos produtos de PCR.....	114
3.13- Análises histológicas	114
3.14- Análise estatística.....	115
4- RESULTADOS	117
4.1- Área de lesão de mucosa gástrica em animais sadios e com hipertensão portal após a aplicação tópica de etanol (40%).....	119
4.2- Resposta da microcirculação gástrica à aplicação tópica de etanol 40% em animais sadios e com HP.....	119
4.3- Medida da pressão portal de animais com HP.....	120

4.4- Efeito da inibição prolongada da síntese do NO sobre a pressão arterial média.....	121
4.5- Efeito da inibição prolongada da óxido nítrico sintase sobre a resistência da mucosa gástrica hipertensiva portal à lesão induzida pelo etanol e pela indometacina.....	122
4.6- Efeito da inibição da síntese de prostaglandinas sobre o fluxo da mucosa gástrica hipertensiva portal à lesão induzida pela aplicação tópica de etanol (40%) na presença de bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico.....	125
4.7- Efeito da inibição dos receptores de endotelinas sobre a resistência da mucosa gástrica hipertensiva portal à lesão induzida pela aplicação tópica de etanol (40%).....	128
4.8- Efeito da inibição dos receptores de endotelinas sobre o fluxo da mucosa gástrica hipertensiva portal à lesão induzida pela aplicação tópica de etanol (40%).....	130
4.9- participação dos neurônios sensoriais sobre as alterações hemodinâmicas em animais com hipertensão portal.....	132
4.10- efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre a resistência da mucosa e sobre a resposta da microcirculação gástrica hipertensiva portal às lesões induzidas por etanol.....	134
4.11- efeito da administração aguda e crônica de endotoxina sobre a resistência da mucosa gástrica à lesão induzida pela aplicação tópica de etanol 40% em animais controles e pvs.....	136

4.12- efeito do tratamento agudo e crônico com endotoxina sobre a resposta microcirculatória gástrica à aplicação tópica de etanol (40%) em controles e pvs.....	138
4.13- papel do pH intragástrico no dano lesivo induzido pelo etanol na hipertensão portal.....	139
4.14- dosagem de proteínas no tecido gástrico.....	142
4.15- Determinação da concentração de endotelinas 1 e 3 e PGE2 na mucosa gástrica através de ELISA.....	143
4.16- RT- PCR das isoformas de COX, NOS e ETs na mucosa gástrica de animais sadios ou com HP submetida ao estímulo lesivo com o etanol durante o tratamento crônico com L-NAME e L-NAME + indometacina.....	145
4.17- RT- PCR das isoformas de COX, NOS e ETs na mucosa gástrica submetida ao estímulo lesivo com o etanol de animais cirróticos tratados neonatal com capsaicina	152
4.18- Alterações histológicas.....	157
4.18.1- Histologia do fígado.....	157
4.18.2- Histologia da mucosa gástrica.....	159
4.19- Análises estatísticas.....	161
5- DISCUSSÃO.....	163
5.1- Resistência da MGHP ao estímulo lesivo com o etanol.....	165
5.2- Participação do NO e PGEs na patologia da GHP.....	166

5.3- Participação das endotelinas na patogênese da GHP.....	169
5.4- Participação dos neurônios sensoriais na patogênese da GHP.....	172
5.5- Participação das endotoxinas na GHP.....	174
5.6- Papel do pH intragástrico na lesão induzida pelo etanol na GHP.....	177
5.7- Ensaio Inumológico e Biologia Molecular.....	178
5.7.1- Concentração de ETs e PGE2 na MGHP.....	178
5.7.2- RT-PCR das isoformas de COX, NOS e ETs.....	179
5.7.3- RT-PCR das isoformas de COX, NOS e ETs na MGHP de animais BDL-capsaicinizados.....	182
5.8- Alterações histológicas.....	183
6- CONCLUSÕES	185
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	189
8- OBRAS CONSULTADAS.....	233
9- APÊNDICES	237
APÊNDICE 1- Produção Científica no Doutorado.....	239
APÊNDICE 2- Protocolo da Comissão de Ética na Experimentação Animal.....	243

LISTA DE ABREVIATURAS

ABs	Absorbância
BDL	LIGADURA DO DUCTO BILIAR
CAP	Capsaicinizados
CGRP	Peptídio Relacionado ao gene da calcitonina
CSPAN	Neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina
CTRL	CONTROLES
C18	Coluna rica em carbôno (18)
EtOH	Etanol
ETs	Endotelinas
ET- 1,3	Endotelina 1,3
GHP	Gastropatia hipertensiva portal
HP	Hipertensão portal
ETA,Br	Receptor A,B de endotelinas
i.d.	intradérmico
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenoso
Kg	Kilograma

LPS	Lipopolisacarídio
μ (micro)	Fator de multiplicação 10^{-06}
mg (mili)	Fator de multiplicação 10^{-03}
mmHg	milímetros de mercúrio
MGHP	Mucosa gástrica hipertensiva portal
n (nano)	Fator de multiplicação 10^{-9}
NO	Óxido nítrico
NK 1,2,3	Receptor1,2,3 de neurocininas
pH	Potencial hidrogeniônico
ρ (pico)	Fator de multiplicação 10^{-12}
PGE ₂	Prostaglandinas E ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PAM	Pressão arterial média
PP	Pressão portal
PVS	Estenose de veia porta
RAAS	Sist. renina-angiotensina-aldosterona
rpm	rotações por minuto
SAS	Sistema simpático-Adrenal
SP	Substância P (neuropeptídio)

Tampão A	T.F.A. 0,1%, pH 3,5
Tampão B	Acetonitrila 66%
TFA	Ácido trifluoro acético
TGI	Trato gastrintestinal
Tris	Trizma base
VIP	Peptídio vasoativo intestinal
VSPAN	Neurônios aferentes primários sensíveis aos vanilóides
V.O.	via oral

LISTA DE MATERIAIS

Substâncias	Procedência
Acetonitrila	Mallinckrodt
Albumina bovina	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
Ácido acetilsalicílico	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
Ácido clorídico	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
Ácido trifluoroacético	Aldrich
Acetato de etila	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
A5330	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
Bicarbonato de sódio	Merck
BQ 123	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
BQ 788	Calbiochem
BQ 485	Calbiochem
Cloreto de sódio	Mallinckrodt
Capsaicina	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
Ditiotreitol	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
<i>E. coli</i>	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
Etanol	Merck
ET-1	Calbiochem (San Diego, USA)
ET-3	Calbiochem (San Diego, USA)

Fenobarbital	Aventis
Fosfato de sódio dibásico	Mallinckodt
Halotano	Cristália
Heparina	Organon Tecknika
Hexano	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
Hidróxido de sódio	Mallinckodt
Indometacina	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
Kit PGE ₂	ReD Systems
Kit ET-1	Peninsula Laboratories
Kit ET-3	Peninsula Laboratories
Ladder	Amershan (EUA)
N-Nitro-l-metil arginina (L-NAME)	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
PD 142898	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
Primers COXs, NOS, ETs	Imprint (EUA)
Pentobarbital sódico (Hypnol)	Rhone Merieux (Irlanda)
Substância P	Sigma Chem.Co.(St.Louis,EUA)
Tetracloroeto de carbôno	Merck
Trizol	Invitrogen
Salina	Frenesius (Campinas, SP)

LISTA DE QUADROS

	<i>Pág.</i>
Quadro 1- Seqüência do primer, produto e referência.....	113

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1- Câmara gástrica.....	105
Figura 2- Medida de fluxo Sanguíneo.....	106
Figura 3- Área de lesão gástrica induzida pela aplicação tópica de etanol (40%) na mucosa gástrica de animais sadios e com HP.....	119
Figura 4- Resposta do fluxo sanguíneo gástrico de animais PVS, BDL e Ctrl ao estímulo lesivo com etanol (40%).....	120
Figura 5- Pressão portal de animais Ctrl, BDL e PVS.....	121
Figura 6- Pressão arterial média de animais Ctrl, PVS e BDL após o tratamento crônico (14 dias) com L-Name.....	122
Figura 7- Lesão de mucosa gástrica após o estímulo com EtOH 40% em animais Ctrl tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina.....	123
Figura 8- Lesão da mucosa gástrica após o estímulo com EtOH 40% em animais PVS tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina.....	124
Figura 9- Lesão da mucosa gástrica após o estímulo com EtOH 40% em animais BDL tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + iIndometacina.	124
Figura 10- Lesão da mucosa gástrica após o estímulo com EtOH 20% e 40% em animais BDL tratados cronicamente com L-NAME.....	125
Figura 11- Fluxo Sangüíneo da mucosa gástrica após o estímulo com EtOH 40% em animais Ctrl tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina.....	126

Figura 12-	Fluxo Sangüíneo da mucosa gástrica após o estímulo com EtOH 40% em animais PVS tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina.....	127
Figura 13-	Fluxo Sangüíneo da mucosa gástrica após o estímulo com EtOH 40% em animais BDL tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina.....	127
Figura 14-	Lesão gástrica induzida pelo etanol (40%) na mucosa de ratos Ctrl tratados com ET-1, ET-3, BQ 485 e BQ 788.....	129
Figura 15-	Lesão gástrica induzida pelo etanol (40%) na mucosa de ratos PVS tratados com ET-1, ET-3, BQ 485 e BQ 788.....	129
Figura 16-	Lesão gástrica induzida pelo etanol (40%) na mucosa de ratos BDL tratados com ET-1, ET-3, BQ 485 e BQ 788.....	130
Figura 17-	Resposta microcirculatória gástrica à exposição tópica ao etanol (40%) em ratos Ctrl tratados com ET-1, ET-3, BQ 485 e BQ 788...	131
Figura 18-	Resposta microcirculatória gástrica à exposição tópica ao etanol (40%) em ratos PVS tratados com ET-1, ET-3, BQ 485 e BQ 788..	131
Figura 19-	Resposta microcirculatória gástrica à exposição tópica ao etanol (40%) em ratos BDL tratados com ET-1, ET-3, BQ 485 e BQ 788..	132
Figura 20-	Pressão Portal de animais Ctrl, BDL, e Ctrl e BDL capsaicinizados.....	133
Figura 21-	Pressão Arterial Média de animais Ctrl, BDL, e Ctrl e BDL capsaicinizados.....	133
Figura 22-	Lesão gástrica induzida pela aplicação tópica de EtOH (40%) em animais Ctrl, BDL, Ctrl e BDL/capsaicinizados e BDL tratados com antagonista de receptor NK1.....	134
Figura 23-	Resposta da microcirculação gástrica de ratos Ctrl e Ctrl capsaicinizados à aplicação tópica de etanol 40%.....	135

Figura 24-	Resposta da microcirculação gástrica de ratos BDL, BDL/capsaicina e BDL tratados com antagonista de receptor NK1 à aplicação tópica de etanol 40%.....	135
Figura 25-	Curva dose-resposta da área de lesão gástrica induzida pelo etanol após o tratamento agudo com LPS em animais Ctrl e PVS.....	137
Figura 26-	Efeito do etanol (40%) sobre a lesão de mucosa gástrica de animais Ctrl e PVS após tratamento agudo e crônico com LPS.....	137
Figura 27-	Efeito do etanol (40%) sobre o fluxo sanguíneo gástrico de controles após tratamento agudo e crônico com LPS.....	138
Figura 28-	Efeito do etanol (40%) sobre o fluxo sanguíneo gástrico de animais PVS após tratamento agudo e crônico com LPS.....	139
Figura 29-	Curva dose-resposta das diferentes faixas de pH da solução de HCl 100mM sobre a resistência da mucosa gástrica à lesão induzida por etanol a 40% em animais.....	140
Figura 30-	Efeito do pH da solução de HCl 100mM sobre a resistência da mucosa gástrica à lesão induzida por etanol a 40% em três modelos de hipertensão portal experimental e em controles.....	140
Figura 31-	Efeito do pH da solução de HCl 100mM sobre a resistência da mucosa gástrica hipertensiva portal à lesão induzida por etanol a 40% durante a inibição crônica de NO e inibição aguda da síntese de PGE2.....	141
Figura 32-	Efeito do pH da solução de HCl 100mM sobre a resistência da mucosa gástrica de animais Ctrl à lesão induzida por etanol a 40% 6 h após administração intraperitoneal única de LPS.....	141
Figura 33-	Dosagem de proteínas na mucosa gástrica de animais Ctrl, PVS e BDL, com e sem o tratamento crônico com L-NAME.....	142

Figura 34-	Dosagem de proteínas na mucosa gástrica de animais BDL e BDL/capsaicina.....	142
Figura 35-	Concentração de ET-1 e ET-3 na mucosa gástrica dos animais Ctrl, BDL e PVS, com e sem tratamento crônico com L-NAME e L-NAME + indometacina.....	144
Figura 36-	Concentração de proteínas (ET-1 e ET-3) na amostra de tecido gástrico de animais BDL e BDL-capsaicina.....	144
Figura 37-	Concentração PGE2 na amostra de tecido gástrico dos animais Ctrl, BDL e PVS, com e sem tratamento crônico com L-NAME e L-NAME + indometacina.....	146
Figura 38-	Densitometria da COX-1 na mucosa gástrica de animais Ctrl, BDL e PVS tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina.....	147
Figura 39-	Densitometria da COX-2 na mucosa gástrica de animais Ctrl, BDL e PVS tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina.....	148
Figura 40-	Densitometria da eNOS na mucosa gástrica de animais Ctrl, BDL e PVS tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina.....	149
Figura 41-	Densitometria da iNOS na mucosa gástrica de animais Ctrl, BDL e PVS tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina.....	150
Figura 42-	Densitometria da ET-1 na mucosa gástrica de animais Ctrl, BDL e PVS tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina.....	151

Figura 43-	Densitometria da ET-3 na mucosa gástrica de animais Ctrl, BDL e PVS tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina.....	152
Figura 44-	Densitometria da COX-1 na mucosa gástrica de animais Ctrl e BDL, Ctrl e BDL tratados neonatal com capsaicina.....	153
Figura 45-	Densitometria da COX-2 na mucosa gástrica de animais Ctrl e BDL, Ctrl e BDL tratados neonatal com capsaicina.....	154
Figura 46-	Densitometria da eNOS na mucosa gástrica de animais Ctrl e BDL, Ctrl e BDL tratados neonatal com capsaicina.....	154
Figura 47-	Densitometria da iNOS na mucosa gástrica de animais Ctrl e BDL, Ctrl e BDL tratados neonatal com capsaicina.....	155
Figura 48-	Densitometria da ET-1 na mucosa gástrica de animais Ctrl e BDL, Ctrl e BDL tratados neonatal com capsaicina.....	156
Figura 49-	Densitometria da ET-3 na mucosa gástrica de animais Ctrl e BDL, Ctrl e BDL tratados neonatal com capsaicina.....	156
Figura 50-	Alterações histológicas no fígado dos animais (a) Ctrl, (b) PVS, BDL (c)	158
Figura 50-	Alterações histológicas no fígado dos animais (d) BDL-capsaicinizado.....	159
Figura 51-	Alterações histológicas na mucosa gástrica dos animais (a) Ctrl, (b) Ctrl-capsaicinizado e (c) BDL –capsaicinizado.....	160
Figura 52-	Alterações histológicas na mucosa gástrica dos animais (a) e (b) BDL e (c) e (d) BDL+L-name.....	161
Figura 53-	Mecanismo de ação proposto para a interação entre as endotelinas e os neuropeptídios no controle hemodinâmico do TGI durante a hipertensão portal.....	174

RESUMO

A resistência reduzida da mucosa gástrica hipertensiva portal, perante os agentes lesivos, é observada frequentemente em pacientes portadores de cirrose hepática e hipertensão portal. Trata-se de complicação grave que predispõe ao desenvolvimento de hemorragia digestiva alta ou anemia, secundária à perda crônica sangüínea, resultando na necessidade de freqüentes transfusões sangüíneas.

Os fatores que determinam a resistência diminuída da mucosa gástrica hipertensiva portal perante os agentes nocivos incluem uma complexa interação entre vários mediadores continuamente liberados durante o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica na hipertensão portal. Os neurônios aferentes primários podem contribuir para esse fenômeno, uma vez que eles foram previamente implicados no desenvolvimento da hiperemia esplâncnica na hipertensão portal.

O presente estudo teve como objetivo investigar a contribuição da inibição crônica do óxido nítrico, bem como a participação das prostaglandinas e endotelinas, na resistência reduzida da mucosa gástrica à lesão induzida pelo etanol 40% usando modelos experimentais em ratos. Modelos distintos de hipertensão portal (ligadura de ducto biliar comum e estenose calibrada de veia porta) foram realizados em ratos Sprague-Dawley. As lesões gástricas induzidas pelo etanol foram avaliadas utilizando o modelo *ex vivo* de câmara gástrica. A resposta microcirculatória da mucosa foi avaliada através de fluxometria por laser-Doppler usando o mesmo modelo *ex vivo*.

O papel da inibição prolongada de óxido nítrico foi realizado através da adição de L-NAME à água de beber dos ratos controles e com hipertensão portal antes dos experimentos de câmara gástrica. Similarmente, a função das endotelinas e das prostaglandinas foi avaliada através da utilização de agonistas, antagonistas ou de inibidores. A participação de neurônios aferentes no desenvolvimento da circulação hiperdinâmica da hipertensão portal e sua repercussão sobre a resistência da mucosa gástrica ao etanol foi avaliada através do tratamento neonatal com capsaicina ou do uso de antagonista de taquicininas. A sinalização molecular para produção óxido nítrico, prostaglandinas e endotelinas, bem como o efeito da endotoxemia e o pH intragástrico foi também avaliado.

Nossos resultados indicam que a hipertensão portal associada à disfunção hepática reduz a capacidade da mucosa gástrica de se defender contra a aplicação tópica de etanol. Esse fenômeno é influenciado pelo pH intragástrico, bem como pela presença de endotoxemia. Os resultados também indicam que os neurônios aferentes primários participam no desenvolvimento da circulação hiperdinâmica da hipertensão portal, afetando a capacidade de defesa da mucosa gástrica perante os agentes agressores.

Nós concluímos que a capacidade de defesa da mucosa gástrica hipertensiva portal, avaliada nos modelos experimentais utilizados, é modulada pelos neurônios aferentes primários, e resulta de uma complexa interação entre o óxido nítrico liberado, prostaglandinas, endotelinas e o sistema nervoso entérico.

ABSTRACT

The reduced resistance of the portal hypertensive gastric mucosa is frequently observed in patients with liver cirrhosis associated with portal hypertension. It can predispose to upper gastrointestinal hemorrhage as well as anemia secondary to chronic blood loss. It is usually associated with the need of multiple blood transfusions.

The mechanisms involved in the reduced resistance of the portal hypertensive gastric mucosa include a complex interaction between several vasoactive mediators continuously released during the development of the hyperdynamic circulation of portal hypertension. Primary afferent neurons may also contribute to this phenomenon, as they have been previously implicated in the development of the splanchnic hyperemia in portal hypertension.

The objective of the present study was to investigate the role of chronic inhibition of nitric oxide, as well as prostaglandins and endothelins, in the reduced resistance of the gastric mucosa to ethanol (40%)-induced injury using an experimental rat model. Portal hypertension was induced by bile duct ligation or calibrated portal vein stenosis in male Sprague-Dawley rats. Ethanol-induced gastric damage was assessed using an *ex vivo* gastric chamber preparation. Gastric blood flow responses were measured using laser Doppler flowmetry using the *ex vivo* preparation as well. The role of chronic nitric oxide inhibition was achieved by adding L-NAME to drinking water of control and portal hypertensive rats prior to chamber experiments. Similarly, the function of endothelins and prostaglandins was investigated using agonists, antagonists or inhibitors. The participation of primary afferent neurons in both development of hyperkinetic circulation in portal hypertension and its contribution on gastric resistance to ethanol-induced injury were investigated by induction of cirrhosis by bile duct ligation in either capsaicin newborn or takikinin antagonist treated rats. The molecular signaling for generation of nitric oxide, prostaglandins and endothelins was studied using RT-PCR. The gastric prostaglandin synthetic capacity was assessed using ELISA in samples collected at the end of the different experiments. The impact of endotoxemia and intragastric pH on gastric resistance to ethanol-induced injury was also investigated.

Our results indicated that induction of liver dysfunction and portal hypertension reduces the gastric resistance to topical application of ethanol. This is influenced by the intragastric pH,

as well as by the presence of endotoxemia. This phenomenon is result of a complex interplay between the production and release of nitric oxide, prostaglandins and endothelins. In addition, primary afferent neurons participate in the development of the hyperdynamic circulation of portal hypertension, affecting the ability of the gastric mucosa to defend against injury.

We conclude that gastric defence against topical application of ethanol in the presence of experimental portal hypertension is modulated by primary afferent neurons, and result of a complex interplay among the release of nitric oxide, prostaglandins, endothelins and the enteric nervous system.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Hipertensão portal

A hipertensão portal (HP) é um estado anormal, definido por aumento patológico e mantido (cerca de 1-5 mmHg acima do valor normal) da pressão no sistema-porta (ABRALDES e BOSCH, 2002a). A etiologia da HP está associada a uma obstrução ao fluxo sanguíneo portal, a qual pode ser pré-hepática (esquistossomose), hepática (cirrose) e/ou pós-hepática (síndrome de Budd-Chiari). A síndrome clínica HP consiste em esplenomegalia, ascite e a formação de colaterais porto-sistêmicas, como uma tentativa de descomprimir o sistema venoso portal (GERAGHTY *et al.*, 1989).

Devido ao perfil hemodinâmico alterado na HP, alterações dramáticas na força mecânica, tanto na pressão como no fluxo, desempenham um papel importante no controle endotelial, na sinalização de células do músculo liso vascular e na estrutura e função do fígado (COWAN e LANGILLE, 1999; WILLIAMS, 1998; NAKAHASHI *et al.*, 1997).

1.1.1- Alterações vasculares na hipertensão portal

A reatividade vascular pode ser definida *in vivo* como a resposta do músculo liso vascular, e *in vitro* como a resposta de segmentos de vasos sanguíneos às substâncias vasoativas. Um fenômeno de alteração da reatividade vascular pode explicar a diferença nas síndromes vasculares vistas em alguns leitos vasculares, em vários estágios da cirrose no fígado. Por exemplo, na síndrome hepatopulmonar, observa-se frequentemente a presença de uma vasodilatação no leito vascular pulmonar (KROWKA, 1997), embora uma minoria de pacientes possa apresentar hipertensão pulmonar devido a uma vasoconstrição pulmonar. Similares alterações ocorrem nos vasos renais, cerebrais e do antebraço (KROWKA, 1997).

Com a progressão da doença do fígado, há a tendência de alguns leitos vasculares tornarem-se mais vasoconstrictos. Isto pode ser devido a um aumento, de qualquer proporção, de vasoconstrictores endógenos comparado com os vasodilatadores na circulação sistêmica. O fato de que nem todos os leitos vasculares tornam-se vasoconstrictados pode ser explicado pelo fenômeno da hiporreatividade vascular ou a não sensibilidade à vasoconstrictores endógenos e exógenos (JOHNSTONE e JOSE, 1963; KAPLAN e SILAH, 1964; HADOKE e HAYES, 1997; JIMENEZ *et al.*, 1999).

Paralelamente, na cirrose, foi detectada a presença de um excedente de vasodilatadores circulantes que escaparam da degradação hepática através dos desvios porto-sistêmicos e pelo próprio comprometimento do fígado (SOGNI *et al.*, 1996; MACGILCHRIST *et al.*, 1991). Entretanto, a vasodilatação também não é generalizada, mas limitada a certos leitos vasculares, como os leitos esplâncnicos e pulmonares (GARCIA-PAGAN *et al.*, 1999).

A existência de uma vasodilatação, na presença de níveis elevados de vasoconstrictores circulantes, como a angiotensina II (LARAGH *et al.*, 1963) e a noraepinefrina (BLENDIS *et al.*, 1987) pode ser explicada também pela hipossensibilidade devido ao aumento dos níveis de vasodilatadores, o que pode ser um fenômeno tardio e precedido por defeitos vasculares intrínsecos (MOREAU e LEBREC, 1995), como também pelo desenvolvimento de uma neuropatia autonômica (FLORAS *et al.*, 1991).

O mecanismo básico para esta vasodilatação aparenta ser devido a uma grande variedade de substâncias neuroendócrinas e vasoativas como as prostaciclinas (GUARNER *et al.*, 1992) e o monóxido de carbono (GARCIA-PAGAN *et al.*, 1999), os quais induzem relaxamento mediado pelo NO (GRANGER *et al.*, 1980). Além disso, a liberação de prostaciclinas pode ser igualmente importante como a do NO, e, aparentemente, ambos trabalham em harmonia para a manutenção da vasodilatação esplâncnica basal.

1.1.2- Complicações clínicas associadas à hipertensão portal

Além da presença de hipertensão portal, os pacientes com cirrose exibem características hemodinâmicas diferentes como circulação sistêmica hiperdinâmica e com aumento do débito cardíaco, influxo esplâncnico e do volume de plasma, e diminuição da resistência vascular global e desregulação neurohumoral (MOLLER e HENRIKSEN, 1999; ARROYO e GINES, 1992).

O desvio do fluxo sanguíneo portal para a circulação sistêmica, evitando a passagem pelo fígado através dos desvios porto-sistêmicos, é seguido pelo desenvolvimento de uma circulação hiperdinâmica, caracterizada por hipotensão, diminuição da resistência vascular periférica, aumento do fluxo sanguíneo para os territórios esplâncnicos e sistêmicos (LEE et al.,1992), bem como sensibilidade reduzida à administração exógena de vasoconstrictores. Estes fatores patogênicos trabalham em conjunto para o desencadeamento das mais sérias complicações clínicas na cirrose do fígado (LEBREC e MOREAU, 1999; IWAKIRI et al., 2002).

Embora os mecanismos fundamentais para o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica não sejam bem compreendidos, estudos prévios têm sugerido que esta, poderia ser devido, pelo menos em parte, ao acúmulo na circulação sistêmica de substâncias vasodilatadoras de origem esplâncnicas (BANDI et al., 1999). O balanço entre as forças vasodilatadoras e vasoconstrictoras está anormal, especialmente em pacientes descompensados, e substâncias derivadas do endotélio como o óxido nítrico e endotelinas estão sendo vistas como importantes na perturbação da circulação (PATERNON et al., 2000).

Os sistemas homeostáticos neurohumorais como o sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), sistema simpático-adrenal (SAS) e a liberação não-osmótica de vasopressina estão muito ativados na maioria dos pacientes com doença avançada do fígado, especialmente em pacientes com disfunção renal com retenção de sódio e água (MOLLER e HENRIKSEN, 1999; ARROYO e JIMENEZ, 2000). A acentuada atividade simpático-adrenal reflexo induzida, ativação do RAAS e elevados níveis circulantes de vasopressina e endotelina-1 estão implicados na contra-regulação hiperdinâmica na cirrose (MOLLER et al., 2001).

Em pacientes com cirrose, a pressão arterial sanguínea tem um ritmo circadiano característico com valores quase normais durante a noite, e baixa da pressão arterial sanguínea durante o dia (MOLLER et al.,1997). Adicionalmente, as alterações na resistência vascular, bem como o tônus de grandes artérias podem ser modulados por substâncias vasoativas (BLENDIS e WONG, 2000).

As funções sistólicas e diastólicas estão implicadas diretamente com a diminuição da função do fígado (MOLLER et al., 2001). Por isso, recentemente uma disfunção cardíaca foi denominada de cardiomiopatia cirrótica. Ela é resultante da diminuição da resistência vascular periférica e da distribuição anormal do volume sanguíneo, ocasionadas pela vasodilatação esplâncnica (BLENDIS e WONG, 2000).

Embora a resistência vascular esteja diminuída em pacientes com cirrose, uma olhada atenta em órgãos e tecidos individualmente mostrou áreas de hipoperfusão, perfusão normal e hiperperfusão. Isto indica que há leitos vasculares com alta resistência, como os rins, e de baixa resistência, como o sistema esplâncnico (SCHRIER et al., 1994).

A síndrome hepatorenal é caracterizada pela retenção de sódio, comprometimento da excreção de água e diminuição da perfusão e filtração glomerular renal. Ela é uma das maiores complicações na cirrose, com uma incidência anual de 8% em pacientes com ascite. Essa falência renal é desenvolvida em pacientes com cirrose avançada, ou seja, no estágio final da doença, sendo, portanto, um importante fator determinante de sobrevida (ARROYO et al., 2002).

A síndrome hepatopulmonar geralmente refere a hipoxemia vista em pacientes com doenças crônicas do fígado e parece ser relativamente comum, embora freqüentemente subclínica; além disso, a hipertensão pulmonar ocorre em 0.2-0.7% de pacientes cirróticos (LIU e LEE, 1999).

Paralelamente, o completo desvio da bile (contendo sais biliares ligantes de endotoxinas e imunoglobulina A) do lúmen do intestino, altera a flora bacteriana, causa diminuição da integridade da mucosa e diminui a inativação da endotoxina levando a endotoxemia e bacteremia portal. Esta endotoxemia pode ocorrer devido à deficiência das células de Kupffer do fígado cirrótico, em remover as endotoxinas provenientes dos intestinos, fazendo com que estas possam ser liberadas dentro da circulação periférica através dos desvios porto-sistêmicos (GRINKO et al., 1995).

A sepse associada com endotoxemia é a maior causa de morte dos pacientes cirróticos hospitalizados, acometendo aproximadamente 40% desses pacientes (NOLAN, 1975; BODE et al., 1987). O risco aumentado às infecções é secundário à deficiência de vários dos mecanismos de defesa do hospedeiro, incluindo a função deficiente dos neutrófilos.

Outras complicações relacionadas com a hipertensão portal são: alteração no metabolismo de fármacos e substâncias endógenas, ascite, encefalopatia hepática, hipóxia arterial, hiperesplenismo, hemorragia digestiva alta (ABRALDES e BOSCH, 2002a) e a gastropatia hipertensiva portal que é tema deste estudo e será vista com mais detalhes na seção posterior.

1.2- Gastropatia hipertensiva portal

Lesões da mucosa gástrica são uma freqüente causa de sangramentos em pacientes com hipertensão portal, contabilizando 20% a 40% de toda hemorragia (TERÉS et al., 1976). Inicialmente, o sangramento da mucosa é causado pela gastrite erosiva nomeada inflamação da mucosa gástrica (SARFEH et al., 1988).

MCCOMARCK et al. (1995) demonstraram que a mucosa gástrica, observada endoscopicamente como gastrite hemorrágica em pacientes com hipertensão portal, mostrou ectasia da mucosa e submucosa, mas não necessariamente alguma alteração inflamatória. Desde que o termo gastropatia congestiva foi introduzido, essas lesões da mucosa foram denominadas gastropatias congestivas ou gastropatia hipertensiva portal (GHP) (KOTZAMPASSI et al., 1990). Agora, GHP é reconhecida como uma entidade clínica na hipertensão portal que define um tipo especial de lesão macroscópica difusa que aparece na mucosa gástrica de pacientes com hipertensão portal. A aparência macroscópica da GHP é caracterizada endoscopicamente pelo padrão mosaico ou pele de cobra (THULUVATH et al., 2002).

Histologicamente, essas lesões correspondem a uma dilatação vascular na mucosa e submucosa na ausência de erosões ou inflamação (TOYONAGA e IWAO, 1998). Endoscopicamente, as lesões são classificadas como moderadas quando o padrão mosaico ou marcas vermelhas superficiais estão presentes, e severas quando a mucosa gástrica aparece com pontos vermelhos escuros difusos (PIQUE, 1997). Lesões moderadas são altamente prevalentes (65-90%), enquanto as lesões severas estão presentes em apenas em 10%-25% dos pacientes cirróticos (THULUVATH et al., 2002).

A patogênese da GHP não é bem conhecida, mas a congestão venosa relacionada tanto com o aumento da pressão portal, como com o aumento do fluxo sanguíneo gástrico tem sido um fator crucial para o seu desenvolvimento. Embora estas lesões representem sangramentos não oriundos de varizes, a esclerose destas pode contribuir para o desenvolvimento ou agravação das lesões. Sangramentos são as únicas manifestações clínicas da GHP, e ocorrem somente naqueles pacientes com lesões severas (PIQUET, 1997). As lesões severas são uma origem em potencial dos sangramentos, enquanto as lesões moderadas são de pouca significância clínica (TOYONAGA e IWAO, 1998). Em um período de cinco anos seguidos, o risco de um grande sangramento ou de um sangramento crônico, os quais induzem anemia, é de 60% e 90%, respectivamente, para pacientes com GHP severa.

A pressão portal e alguns fatores humorais podem desempenhar um papel importante nesta patogênese. A atividade secretora de ácido gástrico está reduzida, e a barreira da mucosa gástrica está comprometida. Se um superfluxo (congestão ativa) ou estase (congestão passiva) causa a hiperemia da mucosa gástrica, isso ainda está estabelecido.

1.3- Mecanismos envolvidos na defesa da mucosa gástrica

A mucosa gástrica é frequentemente exposta a vários tipos de irritantes como álcool, ácidos, irritantes oxidativos, drogas e bactérias. Estes irritantes causam danos à mucosa gástrica (FERRAZ et al., 1997a), e até estimulam a apoptose de células epiteliais gástricas (TSUTSUMI et al., 2002).

A inflamação do trato gastrointestinal (TGI) pode influenciar profundamente a função da camada mucosa que está intimamente ligada aos conteúdos luminais. Esta inflamação pode também alterar a habilidade da mucosa em resistir a uma injúria induzida por fatores luminais e a capacidade para a mucosa sofrer um reparo, uma vez que a lesão tenha ocorrido. A resposta inflamatória é coordenada em uma grande extensão por mediadores químicos que são formados e liberados pelo epitélio, imunócitos e por nervos dentro da lâmina própria. Esta liberação ocorre em resposta a uma lesão, infecção ou a uma exposição destas células ao antígeno. Embora a inflamação seja uma resposta fisiológica que é frequentemente auto-limitante, em algumas circunstâncias, como quando um fator que inicia a resposta inflamatória persiste, a inflamação pode ser de grande intensidade, levando a uma lesão tecidual excessiva (WALLACE e MA, 2001).

1.3.1- Primeiro nível de defesa da mucosa

A defesa da mucosa tem sido melhor caracterizada no estômago, o qual exibe uma considerável resistência aos efeitos danosos do ácido e da pepsina. O primeiro nível de defesa consiste dos fatores secretados dentro do lúmen, incluindo ácido, muco, bicarbonato e substâncias antibacteriais (imunoglobulinas e lactoferrinas). A principal função do ácido gástrico é reduzir o número de bactérias que são ingeridas e entram no intestino delgado (WALLACE e MA, 2003).

1.3.2- Segundo nível de defesa da mucosa

O segundo nível de defesa é o epitélio, o qual é notavelmente resistente à lesão induzida pelo ácido (SANDERS et al. 1985). O epitélio também atua como uma barreira para a difusão passiva de substâncias prejudiciais. O dano ao epitélio pode ser reparado rapidamente através de um processo conhecido como “restituição”, o qual envolve a migração de células epiteliais saudáveis. A restituição é observada em resposta à lesão fora do TGI bem como em outros tecidos (PAIMELA et al., 1995).

1.3.3- Terceiro nível de defesa da mucosa

A microcirculação representa o terceiro nível de defesa da mucosa, que é um dos que são significativamente modulados pelo sistema nervoso e mediadores inflamatórios. A difusão do ácido ou toxinas dentro da mucosa resulta em uma elevação do fluxo sanguíneo local (mediado por nervos aferentes sensoriais), o qual é crítico para limitar o dano e facilitar o reparo. O sangue dilui e/ou neutraliza o ácido/toxina e previne seu acúmulo no tecido da mucosa em concentrações citotóxicas. Em modelos experimentais em que os nervos aferentes sensoriais foram sensibilizados pela capsaicina (HOLZER et al., 1991a), essa resposta hiperêmica reativa está comprometida e a mucosa pode ser danificada pela exposição a irritantes que poderiam ser normalmente tolerados. Nos modelos experimentais atuais, que estudam a mucosa gástrica na HP, foi observado que a presença de um defeito desta ordem também conduz à um aumento da susceptibilidade ao dano lesivo nestas mucosas (BECK et al., 1993; FERRAZ et al., 1995).

1.3.4- Quarto nível de defesa da mucosa

O quarto nível de defesa é o sistema imune da mucosa, consistindo de vários imunócitos, residentes entre a lâmina própria, que atuam como sentinelas. Mastócitos e macrófagos por exemplo, podem sentir a entrada de material estranho (antígenos e endotoxinas) dentro da mucosa e podem responder pela liberação de mediadores químicos que coordenam uma resposta inflamatória apropriada (WALLACE e MA, 2001).

1.3.5- Quinto nível de defesa da mucosa

O nível final da defesa da mucosa é caracterizado pelo quadro de reações que ocorrem quando uma úlcera foi formada – uma úlcera sendo definida como uma quebra na mucosa que se estende através da *muscularis mucosae*. Nestas circunstâncias a úlcera é reparada por meio do crescimento e redensolvimento de glândulas gástricas, crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e reinervação da mucosa por nervos extrínsecos e intrínsecos (WALLACE, 2001).

1.3.6-Citoproteção

O termo citoproteção e citoproteção adaptativa foram popularizados pelos experimentos de ROBERT et al. (1983) e refere-se à habilidade de certas prostaglandinas e irritantes em proteger, em minutos, a mucosa gástrica contra exposições tóxicas subsequentes de agentes que poderiam a partir de então produzir erosões hemorrágicas. Certos mecanismos como o aumento do fluxo sanguíneo gástrico e a formação de uma “capa de muco” têm sido mencionados, mas nenhum apresenta uma explicação satisfatória pelo fato de estes mecanismos não estarem envolvidos em todos os casos de citoproteção (GISLASON et al., 1993).

O ponto crítico de qualquer teoria unificada para o mecanismo de citoproteção deve dar uma resposta que pode ser gerada por uma variedade de agentes, a qual pode ser produzida entre 30s e 10min, e a qual não estaria necessariamente associada com a destruição epitelial.

Efeitos sobre o fluxo sanguíneo e sobre a liberação de muco são ditos como sendo secundários, e não como sendo em decorrência de falhas de proteção da mucosa. A proteção é propiciada pela secreção de fluidos pela camada de superfície da mucosa, o que resulta numa “barreira de secreção”. O fluido secretado pode ser ácido ou não. Esta barreira de secreção é relacionada como sendo uma camada justamucosa, onde uma classe de fluidos liberados dilui os agentes necrosantes, minimizando suas concentrações na hora do seu contato com a superfície da mucosa (MORRIS et al., 1993).

1.4-Transmissão neurohumoral do trato gastrintestinal

Atualmente, sabe-se que um complexo circuito nervoso formado por fibras autonômicas do sistema nervoso entérico (SNE), sistema nervoso parassimpático (SNP) e simpático (SNS) (as quais inervam, principalmente, plexos mientérico e submucoso) e por fibras nervosas sensoriais do sistema somatossensorial, além de uma ampla gama de neurotransmissores e peptídeos, controlam o complexo nervoso, o fluxo sanguíneo e o processo secretor no sistema gastrintestinal.

1.4.1- Sistema nervoso parassimpático

Vários neurotransmissores do SNC atuam em sítios específicos no cérebro, os quais controlam funções gastrintestinais através do sistema nervoso autônomo (SNA). O sistema gastrintestinal é estimulado pelas fibras parassimpáticas que chegam ao plexo mientérico. No plexo mientérico, os neurônios sensoriais enviam sinais para as fibras parassimpáticas que respondem originando às respostas secretoras ou contráteis locais (VANNER e SUPPRENANT, 1996).

As fibras parassimpáticas liberam a ACh, que ao ativar seus receptores muscarínicos, promove peristaltes, determina o relaxamento do esfíncter e a propulsão do bolo fecal (DALE e FELBERG, 1934). Existem cinco receptores muscarínicos (M1, M2, M3, M4 e M5). Os receptores M1 e M5 estão presentes nos neurônios do sistema nervoso central e sistema nervoso periférico; os subtipos M2, no coração e em neurônios; o subtipo M3 em músculo liso visceral dos sistemas respiratório, gastrintestinal e urogenital; o subtipo M4 em músculos lisos e glândulas secretoras (HULME et al, 1990).

1.4.2- Sistema nervoso simpático

Contrariamente ao sistema nervoso parassimpático, o sistema nervoso simpático exerce um efeito direto sobre todo o trato GI. As fibras simpáticas exercem um efeito inibitório sobre todo o trato GI. Essas fibras liberam a NA que exerce seu efeito inibitório ao interagir com seus receptores α e β (GOYAL e HIRANO, 1996).

As fibras simpáticas inervam diretamente os vasos sanguíneos, músculo liso e algumas glândulas. A NA inibe o músculo liso (exceto a muscular da mucosa que é excitada pela NA). Essas fibras podem apresentar algumas terminações nos plexos, onde inibem a secreção de ACh. Elas induzem vasoconstrição da veia mesentérica e de veias intestinais. Ao estimularem as arteríolas, reduzem o fluxo sanguíneo, mas dentro de alguns minutos, através de um mecanismo de “escape auto-regulador”, vasodilatadores locais liberados pela isquemia causam uma vasodilatação das arteríolas, a qual supera a vasoconstrição simpática (SUPPRENANT, 1994).

1.4.3 - Sistema nervoso entérico

O SNE é formado por uma rede de pequenos gânglios e conexões de fibras nervosas inseridas ao longo do trato gastrointestinal. Juntos estes neurônios exercem controle reflexo da motilidade, da secreção e do fluxo sanguíneo, bem como da comunicação com o gânglio simpático e com o sistema nervoso central (FURNESS et al., 1992).

As células nervosas estão contidas em dois plexos nervosos denominados mientérico e submucoso. O plexo mientérico, descrito por AUERBACH (1862) está localizado entre as camadas musculares, longitudinal e circular, onde desempenha o controle da atividade motora gastrointestinal. O plexo submucoso ou plexo de MEISSNER (MEISSNER et al., 1857) está inserido entre as camadas circular da muscular e a submucosa, e é responsável pela regulação da secreção epitelial e do fluxo sanguíneo local (FURNESS et al., 1992). Os interneurônios entéricos transmitem informações entre o plexo submucoso e mucoso.

No SNE foram descobertos mais de 30 transmissores liberados dos terminais nervosos e de outras estruturas, como: acetilcolina (ACh), noradrenalina (NA), adenosina trifosfato (ATP), 5-hidroxitriptamina (5-HT), substância P (SP), Polipeptídio intestinal vasoativo (VIP), colecistoquinina (CCK), somatostatina (SOM), Enkefalina (ENK), Ácido γ -aminobutírico (GABA), neuropeptídio Y (NPY), óxido nítrico (NO), entre outros. Essa variedade de peptídeos e neurotransmissores revela que a transmissão neste sistema é pluriquímica (FURNES et al, 1989, 1992, 1995).

1.4.4- Sistema nervoso somatosensorial

A camada mucosa contém as terminações das células sensoriais especializadas para a quimiorrecepção e mecanorrecepção. Os corpos celulares dessas células receptoras ficam no plexo submucoso.

1.4.4.1- Neurônios sensoriais e seus receptores

Os neurônios sensoriais susceptíveis à ação estimulatória e inibitória da capsaicina foram denominados de CSPAN “capsaicin-sensitive primary afferent neurons” (SZOLCSANYI, 1977). Eles receberam essa denominação pelo fato que Jancsó demonstrou nas décadas de 50 e 60, que o princípio ativo extraído da pimenta vermelha, a capsaicina, não somente ativava essas fibras como também rendia resistência ao estímulo da dor em animais (JANCSÓ, 1960).

Morfolologicamente, as fibras nervosas aferentes são divididas em duas classes: A-delta (A- δ) e -beta (A β) e C. As fibras C possuem o corpo celular de diâmetro pequeno ($< 30\mu\text{m}$), são amielínicas e têm velocidade de condução mais lenta, ao passo que as fibras (A- δ) são mielínicas, com corpo celular de médio diâmetro e com velocidade de condução intermediária, entre a das fibras C e das fibras A β de rápida condução (HOLZER, 1991b). Eles são designados neurônios de primeira ordem, tendo apenas um prolongamento, o axônio, que se bifurca em um ramo periférico e em um ramo central, sendo dessa forma neurônios pseudo-unipolares. O ramo central penetra na raiz dorsal do nervo espinhal ou craniano, finalmente, culminando em terminações nervosas que respondem a tipos específicos de estímulos, recebidos pelos receptores sensoriais ou nociceptores na periferia (YOUNG e YOUNG, 1998).

De acordo com critérios funcionais existem três tipos de nociceptores associados a dois tipos de fibras nervosas aferentes: nociceptores mecanossensíveis e mecanotérmicos relacionados com as fibras A- δ e os nociceptores polimodais relacionados com as fibras C, os quais respondem às três modalidades produtoras de dor, isto é, os estímulos térmicos, mecânicos e químicos (NOBACK et al., 1999).

Devido à sensibilidade aos vanilóides, estes neurônios foram recentemente denominados neurônios aferentes primários sensíveis aos vanilóides (VSPAN) (SZALLASI e BLUMBERG, 1990, 1996). A capsaicina ativa os neurônios sensoriais ao se ligar ao seu receptor TRPV1 (transient receptor potential channel-vanilloid subfamily member), expresso nestes neurônios. Este receptor é uma subunidade do canal de cálcio expressada por um conjunto de neurônios nociceptivos na raiz dorsal e no gânglio trigêmeo (CATERINA e JULIUS, 2003; CATERINA, 2001).

Com relação aos neurônios sensoriais do trato digestivo, eles podem ser divididos em dois grupos: a) neurônios sensoriais extrínsecos, que têm o corpo celular no gânglio sensorial extrínseco (rota do gânglio dorsal e do gânglio sensorial vagal) e b) neurônios sensoriais entéricos, que apresentam o corpo celular junto ao caminho do trato digestivo (FURNESS et al., 1996).

Os neurônios sensoriais estão envolvidos na resposta autonômica reflexa ao estímulo visceral (mudanças no fluxo sanguíneo, frequência cardíaca ou respiratória) e na percepção consciente do desconforto visceral (NESS e GEBHART, 1990). Alguns neurônios no hipotálamo possuem sensibilidade à capsaicina (JANCSO-GABOR et al., 1970; HORI, 1984), e há propostas de que essas células representam receptores “quentes” envolvidos na regulação central da temperatura corporal (CATERINA e JULIUS, 2003).

Na mucosa GI, os nervos sensoriais liberam os neuropeptídios CGRP e a substância P (SP). Estes nervos são encontrados muito próximos aos mastócitos da mucosa (STEAD et al, 1989). A ativação desses nervos aferentes sensoriais leva à liberação de histamina nos mastócitos da mucosa, o que pode contribuir para a geração da resposta hiperêmica da mucosa gástrica de animais sadios aos agentes irritantes (SUNG et al., 1991; WALLACE e MA, 2002). Além disso, os neurônios sensoriais mediam inflamação neurogênica no trato gastrintestinal (TGI) e respiratório e pele (HOLZER, 1988a, 1988b).

1.4.4.2- Inflamação neurogênica

O termo “inflamação neurogênica” é relacionado aos eventos vasculares ocasionados pela liberação de neuropeptídios de seus terminais axônicos, frente à estimulação química, mecânica ou térmica (LEMBECK e HOLZER, 1979; BALUK, 1997). Ao serem liberadas, essas substâncias atuam em células-alvo através de receptores específicos, causando efeitos pró-inflamatórios diversos, tais como vasodilatação arteriolar, com o aumento de fluxo sanguíneo local, aumento da permeabilidade venular, alterações na contratilidade do músculo liso, desgranulação de mastócitos e uma variedade de efeitos sobre o recrutamento de leucócitos e fibroblastos (HOLZER, 1992; MAGGI, 1995). Essas substâncias podem despolarizar ou hiperpolarizar as terminações nervosas ou células pós-sinápticas (MAGGI, 1991; BRAIN e CAMBRIDGE, 1996; HOLZER, 1998a).

1.4.4.3- A capsaicina

1.4.4.3.1-Origem

Na metade do século 19 foi isolado o principal componente da pimenta vermelha do gênero *Capsicum* e nomeado capsaicina (THRESH, 1846). A estrutura química da capsaicina é uma acilamida derivada do ácido homovanílico, 8- metil-N-vanil-6-nonemida (NELSON, 1919). O nome *capsicum* pode ter origem no grego, *Kapto*, que significa “picante”, qualidade característica desse fruto. Outros autores referem que *capsicum* é derivado do latim *capsa* que significa “caixa”, referindo-se ao fato de a vagem da pimenta ser oca e dividida em compartimentos onde estão as sementes (BRICOLA, 2001).

1.4.4.3.2- Ações da capsaicina sobre os neurônios sensoriais

JANCSÓ (1960) demonstrou que a capsaicina exercia uma ação bloqueadora sobre os neurônios sensoriais. Este achado possibilitou o desenvolvimento de vários estudos funcionais dos neurônios sensoriais. Os neurônios VSPA são responsáveis pela informação da percepção e da dor para o sistema nervoso central (função aferente), ao passo que, nos terminais periféricos, estes neurônios são sítios de liberação para uma variedade de neuropeptídeos pró-inflamatórios (função eferente), tais como: CGRP, CCK, DYN, NKA, SOM, SP e VIP, entre outros (SZALLASI e BLUMBERG, 1999). Estes neuropeptídeos apresentam um importante papel na inicialização da cascata da inflamação neurogênica (FOREMAN, 1987; GEPPETTI e HOLZER, 1996).

A maioria dos nociceptores sensíveis à capsaicina são as fibras C (JANCSÓ et al., 1977), mas um número menor pertence à população de fibras A-δ (LAWSON e NICKELS, 1980). A capsaicina pode ativar as funções aferente e eferente, condizentes com o modelo de reflexo axônico (BAYLISS, 1901; LISNEY e BHARALI, 1989). Além disso, a capsaicina é capaz de liberar peptídeos dos terminais nervosos sensoriais, por um mecanismo não mediado pelo reflexo axônico (SZOLCSÁNYI et al., 1998).

Os neurônios VSPA podem ser ativados por uma variedade de estímulos químicos e físicos, tais como o calor e a pressão (MAGGI, 1991; LUNDBERG, 1993), pela ação da histamina e bradicinina, através de seus respectivos receptores, e por mecanismos que envolvem perturbações na membrana neural, como observado para o xileno e o óleo de mostarda (JANCSÓ et al., 1968). A ativação por prótons (baixo pH) envolve receptores próprios, conhecidos como canais iônicos sensíveis a ácidos (WALDMANN et al., 1997) e receptores sensíveis a vanilóides (BEVAN e YEATS, 1991; TOMINAGA et al., 1998).

Muitos compostos irritantes atuam nos neurônios sensoriais primários, mas a capsaicina e os vanilóides relacionados são os únicos que, após a estimulação inicial, levam a um estado refratário, denominado de dessensibilização (JANCSÓ e JANCSÓ, 1949; JANCSÓ e AMBRUS, 1994)

1.4.4.3.3- Excitação evocada pela capsaicina

A seletividade da capsaicina é demonstrada pela presença de um sítio de reconhecimento específico de membrana, o receptor vanilóide. A interação com este receptor leva à abertura de um canal catiônico, com influxo de Na^+ e Ca^{+2} , gerando despolarização e potencial de ação; isto determina a propagação do impulso para as ramificações periféricas e para o sistema nervoso central (BEVAN e SZOLCSÁNYI, 1990).

A ativação periférica dos VSPA ativa a liberação de glutamato e de peptídeos neuromoduladores de seus terminais centrais no corno dorsal da medula espinhal, desse modo promovendo uma resposta aguda da dor. Entretanto, uma característica peculiar dos neurônios sensoriais é que a estimulação pela capsaicina ou outros estímulos nocivos pode também desencadear a liberação de neuropeptídios de suas terminações periféricas (CATERINA e JULIUS, 2003).

1.4.4.3.4- Dessensibilização evocada pela capsaicina

A capsaicina promove desde a dessensibilização até a degeneração de neurônios sensoriais. A exposição à capsaicina leva inicialmente a um disparo nociceptor e a um período de sensibilidade aumentada a dor térmica e ao estímulo mecânico. Esta fase é tipicamente seguida por um período refratário durante o qual a espécie experimental torna-se relativamente resistente à capsaicina e outros estímulos dolorosos (JANCSO, 1992; JANCSO et al., 1967). Dependendo da dose de capsaicina, duração do tratamento, via de administração, idade e espécie da cobaia, este estado refratário pode demorar horas ou até mesmo durar por toda a vida da cobaia (CATERINA e JULIUS, 2003).

Mudanças funcionais são freqüentemente acompanhadas por mudanças morfológicas que variam desde dilatação média dos terminais axônicos e da mitocôndria até a completa degeneração do neurônio. Na mais extrema situação, ratos ou camundongos recém-nascidos tratados sistemicamente com capsaicina na dose de 50/Kg de peso exibem uma degeneração seletiva das fibras C (e algumas fibras A), dos axônios e uma irreversível redução (> 80%) do corpo celular dos neurônios sensoriais (JANCSÓ et al, 1984; JANCSÓ et al., 1977, LAWSON e NIKELS, 1980).

Quando esses animais tornam-se adultos, eles perdem a capacidade de responder a estímulos químicos nocivos como a capsaicina, óleo de mostarda e xileno, e não exibem inflamação neurogênica em resposta a esses compostos ou à estimulação elétrica antidrômica dos nervos cutâneos. Alguns trabalhos demonstram que esses animais também possuem resposta reduzida aos agentes irritantes térmicos e/ou mecânicos (CERVERO e McRITCHIE, 1981; DOUCETTE et al.,1987; HAYES et al., 1981; HOLZER et al., 1979; JANCSÓ et al, 1984).

1.5-Mediadores vasoativos endógenos no trato gastrintestinal

Os mediadores inflamatórios podem alterar a integridade da mucosa por influenciar efetivamente os vários componentes da defesa da mucosa, os quais são a combinação de fatores que permitem a mucosa suportar a exposição a substâncias com

tipos distintos de faixa de pH, temperatura e osmose, soluções com propriedades detergentes (bile), produtos bacterianos capazes de ativar reações inflamatórias sistêmicas e locais (WALLACE e GRANGER, 1996). Quando o dano à mucosa ocorre, o reparo da lesão pode ser ativado rapidamente, limitando a possibilidade de substâncias prejudiciais (produtos bacterianos) entrarem em contato com a circulação sistêmica.

A resistência da mucosa gástrica à lesão depende, ultimamente, de um balanço entre os fatores defensivos e os fatores agressivos presentes no lúmen da mucosa. Vários componentes da defesa da mucosa podem ser influenciados por mediadores inflamatórios. Alguns destes mediadores são prostanóides, citocinas, neuropeptídios, entre outros.

Esses mediadores contribuem tanto na modulação da defesa da mucosa gástrica quanto na patogênese da lesão da mucosa, e serão descritos um pouco mais detalhadamente nas seções a seguir.

1.5.1- Eicosanóides

1.5.1.1- Prostaglandinas

As prostaglandinas (PGs) podem diminuir respostas inflamatórias, fazendo então a redução da severidade do dano da mucosa; isto é feito através da modulação da atividade de imunócitos dentro da mucosa. Por exemplo, a prostaglandina E_2 (PGE_2) atua como um potente supressor da liberação de TNF-alfa ($TNF-\alpha$) de macrófago (KUNKEL et al., 1996). Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), por outro lado, aumentam a liberação de $TNF-\alpha$, de macrófagos e de outras células (SANTUCCI et al., 1994). Em dados endotoxínicos de bactérias em humanos, a administração prévia de um AINE significativamente elevou a liberação de $TNF-\alpha$ dentro da circulação sistêmica (SANTUCCI et al., 1994). PGs também regulam a liberação de outras citocinas como IL-1 de macrófagos (KUNKEL et al., 1996), além disso, elas produzem uma potente quimiotaxina, leucotrieno B-4 e neutrófilos (WERTHEIM et al., 1993).

A descoberta nos anos 90 de uma segunda isoforma de COX (XIE et al., 1991) tem levado à uma completa reconsideração do papel desta enzima na produção de prostaglandinas em várias circunstâncias. Agora é largamente acreditado que as prostaglandinas produzidas em circunstâncias acima do normal, o qual pode desempenhar um importante papel na modulação do fluxo sanguíneo e como fatores da defesa da mucosa como secreção de muco, são derivados da isoforma da COX expressada constitutivamente, COX-1. Por outro lado, as prostaglandinas produzidas no contexto da inflamação são largamente derivadas da isoforma induzível da COX, COX-2 (XIE et al., 1992). Esta teoria tem sido um tanto supersimplificada seguindo: COX-1 produz prostaglandinas que desempenham funções benéficas, entretanto COX-2 produz prostaglandinas que exercem efeitos maléficos (pró-inflamatórios). Essa hipótese levou a geração de fármacos inibidores seletivos da COX-2 como agentes antiinflamatórios e analgésicos (WALLACE, 1999). Porém esta hipótese não estava totalmente correta, pois atualmente sabe-se que a COX-2 é constitutiva no cérebro e nos rins, e que o uso dos inibidores seletivos da COX-2 potencializou o risco de acidente vascular cerebral e infarto, o que levou à sua retirada do comércio.

A atividade enzimática das duas isoformas é inibida pela aspirina e outras drogas antiinflamatórias não-esteroidais (MEADE et al., 1993). O efeito colateral gástrico associado com a absorção destas drogas em humanos está associado com a inibição dos prostanóides derivados da via da COX-1. Os níveis de PGE_2 na veia porta de animais com HP é elevado o que sugere sua contribuição no aumento da pressão portal devido ao aumento do fluxo sanguíneo esplâncnico (LIN e SHAN, 1995; FLISIAK e PROPOWICZ, 1997). Além disso, a PGE_2 é um potente vasodilatador renal. As PGEs renais modulam a ação de outros hormônios e autacóides envolvidos na regulação da hemodinâmica renal, filtração glomerular e retenção renal de sódio e água. Pacientes com cirrose apresentam um aumento na síntese de PGE_2 vasodilatadoras, indicada pela alta excreção urinária (BIRNEY et al., 2003). Adicionalmente, as células de Kupffer, que são macrófagos teciduais fixados, são capazes de produzir prostaglandinas derivadas da COX, assim como leucotrienos LTB_4 e LTC_4 . Elas produzem o vasodilatador protetor, PGE_2 , e em adição a este, produzem as prostaglandinas vasoconstrictoras PGD_2 , $PGF_2\alpha$ e o Tromboxano A_2 (TXA_2) (BIRNEY et al., 2003).

A Prostaglandina I_2 (PGI_2) ou Prostaciclina, principal produto da COX vascular, é formada principalmente nas células endoteliais e pela camada média adventícia, em resposta aos estímulos físicos e humorais, incluindo substâncias pró-inflamatórias (BIRNEY et al., 2003). PGI_2 causa relaxamento do músculo liso vascular pela ativação da adenil ciclase e aumento na produção do 3'5'adenosina monofosfato cíclica (AMP cíclico).

Na maioria dos vasos sangüíneos, arteriais e venosos, a contribuição das PGI_2 para o relaxamento dependente do endotélio é pequena e seus efeitos são essencialmente acumulativos para aqueles do NO. Entretanto, as duas substâncias atuam sinergicamente para inibir a agregação plaquetária (GROSZMANN, 1998). Dentro do rim, o endotélio vascular produz principalmente PGI_2 , enquanto o glomérulo sintetiza vários prostanóides, sendo a PGI_2 o predominante em humanos; os túbulos e as células da medula intersticial produzem principalmente PGE_2 (BIRNEY et al., 2003).

Um aumento na liberação basal de PGI_2 sugere para esta um papel maior na patogênese da vasodilatação e hipocontractibilidade associada com a hipertensão portal. Em animais com HP, a produção corporal de PGI_2 está aumentada (YIN et al., 1995; OHTA, et al., 1995; SITZMANN et al., 1994; JEREMY et al., 1994). Além disso, os níveis de PGI_2 no sistema venoso portal de pacientes cirróticos e em animais com PHT estão elevados, o que sugere que a liberação venosa portal de PGI_2 pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da hiperemia esplâncnica, circulação colateral e da gastropatia hipertensiva portal (OHTA et al., 1995; SITZMANN et al., 1994).

1.5.1.2- Leucotrienos

Os leucotrienos (LTc), produtos da via da lipoxigenase, são mediadores de injúria celular e no fígado são produzidos pelas células de Kupffer e hepatócitos, sendo o principal leucotrieno o LTB_4 . A cirrose avançada está associada com comprometimento da função dos leucócitos e LTB_4 potencializa a injúria (CLARIA et al, 1998). Os leucotrienos C_4 , D_4 , e E_4 têm potentes propriedades vasoconstrictoras, proliferativas e pró-fibrogênicas que podem participar na chave dos eventos patofisiológicos na cirrose do fígado e são

derivados da 5-lipoxigenase. O LTD4 aumenta a concentração intracelular de Ca^{+2} e induz contração nas células estreladas, e *in vivo* LTD4 aumenta a pressão portal em ratos (TITOS et al, 2000).

A diminuição na produção de PGs vasodilatadoras, concomitante com o aumento na produção de prostaglandinas vasoconstrictoras e leucotrienos dentro do fígado, promove um grande aumento na resistência intra-hepática e aumento na pressão portal. O desenvolvimento de desordens hormonais e metabólicas, e a severidade da falência hepática na hepatite crônica e na cirrose de diferentes etiologias suportam a conclusão de que os prostanóides desempenham um papel importante na regulação da função do fígado e na patogênese da cirrose (BIRNEY et al., 2003).

1.5.2-Endotelinas

As endotelinas consistem em uma família de peptídeos vasoativos contendo 21 resíduos de aminoácidos. O peptídeo endotelina (ET) deriva de três isoformas, de 21 aminoácidos isômeros, cada uma codificada por genes distintos (pré-pro-ET-1, pré-pró-ET-2 e pré-pró-ET-3. Os peptídeos pré-pró-endotelinas são clivados por endopeptidases específicas aos precursores de ETs constituídos por 38-41 aminoácidos (as “big endotelinas ou pró-ET” desprovidas de atividade biológica), as quais são clivadas por enzimas conversoras de endotelinas (ECE) nos peptídeos maduros: ET-1 (corresponde à primeira isoforma a ser isolada e é a mais predominante), ET-2 e ET-3 (MASAKI e YANAGUSAWA, 1993).

A ET-1 foi originalmente isolada do sobrenadante de culturas de células endoteliais de aorta porcina e é um dos mais potentes vasoconstrictores atualmente conhecidos (YANAGISAWA et al., 1988). Ela difere estruturalmente da ET-2 e ET-3 por dois e seis resíduos de aminoácidos, respectivamente (TERADA et al, 1993).

As ETs atuam por meio de receptores acoplados à proteína G, ET-A e ET-B, para ativar a fosfolipase C, resultando na liberação de eicosanóides, diacilglicerol e do Inositol trifosfato (IP3), o qual promove a liberação de Ca^{+2} dos seus estoques intracelulares (NAYLOR, 1990; REMUZZI et al., 2002).

A liberação de ETs tem efeitos complexos, dependendo sobre a duração do estímulo e o tipo de receptor presente. Ligantes para ETs em receptor ETA produzem vasoconstricção, enquanto ligantes para receptor ETB produzem vasoconstricção ou vasodilatação via elevação de NO e prostaciclina (TREVISI et al., 2002), resultando (JIMENEZ et al., 1999).

Embora as ETs sejam produzidas primariamente por células endoteliais e células do músculo liso, células dos rins, pulmões, coração, cérebro, pâncreas e baço também sintetizam este peptídeo (MASAKI e YANAGUSAWA, 1992,1993). Além disso, ROCKEY et al. (1998) sugerem que em certos processos inflamatórios crônicos, como no caso da cirrose, as células hepáticas, são capazes de produzir endotelinas. O caminho da síntese das endotelinas é agora bem conhecido, mas seu complexo processo de degradação não o é. Diversos estímulos modulam a expressão e liberação das endotelinas, entre os quais estão o fator de crescimento β , interleucina-1, angiotensina II e curto estresse (BENIGNI e REMUZZI, 1999).

Os níveis normais de endotelinas no plasma são baixíssimos (<1pg/mL). Entretanto, elevados níveis de endotelinas têm sido descritos em pacientes com choque cardiogênico, sobre diálise crônica, e com hipertensão pulmonar (CEBERNACEK e STEWART, 1989; KAMOI et al., 1992). Elevados níveis também têm sido detectado em casos de hiponatremia, uremia, infarto do miocárdio, na hipertensão portal, e em várias outras desordens (HOCHER et al., 1997). As endotelinas 1 e 3 também possuem ações ulcerogênicas e vasoconstrictoras no estômago de ratos (WALLACE et al., 1989).

Adicionalmente, por ser um potente vasoconstrictor, ET-1 desempenha outras potentes ações farmacológicas incluindo vasoconstricção e regulação da função dos rins (UCHIDA et al., 1988), fígado (GANDHI et al, 1990); e pode desempenhar um importante papel na HP (OHTA et al.,2000) e no desenvolvimento da GHP por meio da liberação do NO (MIGOHO et al., 2000).

1.5.3-Citocinas

Citocinas desempenham papel central no sistema imune e, além disso, são extremamente importantes na defesa da mucosa. A maioria das informações disponíveis nesta consideração pertence ao intestino grosso e delgado, por causa da importância das citocinas na patogênese de doenças inflamatórias do intestino (IBD). Já existem consideráveis evidências sugerindo que um dos fatores-chaves na patogênese do IBD é um distúrbio do balanço entre a produção de citocinas pró-e antiinflamatórias. Três citocinas têm sido mais extensivamente caracterizadas nesta consideração: IL-1 β e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), ambas as quais são consideradas como citocinas pró-inflamatórias; e a IL-10, que é largamente considerada como uma citocina antiinflamatória (WALLACE e MA, 2002).

A IL-1 β e o TNF- α são liberados em uma reação inflamatória inicial, e ambos contribuem para a resposta sistêmica à inflamação ou infecção como a resposta da fase aguda, efeitos sobre o apetite e a geração da febre (DINARELLO, 1988). A IL-1 β é produzida por vários tipos de células, incluindo monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos (DINARELLO, 1994). Elevados níveis de IL-1 β têm sido demonstrados no plasma e tecidos de pacientes com doenças inflamatórias intestinais (IBD), bem como em vários modelos experimentais de colite (BECK e WALLACE, 1997). A IL-1 β pode reduzir a injúria gastroduodenal devido a sua habilidade de liberar NO e prostaglandinas. Além disso, ela inibe a liberação de mediadores promotores de úlcera (PAF e histamina) de mastócitos (SALVEMINI et al. 1993).

O TNF- α é um mediador extremamente importante na injúria tecidual e inflamação observada nas IBD. A inibição da síntese do TNF- α resulta na atenuação dos efeitos lesivos dos antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) no estômago de ratos (APPLEYARD et al., 1996). Os níveis de TNF- α no plasma (MURCH et al, 1991) e fezes (BRAEGGER et al., 1992) de crianças com IBD apresentam-se muito elevados, assim como o número de macrófagos TNF- α positivos na lâmina própria de pacientes com IBD (MURCH et al., 1993).

A IL-10 é principalmente produzida pelos linfócitos Th2, mas ela também pode ser produzida pelos monócitos e células Th1 (BECK e WALLACE, 1997). Ela tem um papel central na diminuição da cascata inflamatória pela redução na produção de citocinas pró-inflamatórias (STORDEUR e GOLDMAN, 1998; MOORE et al., 1993), e um aumento na produção de outras citocinas antiinflamatórias (CASATELL et al., 1994). A IL-10 pode inibir a produção de TNF- α e IL-1 β (STORDEUR e GOLDMAN, 1998).

1.5.4-Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico é formado do átomo nitrogênio da Guanidina terminal da L- arginina pela NO sintase em muitos tecidos, incluindo a mucosa gástrica (MONCADA et al., 1991, BROWN et al., 1993). Na vasculatura, o NO reage com o ferro para ativar a enzima guanilato ciclase, estimulando-a a produzir o mediador intracelular GMP cíclico que aumenta a liberação de neurotransmissores resultando no relaxamento do músculo liso vascular e vasodilatação (MURAD, 1998)

Em condições normais, a origem enzimática do NO no intestino está limitada as duas isoformas da NO sintase (NOS) constitutivas: endotelial NOS (eNOS, tipo III) e neuronal (nNOS, tipo I). Estas isoformas são reguladas principalmente pelos níveis intracelulares de cálcio, via calmodulina, e libera NO em resposta ao fluxo de cálcio. O NO formado por estas enzimas constitutivas desempenham um papel importante na modulação da integridade da mucosa gástrica por interagir com neuropeptídeos sensoriais e prostaglandinas endógenas (WHITTLE et al.,1990). Apesar da nomenclatura, a nNOS pode ser encontrada no epitélio, e a eNOS está presente no músculo, por exemplo no esfíncter esofágico inferior (MASHIMO e GOYAL, 1999).

A outra isoforma de NOS é referida como induzível NOS (iNOS, tipo II), a qual é cálcio/calmodulina independente; uma vez que iNOS tenha sido formada, a atividade somente é possível de ser obtida pela disponibilidade do substrato e co-fatores. A indução da iNOS normalmente ocorre em estados de inflamação e ativação imune. A formação de grandes quantidades de NO pela iNOS explica a citotoxicidade de macrófagos ativados, e é

considerada danosa para a mucosa gástrica (BROWN et al., 1993). Na mucosa gástrica, de pacientes cirróticos com GHP, foi relatado existir um aumento na atividade da NO sintase. Isto corroboraria aumentando os níveis de NO (nitritos + nitratos) no sangue venoso portal, mas não sistêmico, de pacientes cirróticos (SARELA et al., 1999).

Os principais tipos celulares que expressam iNOS são os macrófagos e neutrófilos. Entretanto, com fortes sinais para a indução, células endoteliais podem expressar iNOS, como no caso da colite experimental (ZHANG et al., 1998). Além disso, em estados moderados de inflamação como a gastrite, iNOS é encontrada somente em infiltrados de células imunes (MANNICK et al., 1996). Em modelos experimentais de inflamação, iNOS também tem sido identificada em neurônios (MILLER et al., 1995), uma importância em potencial para ainda ser discutida (WALLACE e MILLER, 2000).

Vários fármacos podem reduzir ou prevenir os efeitos biológicos do NO, através de diferentes mecanismos, que incluem a inibição da captação da L-Arginina pela célula, a redução da disponibilidade de co-fatores para a formação do NO, a remoção do NO formado ou a inibição dos mecanismos celulares que levam à indução da isoforma da NOS (MOORE e HANDY, 1997). HIBBS et al, (1987) verificaram que os análogos da arginina atenuavam a ativação de macrófagos, e este efeito é vinculado a forma levógira da L-arginina. Então, os análogos da L-arginina com substituição no nitrogênio do grupo guanidino atuam como falsos substratos, bloqueando a atividade da enzima. Neste caso, a inibição pode ser revertida pelo aumento da concentração de arginina, comportando-se como um antagonista do tipo competitivo. Por outro lado, a exposição prolongada a estes inibidores promove uma inibição irreversível da enzima (BREDT e SNYDER, 1994).

Muitos investigadores têm empregado inibidores da NOS, como o L-NMA, L-NNA, L-NAME para atenuar os fenômenos biológicos mediados pelo NO ou dependentes da NOS (GRIFFITH e STUEHR, 1995). As formas D-isomérica destes compostos não apresentam atividade inibitória sobre a NOS, podendo ser empregadas como controle do experimento.

A hiperprodução de NO (na periferia) ou hipoprodução (intra-hepática) pode ser a causa (indução da iNOS, estímulo da eNOS) ou a consequência (deficiência da eNOS intra-hepática) da síndrome hiperdinâmica. Além disso, o NO e o Peptídio Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP), são fortes candidatos na vasodilatação e na contribuição da diminuição da pressão arterial sistêmica, descrita na cirrose avançada (BENDTSEN *et al.*, 1991).

O NO tem sido o sujeito de extensivos estudos com relação ao seu papel na defesa ou patogênese da lesão de mucosa gástrica (CALATAYUD *et al.*, 2001b; WALLACE e MILLER 2000; MILLER e SANDOVAL, 1999; MASUDA *et al.*, 1995). Permanecem controvérsias considerando o papel predominante do NO no TGI: protegendo ou danificando. As formas constitutivas da NO Sintase (NOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS), são muito importantes na função normal do TGI na qual a inibição destas enzimas pode resultar em distúrbios da motilidade gastrointestinal, fluxo sanguíneo, secreção, etc. De outra forma, a NOS induzível (iNOS), a qual produz quantidades relativamente grandes de NO em condições patológicas, contribui para a lesão e disfunção da mucosa. A supressão da síntese de NO deixa a mucosa gástrica mais susceptível à lesão (WHITTLE *et al.*, 1990, OTHA *et al.*, 1997). Além disso, acreditava-se que a administração de doadores de NO poderia proteger o estômago de uma lesão (MACNAUGHTON *et al.*, 1989). Esta hipótese levou ao desenvolvimento de drogas antiinflamatórias não-esteroidais liberadoras de NO (NSAIDs) as quais acreditava-se não causar danos gastrintestinais e que acelerariam a cicatrização da úlcera gástrica (WALLACE. *et al.*, 1994, ELLIOTT, *et al.*, 1995).

1.5.5- Neuropeptídios

1.5.5.1- Síntese dos neuropeptídios

Postula-se que os neuropeptídios sejam sintetizados a partir de seus precursores no gânglio da raiz dorsal e são imediatamente transportados para os terminais nervosos central e periférico, cuja liberação resulta nas respectivas funções eferentes e aferentes (LÜNDBERG, 1996).

Com a ocorrência do trauma ou inflamação, os tecidos lesados liberam mediadores químicos que podem sensibilizar ou mesmo ativar os nociceptores A-δ e C a liberarem neuropeptídeos tais como a substância P, que pode, por sua vez, estimular tanto mastócitos locais a liberar histamina quanto leucócitos para liberarem NO, PGE2, PAF e LT, substâncias tais que ativariam os nociceptores (NOBACK et al., 1999).

A liberação neurogênica dos peptídeos e de outros conteúdos vesiculares pode desencadear respostas não inflamatórias como a secreção e contração do músculo liso, e tem sido relacionada com a atividade aferente tônica basal, que atua na manutenção trópica de tecidos alvos ou a regulação visceral do tônus e fluxo sanguíneo. Entretanto, sob circunstâncias patológicas, a liberação excessiva de peptídeos neurogênicos liberados pelos nervos sensoriais contribui para a inflamação crônica associada com a asma, doenças inflamatórias intestinais, artrite, entre outras (CAMPBELL, 1993, LUNDBERG, 1993).

1.5.5.2- Localização dos neuropeptídeos

Os neuropeptídeos são altamente distribuídos no sistema nervoso central (SNC) bem como nos nervos periféricos, e atuam como neurotransmissores para regular várias funções fisiológicas. Vários neuropeptídeos do SNC atuam em sítios específicos no cérebro que controlam funções gastrintestinais através do sistema nervoso autônomo (SNA). TACHÉ et al., (1980a;1980b) foram os primeiros que reportaram o efeito central dos neuropeptídeos na regulação das funções gástricas e desde então, mais de 40 peptídeos têm sido examinados, e tem sido bem estabelecido que alguns neuropeptídeos como o hormônio liberador de tirotropina (TRH), fator liberador de corticotropina (CRF), neuropeptídeo Y (NY) e somatostatina (SOM), mediam a estimulação ou inibição da função gastrintestinal induzida pelo SNC (YONEDA et al., 2001).

1.5.5.3- As taquicininas

1.5.5.3.1- Origem e seus receptores

As taquicininas compõem uma família de peptídeos que possuem uma sequência C-terminal Fe-X-Gli-Leu-MetNH₃. Foram assim denominadas por produzir rápida contração de vísceras de animais, em oposição à bradicinina (ROCHA e SILVA, 1949), um peptídeo de origem plasmática, que provoca contração intestinal de

desenvolvimento lento (VON EULER e GADDUM, 1931). A família taquicinina dos neuropeptídeos inclui substância P (SP), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB). As taquicininas interagem com três receptores de neurocininas acoplados a proteínas G (NK1-R, NK2-R e NK3-R) com diferentes afinidades; sendo que a substância P liga-se preferencialmente ao receptor NK1, enquanto a NKA e NKB ligam-se preferencialmente aos receptores NK2 e NK3, respectivamente (HELKE et al., 1990; ONKUBO e NAKANISHI, 1991; REGOLI et al., 1989; MAGGI, 1995).

1.5.5.3.2- Localização de receptores de taquicininas no TGI

SP e NKA são normalmente co-expressados e são encontrados em altas concentrações nos sistemas nervoso central e periférico (OTSUKA e YOSHIOKA, 1993), entretanto NKB é confinado na maior parte no sistema nervoso central. Sítios ligantes para todos os três peptídeos estão presentes no cérebro e na espinha dorsal; entretanto foram encontrados apenas sítios para SP e NKA no trato gastrintestinal (TGI) (GRADY et al., 1996). O RNA mensageiro (mRNA) para NK1-R é expressado em níveis relativamente altos no SNC e no TGI; O mRNA para NK2-R é encontrado mais confinado aos órgãos periféricos, e o mRNA para NK3-R é mais encontrado no SNC (TSUCHIDA et al., 1990). NK1-R foi detectado em neurônios mientéricos e da submucosa do duodeno, jejuno, íleo e cólon, e em neurônios mientéricos do estômago (GRADY et al., 1996); NK2-R foi detectado na muscular externa do estômago, intestino delgado e cólon; NK3-R foi detectado em neurônios do TGI de ratos (GRADY et al., 1996).

1.5.5.3.3- Síntese, liberação e degradação das taquicininas

As taquicininas são sintetizadas pelos ribossomos no nível do corpo celular neural, armazenadas em grandes vesículas secretórias densamente coradas (LDV) e axonalmente transportadas para o terminal nervoso por meio de processo enzimático (BRIMIJOIN et al., 1980).

A liberação de SP e NKA é dependente do influxo de cálcio extracelular em resposta a um estímulo despolarizante. A liberação de ambas as substâncias também pode ocorrer após a aplicação da capsaicina e vários agentes inflamatórios como a histamina e a bradicinina (GEPPETTI et al., 1990).

As taquicininas são degradadas por enzimas teciduais específicas, as peptidases, presentes na membrana ou no citosol neural. O processo de recaptação parece não ser importante no término de ação das taquicininas, contribuindo apenas com a remoção de fragmentos (NAKATA et al., 1981).

1.5.5.3.4- Ações farmacológicas da taquicinina substância P

A SP é considerada uma séria candidata a mediadora da função efetora local dos neurônios aferentes primários (HARRISON e GEPPETTI, 2001). *In vitro*, SP sinaliza a ativação da transcrição pró-inflamatória do fator nuclear, o fator- κ B, (MARRIOTT et al., 2000) e ativa células imunes para produzirem citocinas (RAMESHWAR *et al.*, 1994). A SP está freqüentemente presente num mesmo neurônio com o CGRP, e a liberação de SP pode causar a co-liberação de CGRP, ou, adicionalmente, mais SP (WALLENGREN e HAKÁNSON, 1987). Ela é encontrada nas fibras da derme e epiderme, glândulas sudoríparas, em corpúsculos de Meissner, nervos perivasculares e células de Merkel (KALIL-GASPAR, 2003). Pode, ainda, ser sintetizada em células do sistema imune, como monócitos, mastócitos e eosinófilos (LOTTI e col., 1995; ZANCANARO et al., 1999; JOHANSSON et al., 1999). A SP estimula a proliferação de células da musculatura lisa arterial e de fibroblastos (NILSSON *et al.*, 1985; KATAYAMA e NISHIOKA, 1997; CROWE et al., 1994), regula a expressão gênica do fator de crescimento básico de fibroblastos (JIANG et al., 2004), a proliferação de células endoteliais e a neovascularização *in vivo* (PARENTI et al., 1996; WIEDERMANN *et al.*, 1996). Ela é um dos mais potentes vasodilatadores conhecidos, sendo cem vezes mais potente que a histamina (FOREMAN, 1987); ela libera óxido nítrico das células endoteliais (BULL *et al.*, 1996) e exerce vasodilatação via ativação de receptores NK1 (WEIDNER et al., 2000; CAO et al., 1999). Ela é reportada contribuir na excitabilidade do hipocampo e em estados

epilépticos ao promover a liberação do GABA, o qual inibe as fibras pré-ganglionares simpáticas ao se ligar ao seu receptor GABA (B), presente nestas fibras (BROUILLETEE e COUTURE, 2002).

Além disso, a SP tem sido reportada por atuar como um peptídeo com potencial apoptótico em um sistema livre de células (DEL RIO et al., 2001), estar envolvida na apoptose induzida pelo cainato, um receptor de glutamato, em neurônios do hipocampo (LIU et al., 1999) e induz a formação de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos humanos via produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio pela NADPH oxidase dependente de calmodulina, e pela geração de NO pela eNOS (STERNER-KOCK et al., 1999).

Ela é o principal mediador responsável pelo aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, pelo extravasamento de proteínas plasmáticas e formação de edema na pele de roedores e humanos (XU et al., 1992). Sugere-se que estes efeitos sejam devidos à estimulação direta dos receptores NK1, localizados nas células endoteliais das vênulas pós-capilares, ou pela ativação de mastócitos, através da interação de cargas iônicas entre estes que levaria à liberação de histamina e 5-HT (BRAIN e WILLIAMS, 1989) ou pela ativação direta devido à presença de receptores Nk1 de taquicininas nos mesmos (OGAWA et al., 1999).

1.5.5.3.5- Antagonistas de receptores de taquicininas

Com o desenvolvimento e síntese de antagonistas não-peptídicos com potentes ações seletivas para os receptores NK1, como o SR140333, e para o receptor NK2, SR48968, (GARRET et al, 1991; EDMONDS-ALT et al, 1992), mostrou-se em estudos *in vivo* que o SR140333, mas não o SR48968, reduz significativamente o extravasamento plasmático induzido por estimulação térmica e antidrômica na pele de ratos, bem como aquele induzido pelo GR73632, agonista de receptores NK1 (TOWLER e BRAIN, 1998). Trabalhos usando antagonistas de receptor NK1 ou ratos geneticamente deficientes de receptor NK1 têm indicado um papel maior para esse receptor na asma, bronquite crônica, inflamação intestinal, pancreatite, artrite e resistência à infecção (KINCY-CAIN e BOST, 1996; QUARTANA e MAGGI, 1998; HARRISON e GEPPETTI, 2001).

BANG et al., (2003) mostraram que o uso de antagonistas de receptor NK1 (CP 96,345 e L-733,060) preveniu doença inflamatória do fígado pela inibição da ativação do fator nuclear, fator- κ B, devido à supressão da síntese pró-inflamatória e pelo aumento concomitante da produção de citocinas hepatoprotetoras, como também, mostrou que o uso desses antagonistas preveniu *in vivo* a apoptose hepatocelular induzida por CD-95 e TNFR-1 (BANG et al., 2004).

1.5.5.3.6- Contribuição da substância P no fluxo sanguíneo gástrico

GINAP e KILBINGER (1997) sugerem que as taquicininas liberadas pelo sistema nervoso entérico regulam a secreção de serotonina (5-HT) em células enterocromafins do íleo de cobaias. A substância P e a neurocinina A estão abundantemente presentes nos neurônios aferentes primários do estômago (GREEN e DOCKRAY, 1987). A SP estimula o extravasamento de plasma no TGI e no pâncreas de ratos por interagir com o receptor NK-1 (FIGINI et al., 1997). Além disso, tem sido mostrado que ela agrava a lesão gástrica induzida pelo etanol em ratos saudáveis (KARMELI et al., 1991). HEINEMANN et al. (1996;1997) mostraram que a taquicinina reduz o fluxo sanguíneo gástrico pela ativação do receptor NK1 e inibe a resposta hiperêmica em resposta ao estímulo com ácido, por intermédio de um mecanismo mediado pelo receptor NK3. Adicionalmente, na inflamação crônica da mucosa gástrica, as taquicininas endógenas podem ganhar significância patogênica como inibidores da hiperemia protetora da mucosa (HEINEMANN et al., 1996).

1.5.5.4- Peptídio relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)

Peptídio relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) possui 37 aminoácidos e é codificado pelo mesmo gene que o hormônio da calcitonina (AMARA et al., 1984). O CGRP é encontrado na inervação da derme, epiderme, glândulas sudoríparas, em corpúsculos de Meissner, nervos perivasculares e células de Merkel (LOTTI et al., 1995; ZANCANARO et al., 1999; JOHANSSON et al., 1999). Pode ser liberado junto com a SP,

mas sua ação é mais lenta, progressiva e de maior duração (WALLENGREN, 1997) induzindo uma intensa vasodilatação em pequenos e grandes vasos (SCHOLZEN et al., 1998). Dois receptores específicos já foram propostos, CGRP1R e CGRP2R, ambos acoplados à proteína G (AIYAR et al., 1996; LUEBKE et al., 1996; NAGHASHPOUR et al., 1997).

O CGRP é conhecido como pró-inflamatório e vasodilatador, mas paradoxalmente pode atuar de forma antiinflamatória sobre a resposta imune celular (KALIL-GASPAR, 2003). Como próinflamatório, ele potencializa a formação de edema induzido pelas IL-1 e IL-8, aumenta a expressão e síntese de IL-8 em células endoteliais (ANSEL et al., 1997), é quimiotático para neutrófilos (CAPUGGI et al., 1990) e aumenta a translocação de selectina P e a expressão de ELAM-1 (BULL et al., 1996). O CGRP estimula, ainda, a proliferação de células endoteliais (CAO et al., 1999; HAEGERSTRAND et al., 1990) e de melanócitos *in vitro* (HARA et al., 1996).

Como antiinflamatório, entretanto, o CGRP é capaz de inibir muitas das funções das células de Langerhans. Usando-se a linhagem de células de Langerhans XS52, demonstra-se que o CGRP eleva o AMPc e aumenta a síntese e liberação de IL-10 induzidas pelo lipopolissacarídio bacteriano (LPS) e GM-CSF (resultando em inibição de B7-2). Nessas células, ele ainda suprime a indução de IL-12 e IL- β pelo LPS e GM-CSF (TORII et al., 1997a, b, c, d).

O CGRP inibe também a atividade de células *natural –killer* (UMEDA, 1992) e a proliferação de células T, diminui a produção de IL-2 e a expressão de TNF- α , TNF- β e IFN-gama (WANG et al., 1998). Ele também é capaz de bloquear as ações promotoras de edema da histamina, leucotrieno B4 e serotonina na pele humana (RAUD et al., 1991)

1.5.5.5- Peptídio vasoativo intestinal (VIP)

O peptídio vasoativo intestinal (VIP) é membro da mesma família à qual também pertencem a secretina, glucagon, gastrina, polipeptídio ativador da adenilato-ciclase pituitária (PACAP) e peptídio inibidor gástrico. Junto com o CGRP e o

peptídio histidina-metionina (PHM), o VIP é um dos mais abundantes peptídios (MISERY, 1997), coexistindo com a acetilcolina em fibras parasimpáticas pós-ganglionares, e sendo encontrado também no suor (WALLENGREN, 1997). Estudos comprovam que a liberação de VIP e acetilcolina pode ser independente e condicionada à frequência de estimulação da fibra nervosa (HARTSCHUH et al.,1983). O VIP é liberado na inervação da derma e epiderme, folículos pilosos, glândulas sudoríparas, células de derme, e em nervos perivasculares (LOTTI et al.,1995; HARTSCHUH et al.,1983). Mastócitos, polimorfonucleares e eosinófilos também são fontes de VIP (LOTTI et al.,1995). O VIP induz relaxamento da musculatura lisa de vasos sanguíneos (WALLENGREN, 1997; NILSSON e MAEPEA, 1987). Mastócitos respondem ao VIP com rápida liberação de histamina (independente de IgE). Outros estudos mostram que ele é capaz de inibir a produção de IgA e atuar sobre células de Langerhans, aumentando o AMPc e inibindo a função apresentadora de antígeno (LOWMAN et al.,1988; STANISZ et al.,1988; TAYLOR et al.,1994).

1.5.5.6- Polipeptídio ativador de adenilato-ciclase pituitária (PACAP)

Peptídio pertencente à mesma família do VIP, originalmente isolado no hipotálamo ovino e caracterizado como potente ativador da adenilato-ciclase de células cultivadas da hipófise anterior, participando na regulação da produção e secreção de hormônios pela glândula pineal, glândula tireóide, TGI e pâncreas, além de indutor de vasodilatação endotélio-independente (NARITA et al., 1996; WARREN et al., 1992; MAY e BRAAS, 1995; DORNER et al.,1998; BLOOM, 1992). Ele coexiste com o VIP (e ocasionalmente com o neuropeptídio Y) em fibras parassimpáticas, ou com a SP e CGRP em fibras C (STEINHOFF et al., 1999; ODUM et al., 1998).

1.5.5.7- Neuropeptídio Y (NPY)

Peptídio pertencente à mesma família do peptídio tirosina-tirosinamida e do polipeptídio pancreático (LOTTI et al., 1995; WALLENGREN, 1997). A maioria dos estudos realizados, até o momento, com o NPY, concentra-se no sistema nervoso central, no qual o NPY se mostra envolvido quanto ao estímulo à ingestão de alimentos e água, à

regulação do humor e ao controle central do sistema nervoso autônomo. Na periferia, ONPY está envolvido na manutenção do tono vascular, produzindo ação vasoconstrictora longa e potente. Possui vários receptores já isolados, especialmente os receptores Y1 e Y2, já descritos com detalhes e ligado à proteína G (HASHIM e TADEPALLI, 1995). Ele coexiste com a NA nas fibras simpáticas e com o VIP numa subpopulação de fibras parassimpáticas. A liberação do NPY é maior após estímulos de alta frequência, enquanto a liberação de NA é maior após estímulos baixa frequência. Ele é normalmente considerado um potencializador dos efeitos da adrenalina e da NA (SUNDLER et al., 1986), modulando a neurotransmissão adrenérgica por mecanismo endotélio-dependente (DALY e HIEBLE, 1987). A presença de NPY causa vasoconstricção longa e potente de artérias e arteríolas, mas não do sistema venoso (LOTTI et al., 1995; WALLENGREN, 1997). Essa vasoconstricção não é antagonizada por alfa-bloqueadores (ZUKOWSKA-GROJEC et al., 1987), evidenciando o NPY como um provável responsável pelo componente vasoconstrictor simpático-resistente aos alfa-bloqueadores (EDVINSSON et al., 1983).

1.5.5.8- Somatostatina (SOM)

O peptídeo SOM foi originalmente isolado no hipotálamo, assim denominado devido à capacidade de inibir a liberação de hormônio do crescimento. Cinco receptores já foram identificados (SSTR1 a 5), todos eles acoplados à proteína G. (HOYER *et al.*, 1995; LOPEZ et al., 1996). É um potente inibidor da proliferação celular, e é capaz de liberar histamina de mastócitos via AMPc (LOTTI et al., 1995; MONTMINY et al., 1996, ABRALDES e BOSCH, 2002b).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Encontrar uma maneira de amenizar as alterações clínicas presentes no quadro de hipertensão portal tem sido um desafio para prolongar a sobrevida dos pacientes cirróticos que aguardam um transplante de fígado. A GHP é uma doença causada pelas diversas alterações hemodinâmicas e mecânicas, decorrentes do aumento da pressão portal. Tais alterações são mediadas pela ação de substâncias vasoativas liberadas na circulação sistêmica e resultam no comprometimento de importantes mecanismos de defesa da mucosa gástrica. O uso do modelo experimental de hipertensão portal adequado é fundamental para que os achados experimentais permitam aproximar ou reproduzir os aspectos morfológicos encontrados na doença em humanos, com progressão gradual e discreta das alterações patológicas e apresentar alta reprodutibilidade e baixa mortalidade. Por isso, o presente trabalho utilizou os modelos experimentais de estenose calibrada de veia porta e a ligadura do ducto biliar comum para induzir hipertensão portal não-cirrótica e cirrótica, respectivamente, visando avaliar o comportamento da mucosa gástrica hipertensiva portal perante os estímulos lesivos com agentes agressores, e o papel de alguns dos principais mediadores vasoativos endógenos envolvidos nos mecanismos de defesa da mucosa.

2.2- Objetivos Específicos

Examinar a contribuição da hipertensão portal cirrótica e não-cirrótica e do pH intragástrico na resistência da mucosa gástrica perante o estímulo lesivo com o etanol.

Estudar o papel do óxido nítrico na etiologia da gastropatia hipertensiva portal, bem como a sua interação com as ETs e PGE₂ na defesa da mucosa gástrica hipertensiva portal perante o estímulo lesivo com o etanol.

Estudar os efeitos das endotoxinas sobre a integridade da mucosa gástrica na presença de hipertensão portal e disfunção hepática.

Avaliar o envolvimento dos neurônios sensoriais na etiologia da gastropatia hipertensiva portal

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Procedência dos animais utilizados

Os testes farmacológicos realizados neste trabalho foram conduzidos com o emprego de ratos Sprague Dawley ou Wistar machos adultos (180-250 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp, Campinas, SP). Os animais foram acomodados em estante climatizada para animais de pequeno porte. O acondicionamento permitido foi de quatro animais por gaiola, as quais continham água, ração específica *ad libitum* e maravalha. As gaiolas foram higienizadas três vezes por semana, com troca dos animais. Dependendo do protocolo experimental, os mesmos foram mantidos conscientes ou anestesiados de forma apropriada com pentobarbital sódico e/ou halotano, e submetidos a jejum de 18h e com livre acesso à ingesta de água.

Todos os estudos experimentais foram realizados sob a aprovação do Comitê de Ética de Pesquisas em Animais da FCM – Unicamp, de acordo com o protocolo 376-1 (ver ANEXO 2).

3.2- Indução da hipertensão portal

3.2.1- Estenose calibrada da veia porta

A veia porta foi isolada sob anestesia gasosa com halotano e a estenose calibrada criada através de ligadura simples com fio de sutura de algodão 4-0 ao redor de agulha calibre 20 com bisel removido para evitar punção acidental, colocada sobre a veia porta. A estenose calibrada foi obtida após a retirada da agulha pós-ligadura (CALATAYUD et al., 2001a). Animais controles foram submetidos ao mesmo tipo de cirurgia, com exposição e manipulação da veia porta, mas sem ligadura da mesma. Os animais foram utilizados em experimentos de câmara gástrica *ex vivo* duas semanas após a cirurgia, quando apresentavam hipertensão portal não-cirrótica e sem disfunção hepática.

3.2.2- Ligadura e ressecção do ducto biliar

O ducto biliar comum foi isolado após laparotomia mediana, sob anestesia gasosa com halotano, seguido de ligadura proximal e distal ao fígado com fio de algodão 4-0 e com distância de aproximadamente 5 mm entre as ligaduras. O ducto foi então ressecado entre as ligaduras para evitar reconecção biliar (FERRAZ et al., 1995; BECK et al., 1992). Animais controles foram submetidos ao mesmo tipo de cirurgia, com exposição e manipulação do ducto biliar, mas sem ressecção ou ligadura do mesmo. Os animais desenvolveram cirrose hepática biliar secundária após quatro semanas, quando foram utilizados nos experimentos de câmara gástrica. A análise histológica hepática revelou cirrose micronodular, acentuada proliferação e necrose de ductos biliares. Icterícia, ascite (20% dos animais) e hipertensão portal acompanhada de aumento nos níveis séricos de bilirrubinas, fosfatase alcalina e transaminases são obtidos de forma uniforme e reprodutível (LAMBRECHT et al., 1993, FERRAZ et al., 1995; FERRAZ et al., 1996).

3.3- Preparação de câmara gástrica *ex vivo* e protocolo experimental

A câmara gástrica *ex vivo* foi preparada em animais anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p. para animais controle e estenose calibrada de porta e 30 mg/kg i.p. para animais cirróticos). O estômago foi exposto através de laparotomia mediana e o piloro ligado com fio de algodão 4-0. Em seguida, o estômago foi tracionado a partir da camada não glandular da grande curvatura com pinça 0.8 mm e aberto através da grande curvatura com o cuidado de evitar secção do suprimento arterial gástrico. A hemostasia da borda da secção gástrica foi realizada através de eletrocautério portátil (Harvard Apparatus, EUA). O estômago foi então colocado sobre uma plataforma de acrílico especialmente desenhada para esse tipo de preparação, e fixo com alfinetes sobre essa mesma plataforma. Um cilindro de acrílico foi então colocado sobre a mucosa gástrica, posteriormente fixo, que permite o banho da mucosa gástrica com soluções de interesse. Essa preparação permite a manutenção do suprimento sanguíneo e controle neural e motor gástrico. Os animais são mantidos em uma cama de acrílico aquecida por cobertor elétrico (Harvard Apparatus, EUA) em temperatura de 37°C controlada por meio de termômetro

intra-retal (Harvard Apparatus, EUA). A solução de banho é mantida sob agitação constante a 200 r.p.m. através de misturador eletrônico a fim de evitar a camada de pH alcalino justa mucosa. O protocolo experimental foi composto de seis períodos de 10 minutos cada. A mucosa foi banhada com solução salina durante os dois períodos iniciais (20 min), seguida de um período de 10 min no qual a mucosa foi banhada pelo etanol, após o qual a mucosa foi banhada por solução ácida (HCl 100 mM, pH=1.5 ou 2) nos três períodos finais (30 min). As soluções foram aplicadas sobre a mucosa com temperatura de 37°C. Ao final de cada experimento, a mucosa gástrica foi fotografada (Figura 1) e as áreas de lesões hemorrágicas foram medidas através de planimetria computadorizada (FERRAZ et al., 1997a).



Figura 1- Câmara gástrica

3.4- Medida do fluxo sanguíneo gástrico

A medição do fluxo sanguíneo gástrico sobre tempo foi realizada através do uso de fluxometria por laser-Doppler (Transonic, EUA) e probe do tipo lápis (Transonic, EUA) em animais submetidos à preparação de câmara gástrica *ex vivo*. Essa técnica permite a medida de fluxo sanguíneo até uma profundidade de 1 mm e os animais foram mantidos em plataforma antivibratória e com o probe (Foto 2) fixo sobre o corpo gástrico mediante o uso de micromanipulador mecânico (Harvard Apparatus, EUA).

O fluxo sanguíneo da mucosa gástrica captado pelo probe foi digitalizado (Transonic, EUA), capturado e gravado utilizando software específico em microcomputador com sistema operacional Windows. O protocolo experimental utilizado foi semelhante ao de câmara gástrica descrito anteriormente, exceto pela ausência da agitação constante a 200 r.p.m. através de misturador eletrônico.

Após 15 minutos de equilíbrio da preparação, deu-se início à gravação dos dados. Os animais foram, então, pré-tratados ou tratados com os diversos reagentes/agonistas de acordo com cada protocolo de investigação descrito a seguir.

As respostas máximas de fluxo sanguíneo foram obtidas a partir dos dados numéricos capturados pela aquisição digital. As respostas foram então calculadas e expressas como porcentagem de variação sobre o fluxo sanguíneo basal obtido nos 10 minutos iniciais. Essa técnica de medição do fluxo sanguíneo é útil para a monitoração de mudanças no fluxo sobre tempo, não sendo adequada para medição de fluxo sanguíneo absoluto (FERRAZ et al., 1996).

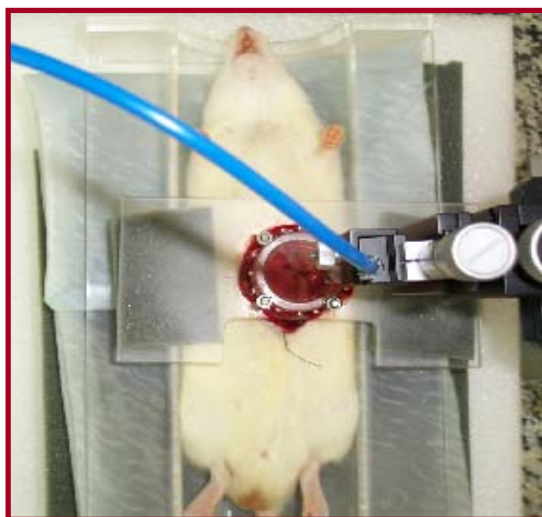


Figura 2- Medida de fluxo sanguíneo

3.5- Medida da pressão arterial média

A medida da pressão arterial média (PAM) dos animais utilizados nos diversos grupos experimentais foi realizada em animais não-anestesiados por meio do uso de sistema de medição de pressão caudal digital (Rat Tail Blood Pressure Monitor, Harvard Apparatus, EUA) e registrada em papel (Harvard Apparatus, EUA) e expressa de forma habitual em mm Hg.

3.6- Medida da pressão portal (PP)

Os animais foram previamente anestesiados, como descrito na seção 3.3. Em seguida, foi feita uma laparotomia mediana nos animais, e uma agulha 27-G conectada a um tubo PE-20 foi introduzida dentro da veia mesentérica superior, a 1cm de distância da veia porta. A seguir, o tubo foi conectado a um transdutor de pressão (Transonic, EUA). A pressão portal foi captada pelo transdutor e gravada por um período de 5 minutos, logo após 5-10 minutos de estabilização prévia, utilizando software específico em microcomputador com sistema operacional Windows. As respostas da PP foram obtidas a partir dos dados numéricos capturados pela aquisição digital, calculadas e expressas em mmHg.

3.7- Tratamentos

3.7.1- Tratamento crônico com L-NAME

Após 14 dias da cirurgia de ligadura do ducto biliar comum, os ratos cirurgiados e os seus respectivos controles, foram tratados por um período de 14 dias, com inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME) ou veículo (RIBEIRO et al., 1992). O início do tratamento foi imediato para animais submetidos à cirurgia de estenose calibrada da veia porta.

O L-NAME foi dissolvido na água de beber em concentração de 1.8 mM de forma a atingir a dose diária de 75 μ mol/rato/dia (20mg), com o objetivo inicial de elevar a pressão arterial sistêmica dos animais cirróticos a níveis observados em animais normais.

A inibição prolongada da enzima óxido nítrico sintase foi realizada pelo período de duas semanas, visto que este período de tempo foi sugerido como sendo o de melhor inibição, conforme BRICOLA et al., (2003). Além disso, esse período de tratamento ainda não foi relatado para protocolos experimentais envolvendo animais portadores de hipertensão portal.

3.7.2- Tratamento agudo com indometacina

Os ratos cirróticos e seus respectivos controles que foram tratados cronicamente com L-NAME (como descrito na seção anterior), receberam uma dose aguda do inibidor da síntese dos prostanóides (indometacina: 20 mg/kg, V.O.) ou do veículo (NaHCO₃) após 18-20 horas de jejum (FERRAZ et al., 1996). Após um período de 3 horas, desde a administração aguda da indometacina, os animais foram submetidos aos protocolos da câmara gástrica ou fluxometria por laser doppler.

3.7.3- Tratamento agudo e crônico com endotoxina

A endotoxemia aguda (dose única de LPS) ou crônica (dose repetida de LPS por 4 dias consecutivos) foi induzida em animais controles ou submetidos à estenose calibrada da veia porta através da administração intraperitoneal de endotoxina obtida de *Escherichia coli* (0.3, 1.0 e 3.0 mg/Kg), enquanto os controles receberam administração intraperitoneal de solução salina.

As lesões de mucosa e a resposta da microcirculação gástrica induzidas pela aplicação tópica de etanol foram avaliadas 6 horas após a última dose da endotoxina (FERRAZ et al., 1997b), utilizando os protocolos experimentais de câmara gástrica e fluxometria por laser doppler, descritos anteriormente.

3.7.4-Tratamento agudo com os agonistas e antagonistas dos receptores ETA e ETB de endotelinas

O tratamento agudo com os antagonistas de receptor ETB (BQ 788: 0.1mg/Kg; FUKURODA et al., 1994) e de receptor ETA (BQ 485: 0.1 mg/Kg; MACLEOD et al, 1993) ou com os agonistas de Endotelina- 1 ou -3 (0,5 nmol/Kg: LISS et al., 2003) foi realizado através da injeção intravenosa, 3 minutos antes do estímulo da mucosa gástrica com a solução de etanol, durante os protocolos experimentais de câmara gástrica e de medida de fluxo sanguíneo, descritos anteriormente.

3.7.5-Tratamento neonatal com capsaicina

O tratamento neonatal dos animais com capsaicina (50mg/kg) ou veículo (1:1:8; Etanol; Tween80; NaCl) foi feito através da injeção subcutânea no segundo dia de vida, em ratos machos da linhagem wistar (JANCSÓ et al., 1977). Após o período entre 60 e 90 dias, os ratos foram submetidos à cirurgia de ligadura do ducto biliar, como descrita previamente.

3.7.6-Tratamento agudo com o antagonista de receptor de taquicininas NK1

O tratamento agudo com o antagonista de receptor de taquicininas A 5330 (5mg/Kg) foi feito através da injeção intraperitoneal 30 min antes da realização dos protocolos experimentais no grupo de animais cirróticos (BANG et al, 2004).

3.8- Determinação de nitritos nas soluções de banho

A dosagem dos nitritos nas soluções de banho da mucosa gástrica (PBS, EtOH e HCl) de animais Ctrl e BDL, foi realizada segundo o método descrito por GRIESS (1879).

3.9- Determinação protéica gástrica

As amostras de tecido gástrico de todos os grupos foram homogeneizadas e acondicionadas a -80°C na presença de indometacina ($10\mu\text{g/ml}$). Posteriormente, as amostras foram descongeladas, centrifugadas a 9000 rpm, em uma centrífuga para eppendorf, por 20 min, a 4°C . O sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado. De acordo com o método de BRADFORD (1976), cerca de 20 μl do sobrenadante foi adicionado a 1ml do reagente do biureto (LABORLAB). Deixou-se reagir por 20 min. Em seguida, as amostras foram lidas a uma absorbância de 540nm.

3.10-Extração e quantificação da concentração gástrica de endotelinas 1 e 3

As amostras de tecido gástrico de todos os grupos foram homogeneizadas e acondicionadas com Trasylol ($20\mu\text{g/ml}$) a -80°C . Posteriormente, as amostras foram descongeladas, centrifugadas a 9000 rpm, em uma centrífuga para eppendorf, por 20 min, a 4°C . O sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado. Os sobrenadantes foram então acidificados com HCl 2N, novamente centrifugadas, e em seguida, aplicados às colunas C18 (6CC 500mg; Waters), previamente equilibradas com acetonitrila 100%.

Para o processo de extração foram utilizados os tampões “A” (TFA 1%, H_2O 99%) e “B” (TFA 1%, Acetonitrila 60 %, H_2O 39 %) como solvente orgânico eluente das amostras. A dosagem de endotelinas 1 e 3, na mucosa gástrica, foi realizada de acordo com o Kit de Elisa para ET-1 e ET-3 da Península Laboratories (S 1157 e S 1207, respectivamente).

3.11- Extração e quantificação da concentração gástrica de PGE_2

As amostras de tecido gástrico de todos os grupos foram homogeneizadas e acondicionadas na presença de indometacina ($10\mu\text{g/ml}$) a -80°C .

Posteriormente, as amostras foram descongeladas, centrifugadas a 9000 rpm, em uma centrífuga para eppendorf, por 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado. Os sobrenadantes foram então acidificados com HCL 2N, em seguida aplicados às colunas C18 (6CC 500mg; Waters), previamente equilibradas com etanol PA e H₂Od. Para o processo de extração foram utilizados hexano como dislipidiante, e o acetato de etila como solvente orgânico eluente das amostras. A dosagem de prostaglandinas na mucosa gástrica foi realizada de acordo com o Kit de Elisa para PGE₂ da R&D Systems (DE0100).

3.12- Reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa (RT- PCR)

Amostras de estômago de animais controle (n=6), BDL (n=6) e PVS (n=6) foram removidas, imediatamente acondicionadas com o reagente Trizol (5 ml/g de amostra, GIBCO BRL, EUA) e mantidos a -80°C até o processamento das amostras.

3.12.1 - Extração do RNA total

O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (5 ml/g de amostra, GIBCO BRL, EUA). As amostras de estômago foram homogeneizadas em Trizol, e após 5 min, foi adicionado 1 ml de uma solução de clorofórmio / álcool isoamílico (1 parte de álcool isoamílico em 24 partes de clorofórmio) para cada 5 ml de Trizol. Após agitação vigorosa para a extração dos lipídios, os eppendorfs foram deixados 10 min em repouso e posteriormente centrifugados a 12000 g, em uma centrífuga para eppendorf, (15 min a 4°C).

A fase aquosa sobrenadante (600 µl) foi separada e o RNA precipitado pela adição de 500 µl de isopropanol. Após 10 min a temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (12000 g, 10 min a 4°C). Os sobrenadantes foram descartados e o pellet de RNA foi lavado com 500 µl de etanol 95%. Após centrifugação (7500 g, 5 min a 4°C), os sobrenadantes foram desprezados e os tubos foram invertidos e apoiados sobre papel de filtro aos efeitos de eliminar restos de etanol. O mesmo procedimento foi feito com etanol 75%.

Posteriormente, o RNA foi dissolvido com 50 µl de água tratada com DEPC. Alíquotas desta solução foram diluídas 1:1000, as absorbâncias medidas a 260 nm e as concentrações de RNA total foram calculadas considerando a relação: 1 AU = 40 µg/ml. A integridade do RNA isolado foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (1 % em TAE contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, GIBCO BRL, EUA) e as bandas reveladas sob luz ultravioleta.

3.12.2- Transcrição do cDNA:

Cuidadosamente, 23 µl de H₂O (tratada com DEPC), 5 µl de oligo dT (GIBCO BRL, EUA) e 15 µg de RNA (amostra) foram misturados. A mistura foi aquecida 70°C durante 10 min e deixada posteriormente à temperatura ambiente durante 10 min. Na seguinte ordem, foram adicionados: 10 µl de tampão de reação (5X first strand buffer), 3.5 µl de dNTP (10 mM, Amersham, Inglaterra), 5 µl de DTT (0,1 M) e 1 µl de inibidor de RNases (RNaseOUT, Amersham, Inglaterra). A mistura foi aquecida a 42°C durante 2 min, posteriormente adicionou-se 1 µl da enzima RT (transcriptase reversa – MMLV, GIBCO BRL, EUA) e novamente aquecida a 42°C por 1 h. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 70°C durante 15 min e a 37°C por 2 min. As amostras foram mantidas a -20°C até serem submetidas ao PCR.

3.12.3- PCR:

Os primers utilizados (segundo as seqüências mostradas no quadro a seguir), foram diluídos a uma concentração de 500 pmoles/µl (solução estoque) com H₂O Milli-Q autoclavada.

Quadro 1- Sequência do primer, produto e referência

Nome	Sequência do primer (5' → 3')	Produto (bp)	Referência
iNOS	ACA ACA GGA ACC TAC CAG CTC A GAT GTT GTA GCG CTG TGT GTC A	651	FERRAZ et al., 1997
eNOS	GGA GAA GAT GCC AAG GCT GCT G CTT CCA GTC TCC AGA CGC ACC A	224	FERRAZ et al., 1997
GAPDH	CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC	400	FERRAZ et al., 1997
COX-1	CCT TCT CCA ACG TGA GCT ATC A TCC TTC TCT CCT GTG AAC TCC T	1.036	FERRAZ et al., 1997
COX-2	AGA CAG ATC ATA AGC GAG GAC C CAC TTG CAT TGA TGG TGG CTG T	1.158	FERRAZ et al., 1997
ET-1	GCT CCT GCT CCT CCT TGA TG CTC GCT CTA TGT AAG TCA TGG	471	DAVID et al., 2002
ET-3	GCT GGT GGA CTT TAT CTG TCC TTC TCG GGC TCA CAG TGA CC	477	TERADA et al., 1993

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µl que continha 2,5 µl de cDNA (amostra), 2,5 µl de tampão para PCR (10X), 0,75 µl de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µl de dNTPs (0,2 mM), 1,5 µl do primer 1 (0,5 µM), 1,5 µl do primer 2 (0,5 µM), 15,5 µl de H₂O Milli Q autoclavada e finalmente 0,25 µl de Taq polimerase (1 U, Ferramentas, EUA). O primer de GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como controle interno na mesma concentração.

Os ciclos de amplificação foram realizados com desnaturação por 5 min a 94°C seguido por 40 ciclos de amplificação consistindo dos seguintes passos: desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento dos primers a 65°C por 45 seg e extensão a 72°C por 1,5 min para as isoformas iNOS e eNOS; desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento dos primers a 65°C por 45 seg e extensão a 72°C por 1,5 min para COX-1 e COX-2; desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento dos primers a 57°C por 45 seg e extensão a 72°C por 1,5 min para ET-1 e ET-3. O RT-PCR para o GAPDH foi processado com 33 ciclos nas condições indicadas para as isoformas de COX. Após o último ciclo de amplificação, as amostras foram incubadas a 72°C por 10 min para extensão e finalmente 4°C por 15 min (Termociclador Personal T, Amersham, EUA).

3.12.4- Separação dos produtos de PCR

Alíquotas dos produtos da reação de PCR (aproximadamente 10 µl) previamente normalizadas para darem quantidades equivalentes do controle de GAPDH em todas as amostras foram submetidas a um gel de agarose 1,5% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio. Os géis foram visualizados sob luz UV e as imagens foram capturadas usando um detector de imagens (Chemimager 5500, Alpha-Inotech Corp., EUA). As intensidades das bandas marcadas com brometo de etídio foram determinadas por densitometria usando software específico, e o nível da expressão foi medida em % (tomando-se o controle como 100%) através da razão entre a intensidade da expressão de mRNA, mencionados acima pela intensidade da expressão de mRNA do controle interno GAPDH.

3.13-Análises histológicas

As análises histológicas do tecido gástrico foram realizadas por intermédio da coloração rotineira por Hematoxilina e Eosina (HE), a qual evidencia algumas características estruturais, mas não todos os componentes celulares.

Com relação às análises histológicas do fígado, estas foram realizadas por meio da coloração com o tricromo de Masson. Esta técnica de coloração é utilizada para diferenciar o colágeno do músculo liso em tumores e o aumento de colágeno em doenças como a cirrose, sendo uma coloração de rotina para biópsias de fígado e rins (CHO et al., 2004). O princípio geral da coloração do tricromo de MASSOM é descrito a seguir: o tecido é inicialmente corado pelo corante ácido, Biebrich Scarlat, o qual se liga a componentes acidófilos do tecido. Então, quando tratados com ácidos de fósforos, a menor permeabilidade dos componentes retém o vermelho, que se afasta do colágeno. Ao mesmo tempo, o reagente conecta-se ao colágeno, ligando-se com o azul de anilina.

Análise histológica pelo Masson/Resultados: o núcleo se cora de preto, citoplasma, músculos e eritrócitos de vermelho e o colágeno de azul.

3.14- Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados pelo teste de ANOVA de um critério seguido do teste de Student - Newman - Keuls para múltiplas comparações. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4- RESULTADOS

4.1- Área de lesão de mucosa gástrica em animais saudáveis e com hipertensão portal após a aplicação tópica de etanol (40%)

A aplicação tópica de etanol resultou em área de lesão ($20 \pm 3 \%$) no grupo de animais controles. A mesma aplicação tópica de etanol ocasionou um significativo aumento na área de lesão ($76 \pm 4 \%$), com presença de pontos hemorrágicos, na mucosa gástrica do grupo de animais BDL, mas ocasionou uma área de lesão reduzida ($p < 0.05$) no grupo de animais PVS, quando comparada a dos controles (Figura 3).

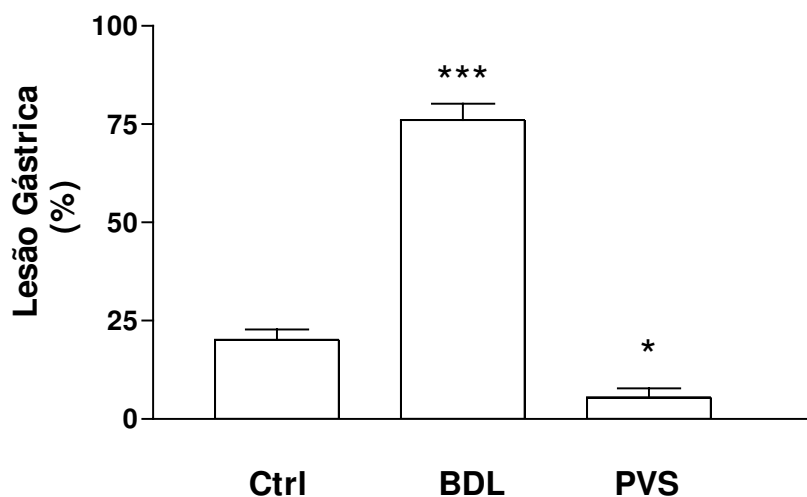


Figura 3 - Área de lesão gástrica induzida pela aplicação tópica de etanol (40%) na mucosa gástrica de animais saudáveis e com HP ($n \geq 5$).

4.2- Resposta da microcirculação gástrica à aplicação tópica de etanol 40% em animais saudáveis e com HP

A aplicação tópica de etanol na concentração de 40% resultou em uma redução da microcirculação gástrica em animais controles em torno de 25%, seguida de um aumento do fluxo sanguíneo ($102 \% \pm 4$) a partir do primeiro banho de HCl 100mM. Entretanto, o estímulo com etanol 40% não alterou o fluxo sanguíneo gástrico ($103 \% \pm 5$) no grupo de

animais BDL, o qual manteve-se constante, mesmo após a aplicação do primeiro banho de HCl 100mM ($104 \% \pm 3$) (Figura 3.2). Com relação ao grupo de animais com HP pura, o grupo PVS, observou-se que este grupo apresenta um fluxo sanguíneo mais elevado ($119 \% \pm 10$) quando comparado ao grupo de animais cirróticos e Ctrl. Além disso, o estímulo com etanol não causou qualquer alteração sobre o fluxo sanguíneo deste grupo (Figura 4).

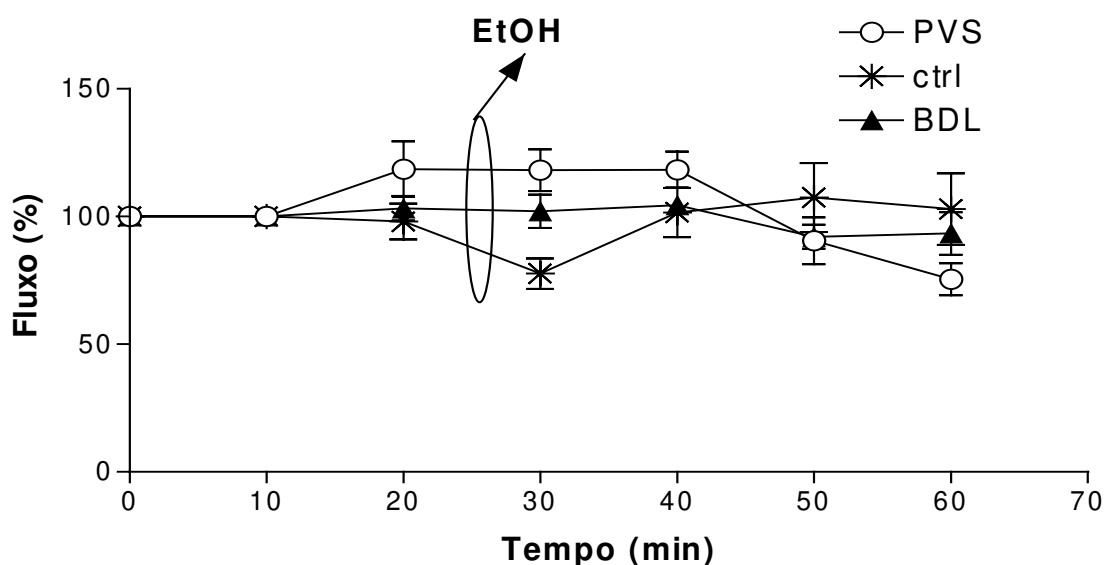


Figura 4- Resposta do fluxo sanguíneo gástrico de animais PVS, BDL e Ctrl ao estímulo lesivo com etanol (40%) ($n \geq 5$).

4.3- Medida da pressão portal (PP) de animais com PHG

Os animais submetidos às cirurgias de estenose calibrada da veia porta e ligadura do ducto biliar apresentaram pressão portal elevada quando comparado à pressão portal do grupo de animais Ctrl, após 14 e 28 dias de cirurgia, respectivamente (Figura 5).

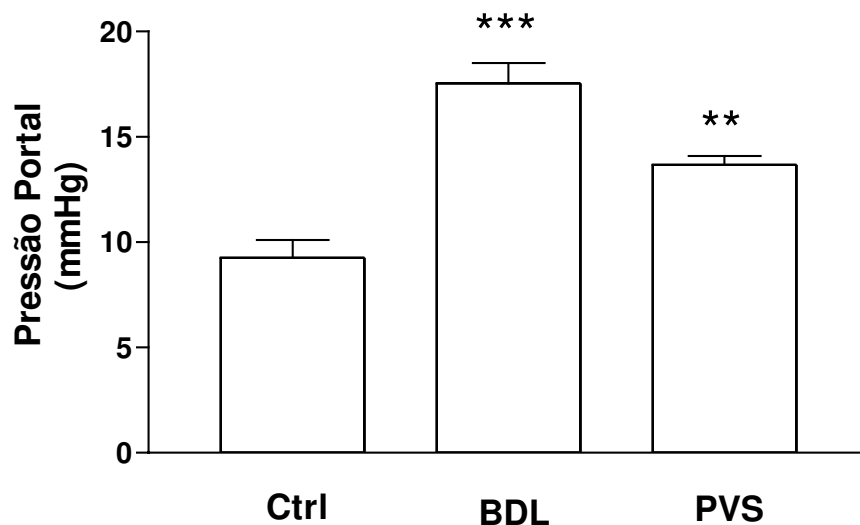


Figura 5- Pressão portal de animais Ctrl, BDL e PVS. *** $p < 0.001$ e ** $p < 0.01$ vs Ctrl (n=5).

4.4- Efeito da inibição prolongada da síntese de NO sobre a pressão arterial média

O tratamento cônico com L-NAME adicionado à água de beber por 14 dias produziu um aumento significativo (** $p < 0.01$) na pressão arterial média dos animais Ctrl, como esperado para este grupo (SVENTEK et al., 1996). Porém, o tratamento crônico com L-NAME não corrigiu o quadro de hipotensão arterial encontrado nos animais com HP (Figura 6).

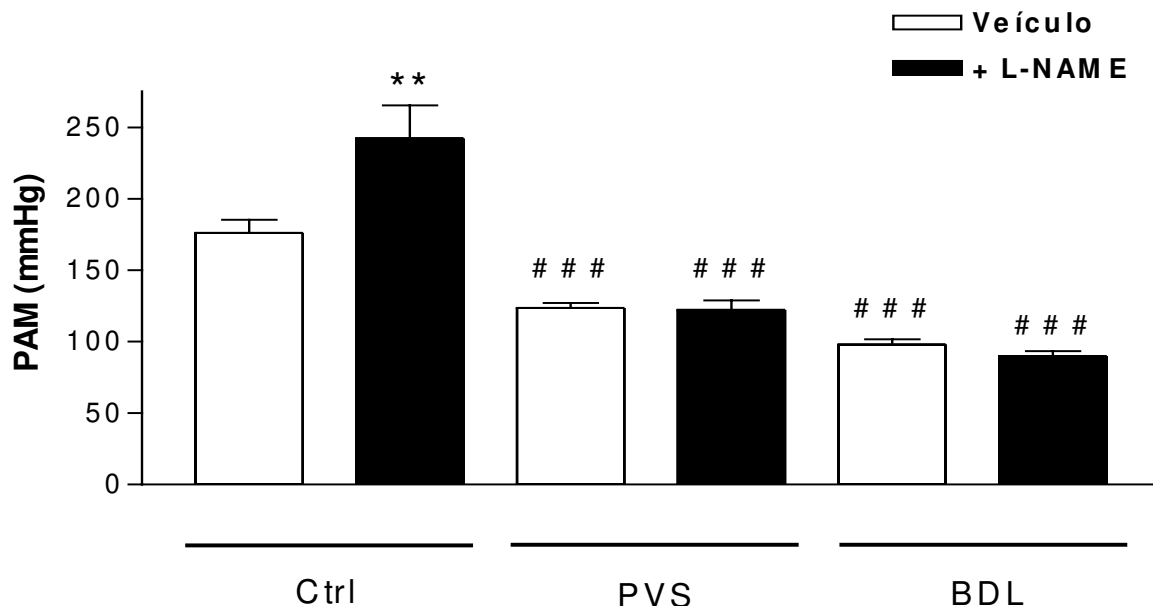


Figura 6- Pressão arterial média de animais Ctrl, PVS e BDL após o tratamento crônico (14 dias) com L-NAME. ### 0.001 e ** $p < 0.01$ vs Ctrl ($n > 10$).

4.5- Efeito da inibição prolongada da síntese de óxido nítrico sobre a resistência da mucosa gástrica hipertensiva portal à lesão induzida pelo etanol e pela indometacina

A inibição crônica da síntese de óxido nítrico, pelo L-NAME, resultou em um aumento significativo na área de lesão induzida pela exposição tópica do etanol na mucosa de animais Ctrl. Entretanto, a aplicação tópica de etanol em animais Ctrl tratados cronicamente com L-NAME+ indometacina, 3 horas antes dos protocolos, não ocasionou uma área de lesão significativa quando comparado ao grupo de animais Ctrl sem nenhum tratamento prévio (Figura 7).

No grupo de animais PVS, o tratamento crônico com o L-NAME ocasionou uma lesão significativa na mucosa gástrica deste grupo quando esta foi exposta ao etanol. Adicionalmente, a gravidade da lesão induzida pelo etanol, após o tratamento crônico com L-NAME, foi potencializada após a administração aguda da indometacina (Figura 8).

Com relação ao grupo de animais BDL, apenas o tratamento crônico com L-NAME + indometacina aumentou ($p > 0.05$) a área de lesão de mucosa gástrica induzida por etanol (Figura 9). A inibição prolongada da síntese de óxido nítrico não modificou a gravidade das lesões induzidas pelo etanol nas concentrações de 20 ou 40% em comparação ao grupo de animais que não receberam L-NAME (Figura 10).

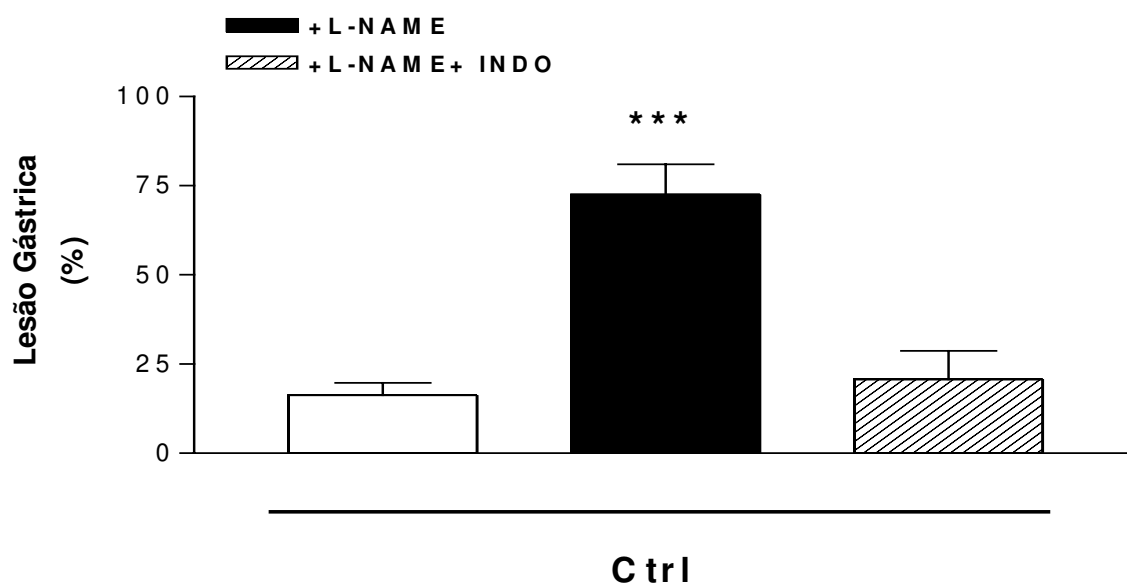


Figura 7- Lesão de mucosa gástrica após o estímulo com EtOH 40% em animais Ctrl tratados cronicamente (14 dias) com L-NAME e L-NAME + indometacina, via intragástrica, 3 horas antes do protocolo experimental *** $p < 0.001$ vs veículo ($n \geq 5$).

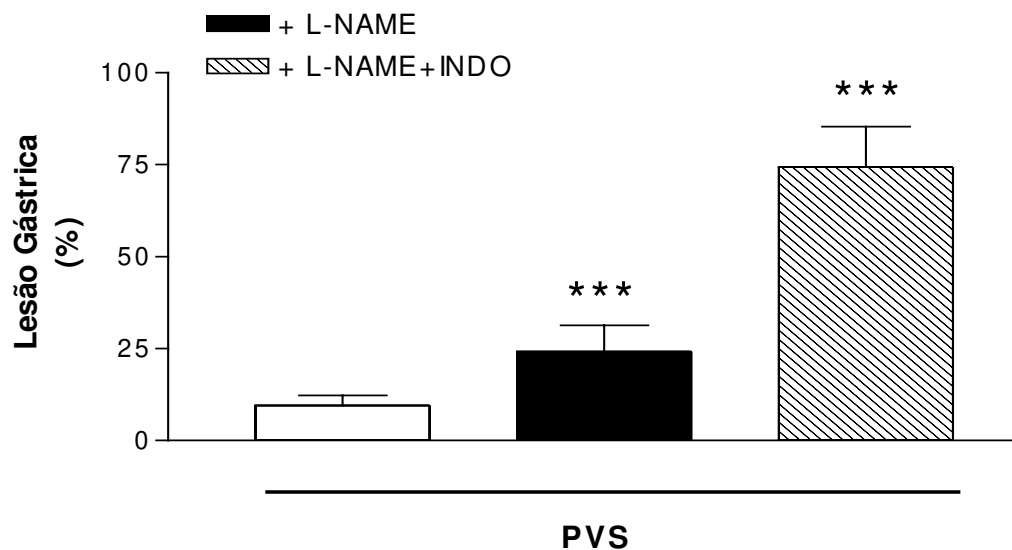


Figura 8- Lesão de mucosa gástrica hipertensiva portal induzida pela aplicação tópica de etanol 40% em animais PVS tratados cronicamente (14 dias) com L-NAME e L-NAME + indometacina, via intragástrica, 3 horas antes do protocolo experimental. *** $p < 0.001$ vs veículo ($n \geq 5$).

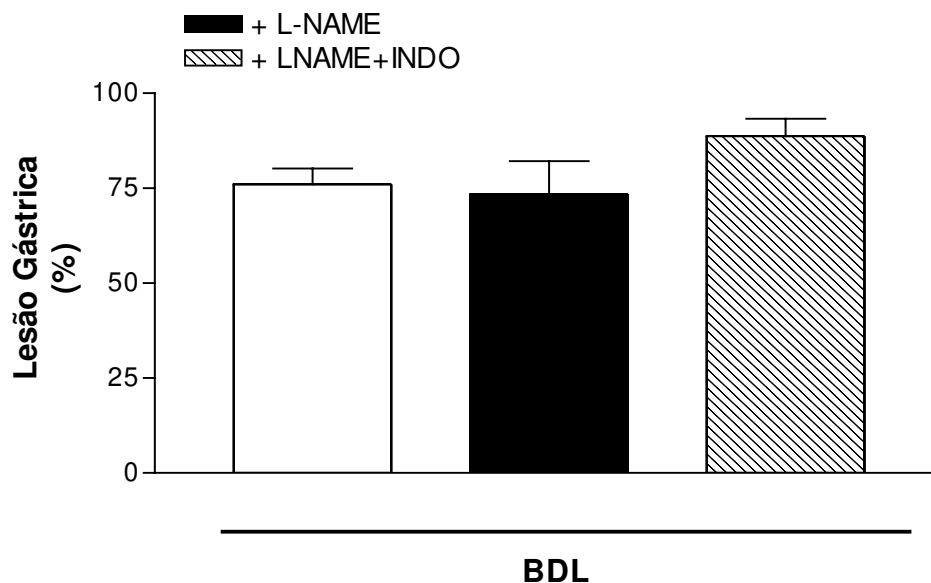


Figura 9- Lesão de mucosa gástrica após estímulo com EtOH 40% em animais BDL tratados cronicamente (14 dias) com L-NAME e L-NAME + indometacina, via intragástrica, 3 horas antes do protocolo experimental ($n \geq 5$).

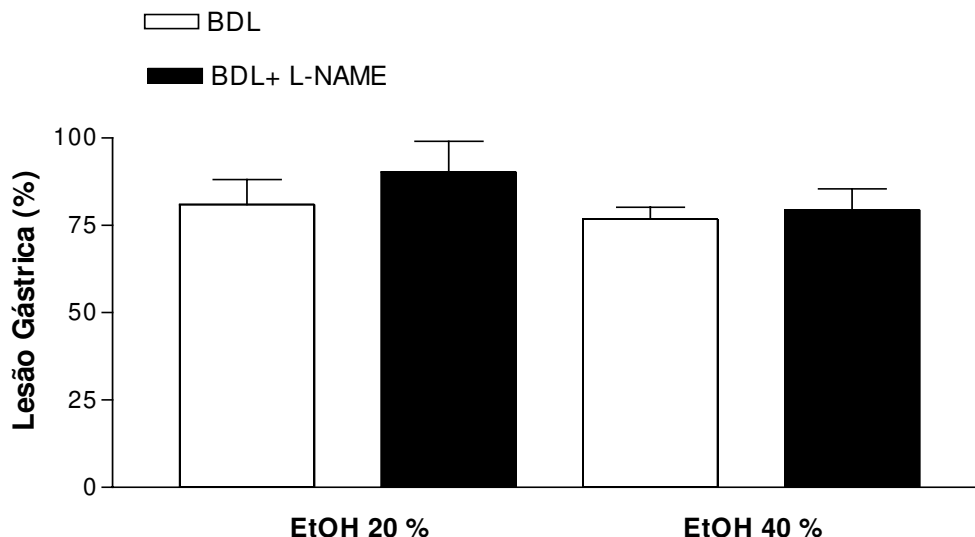


Figura 10- Lesão de mucosa gástrica induzida pela aplicação tópica de etanol 20% e 40% em animais BDL tratados cronicamente com L-NAME (14 dias) (n ≥ 5).

4.6- Efeito da inibição da síntese de prostaglandinas sobre o fluxo da mucosa gástrica hipertensiva portal à lesão induzida pela aplicação tópica de etanol (40%) na presença de bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico

A resposta microcirculatória gástrica à aplicação tópica de etanol 40% não foi modificada pelo tratamento crônico com L-NAME no grupo controle, apesar de ter causado uma maior susceptibilidade da mucosa ao estímulo lesivo (ver seção anterior). Entretanto, quando este grupo de animais foi tratado com L-NAME + indometacina observamos um aumento de aproximadamente 57% no fluxo sanguíneo, após 10 minutos da aplicação do etanol (Figura 11), sendo um resultado interessante e relacionado com a redução da área de lesão de mucosa, observado no grupo de animais Ctrl tratados apenas com L-NAME e mostrado na seção anterior.

O tratamento crônico com L-NAME, no grupo de ratos PVS, reduziu o fluxo sanguíneo gástrico, em 10%, durante o banho com etanol, e, passados 10 minutos, houve um aumento de 30% em relação ao grupo sem tratamento. Uma redução ainda maior no fluxo sanguíneo gástrico, dos animais PVS, foi observada após a exposição ao etanol, quando este grupo foi tratado cronicamente com L-NAME + indometacina (Figura 12).

O tratamento crônico com L-NAME e L-NAME + indometacina reduziu, ainda mais, o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica do grupo de animais BDL, quando esta mucosa foi submetida à aplicação do etanol. Passados 10 minutos da aplicação do etanol, houve uma resposta desta mucosa, antes hiporreativa a esse estímulo. Entretanto, esta resposta não foi suficiente para prevenir a grave a área de lesão, observada após a aplicação do etanol e mostrada na seção anterior (Figura 13).

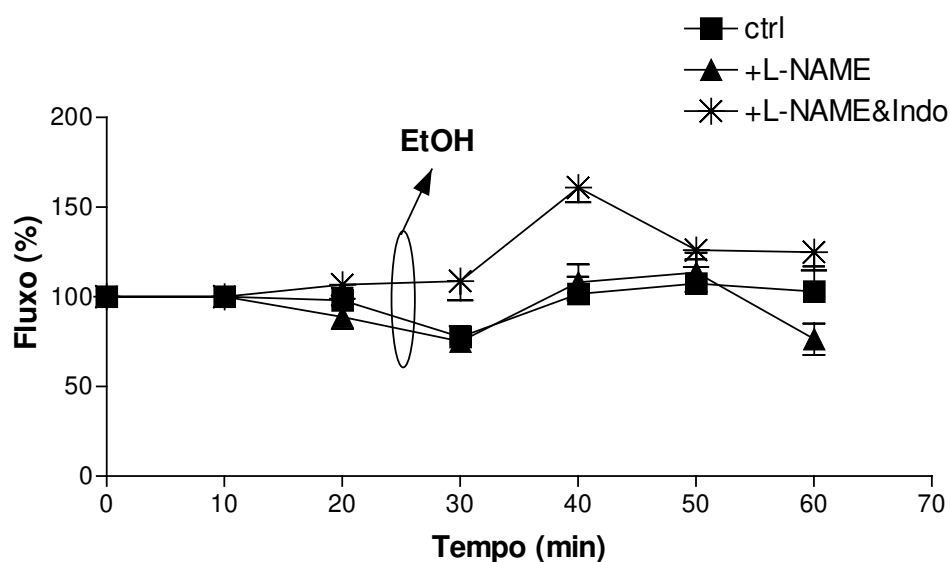


Figura 11- Fluxo sanguíneo de mucosa gástrica após aplicação tópica de etanol 40% em ratos controle tratados cronicamente (14 dias) com L-NAME e L-NAME + indometacina, via intragástrica, 3 horas antes do protocolo experimental ($n \geq 5$).

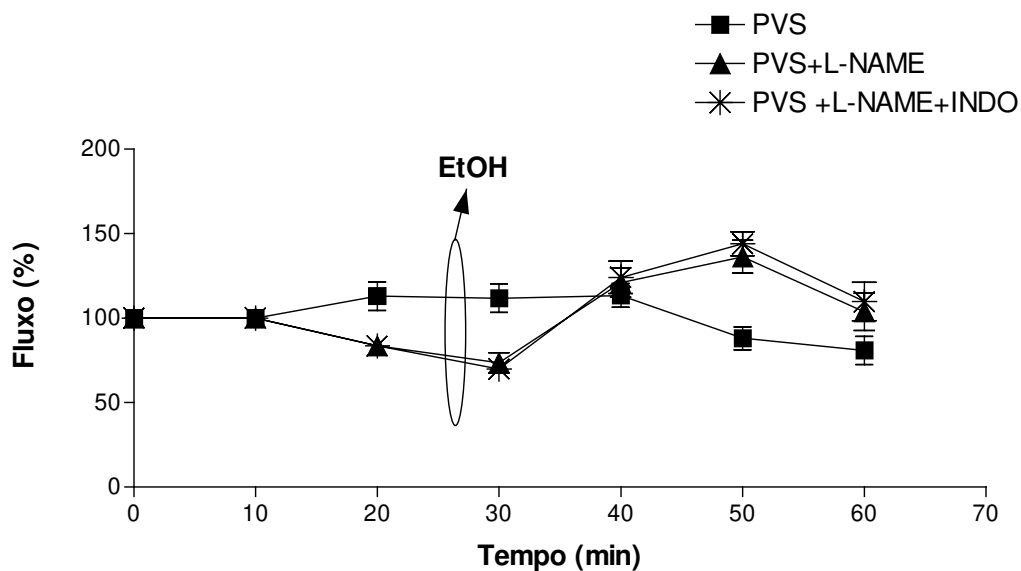


Figura 12- Fluxo sanguíneo de mucosa gástrica após aplicação tópica de etanol 40% em ratos PVS tratados cronicamente (14 dias) com L-NAME e L-NAME + indometacina, via intragástrica, 3 horas antes do protocolo de câmara gástrica (n ≥ 5).

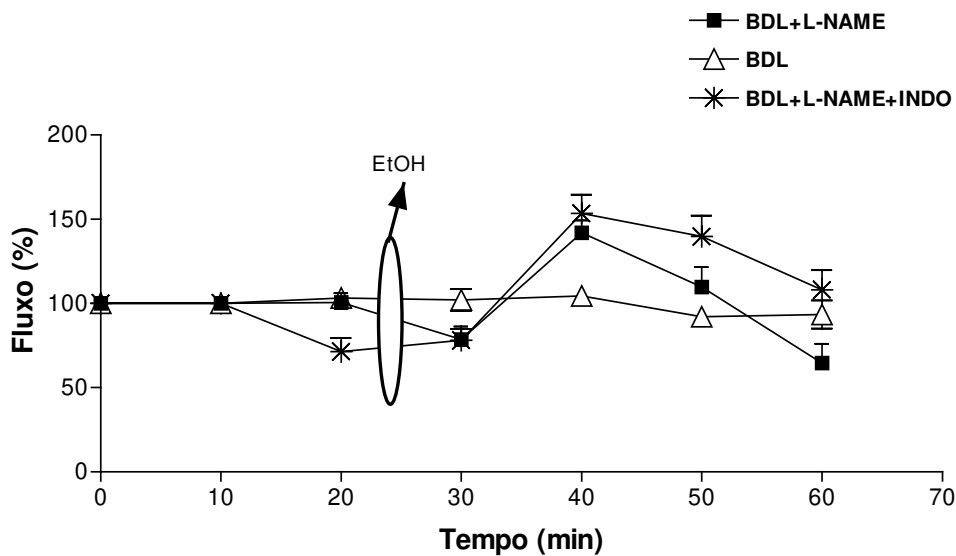


Figura 13- Fluxo sanguíneo de mucosa gástrica após aplicação tópica de etanol 40% em ratos BDL tratados cronicamente (14 dias) com L-NAME e L-NAME + indometacina, via intragástrica, 3 horas antes do protocolo de câmara gástrica (n ≥ 5).

4.7- Efeito da inibição dos receptores de endotelinas sobre a resistência da mucosa gástrica hipertensiva portal à lesão induzida pela aplicação tópica de etanol (40%)

A Fig.14 mostra que a administração intravenosa de ET-1 e do antagonista seletivo de receptor ETA de endotelinas, no grupo de animais Ctrl, não alterou a área de lesão de mucosa gástrica induzida pela aplicação tópica de etanol ($20\% \pm 4$ e $23\% \pm 5$, respectivamente). Entretanto, houve uma redução na área de lesão após o uso do antagonista de receptor ETB ($9\% \pm 2$) e da ET-3 ($12\% \pm 2$) quando comparado ao grupo Ctrl sem tratamento ($20\% \pm 3$). Os resultados sugerem que a ET-3 possui um efeito gastroprotetor e que ET-1 atua via receptor ETB no controle do fluxo sanguíneo gástrico nesse grupo.

Entretanto, houve um aumento na área de lesão de mucosa gástrica, no grupo de animais PVS, após a administração exógena de ET-1 ($32\% \pm 4$), ET-3 ($40\% \pm 6$) e do antagonista seletivo de receptor ETB ($30\% \pm 10$), mas um aumento significativamente maior foi observado após o uso do antagonista de receptor ETA ($75\% \pm 13$) quando comparado ao grupo PVS sem tratamento ($6\% \pm 2$) (Figura 15). Estes resultados sugerem que os receptores ETA e ETB participam na proteção da mucosa gástrica dos animais PVS principalmente via receptor ETA.

Diferentemente do grupo PVS, a Fig. 16 mostra que o tratamento prévio dos animais BDL com o antagonista seletivo de receptor ETB e com a ET-3 reduziu significativamente ($31\% \pm 2$ e $8\% \pm 2$, respectivamente) a área de lesão de mucosa gástrica. Entretanto, o tratamento prévio dos animais BDL com antagonista de receptor ETA ($85\% \pm 9$) ou com a ET-1 ($73\% \pm 9$) não alterou a área de mucosa lesada para grupo quando comparado ao grupo BDL sem tratamento ($78\% \pm 3$). Esse resultado sugere que a administração de ET-3 exógena possui um efeito gastroprotetor para o grupo de animais cirróticos, semelhantemente ao grupo Ctrl, e, que a ET-1 participa na maior susceptibilidade da mucosa gástrica do grupo de animais cirróticos, via ativação do receptor ETB.

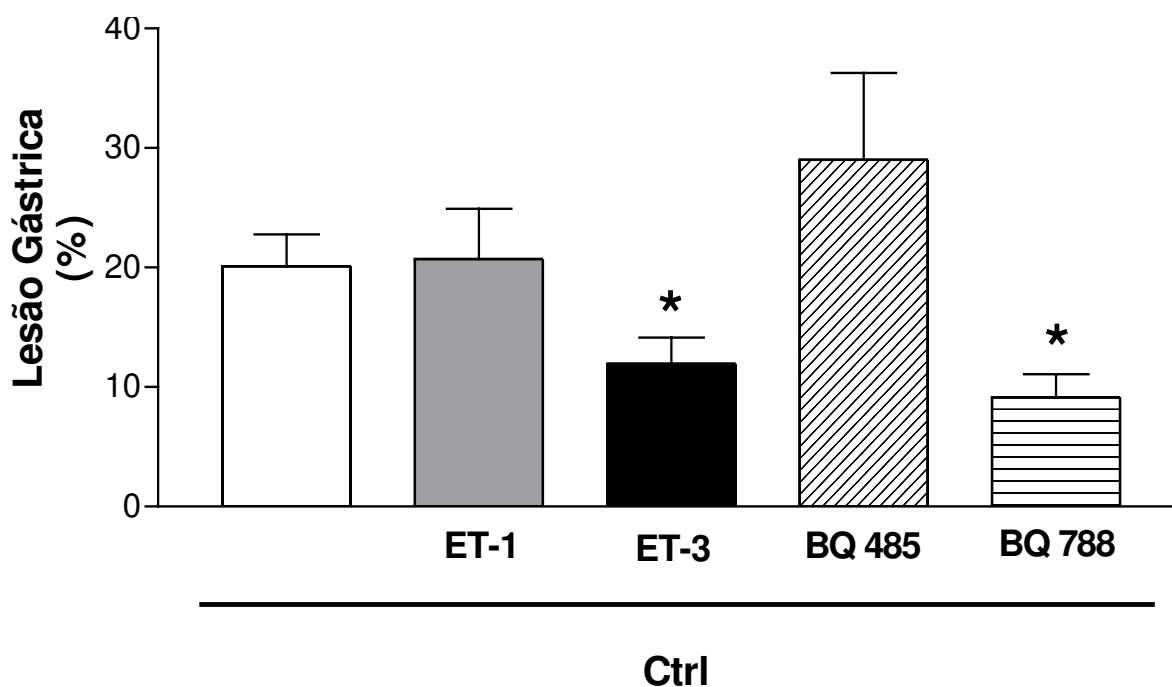


Figura 14- Lesão gástrica induzida pelo etanol (40%) na mucosa de ratos Ctrl tratados com ET-1, ET-3, BQ 485 e BQ 788. * $p < 0.05$ vs Ctrl ($n \geq 5$).

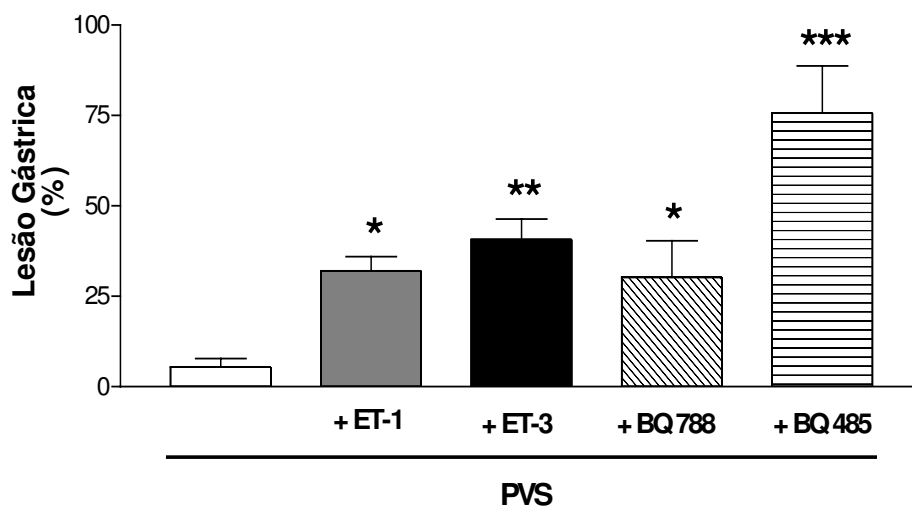


Figura 15- Lesão gástrica induzida pelo etanol (40%) na mucosa de ratos PVS tratados com ET-1, ET-3, BQ 485 e BQ 788. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ vs PVS ($n \geq 5$).

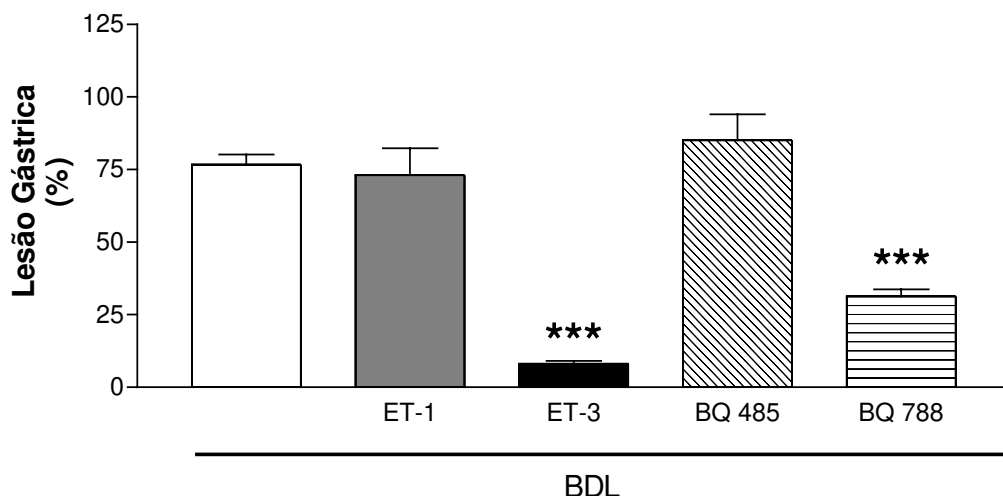


Figura 16- Lesão gástrica induzida pelo etanol (40%) na mucosa de ratos BDL tratados com ET-1, ET-3, BQ 485 e BQ 788. *** $p < 0.001$ vs BDL ($n \geq 5$).

4.8- Efeito da inibição dos receptores de endotelinas sobre o fluxo da mucosa gástrica hipertensiva portal à lesão induzida pela aplicação tópica de etanol (40%)

Os resultados mostraram que após a administração do BQ 788 (antagonista seletivo de ETB) ou da ET-3 exógena, o fluxo sanguíneo gástrico foi significativamente aumentado no grupo de ratos Ctrl (Figura 17) e BDL (Figura 19), mas o tratamento com o BQ 485 ou com a ET-1 não alterou significativamente o fluxo sanguíneo gástrico dos grupos Ctrl e BDL (Figura 17 e 19).

Com relação ao grupo de animais PVS, a administração exógena de ET-1, ET-3, BQ 485 e BQ 788 reduziu o fluxo sanguíneo gástrico deste grupo (Figura 18), sendo esse efeito menos pronunciado para o BQ 788.

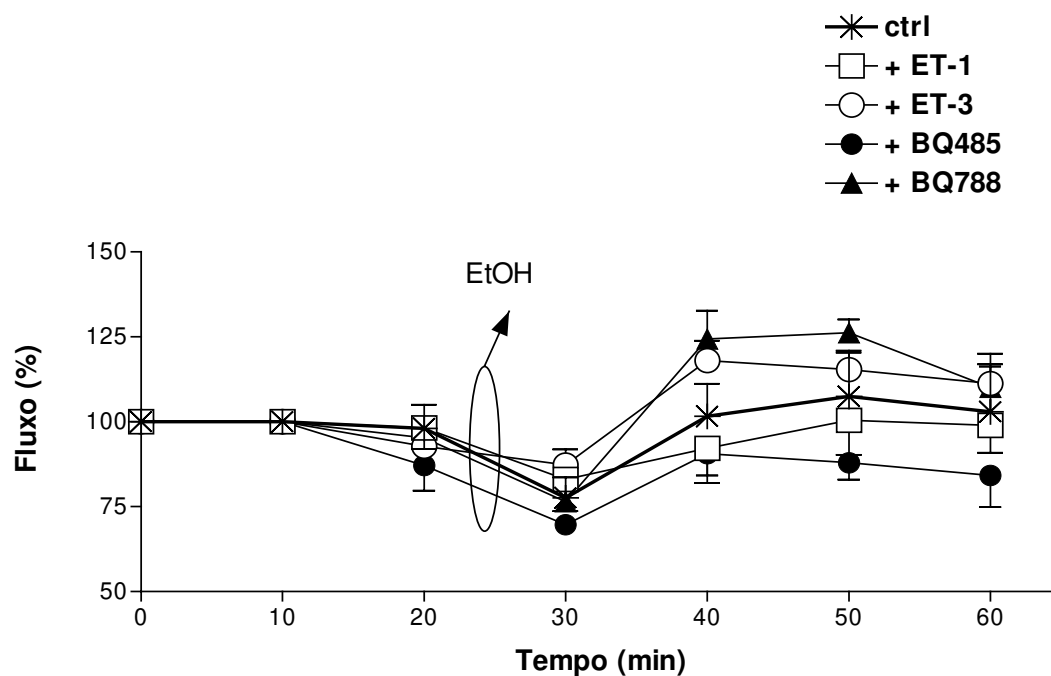


Figura 17- Resposta microcirculatória gástrica à exposição tópica ao etanol (40%) em ratos Ctrl tratados com ET-1, ET-3, BQ 485 e BQ 788 (n ≥5).

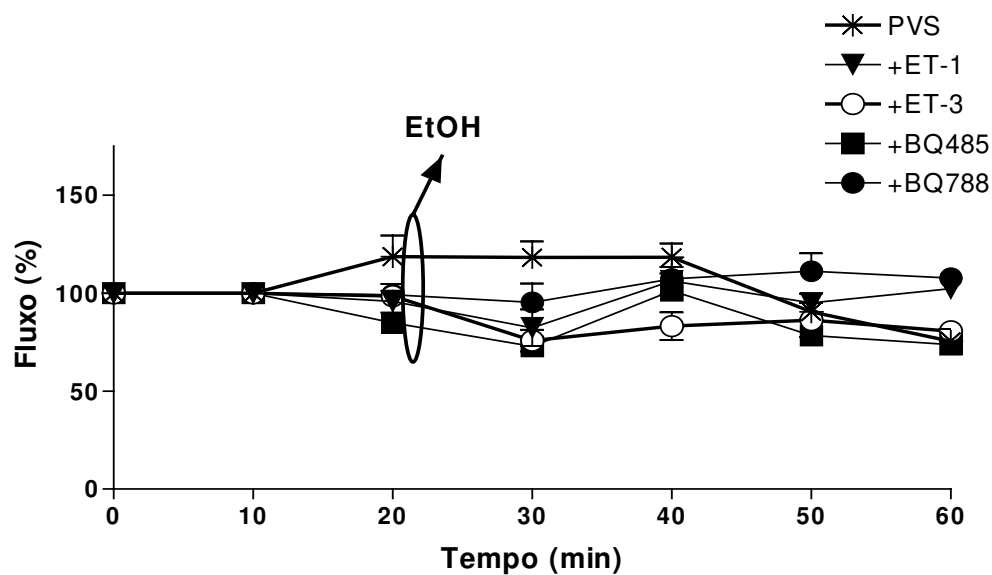


Figura 18- Resposta microcirculatória gástrica à exposição tópica ao etanol (40%) em ratos PVS tratados com ET-1, ET-3, BQ 485 e BQ 788 (n ≥5).

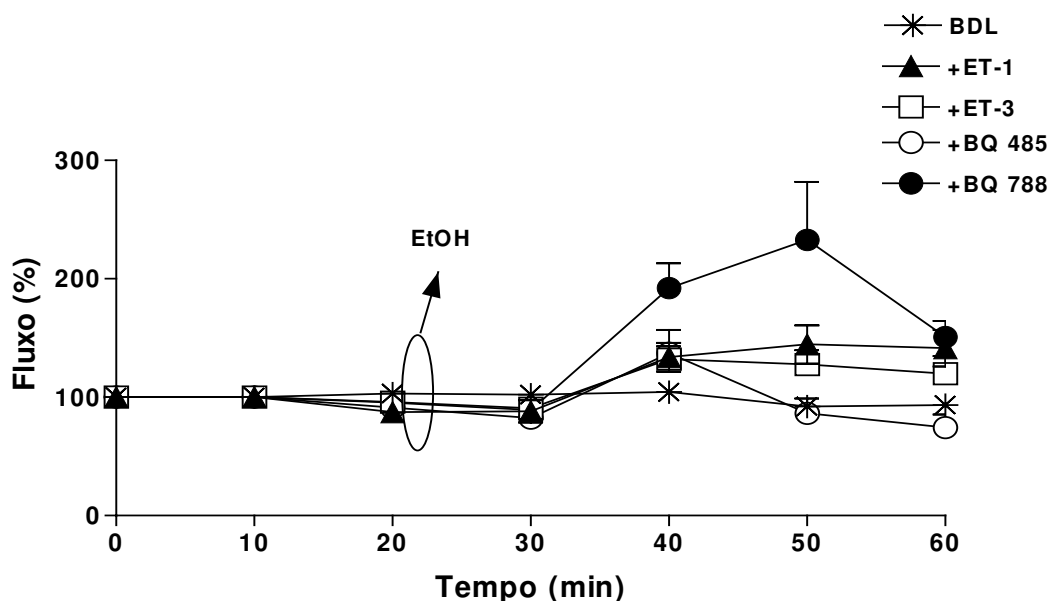


Figura 19- Resposta microcirculatória gástrica à exposição tópica ao etanol (40%) em ratos BDL tratados com ET-1, ET-3, BQ 485 e BQ 788 (n ≥5).

4.9- Participação dos neurônios sensoriais sobre as alterações hemodinâmicas dos animais cirróticos

A Fig. 20 mostra que os animais BDL apresentaram a pressão portal (PP) elevada (17.5 mmHg) como esperado. Entretanto, o tratamento neonatal com capsaicina estabilizou a pressão portal do grupo de animais BDL-CAP (9.5 mmHg) em valores semelhantes aos dos grupos de animais Ctrl sadios (9 mmHg) e Ctrl capsaicinizados (9.5 mmHg).

Além disso, o grupo de animais BDL que receberam o tratamento neonatal com capsaicina, apresentaram uma pressão arterial média (127 mmHg) com valores próximos a dos animais controles sadios (135 mmHg) e Ctrl-capsaicinizados (118 mmHg), enquanto os valores obtidos de PAM para os animais BDL sem nenhum tratamento (93 mmHg) foram significativamente menores (** p<0.01) em relação aos outros grupos (Figura 21).

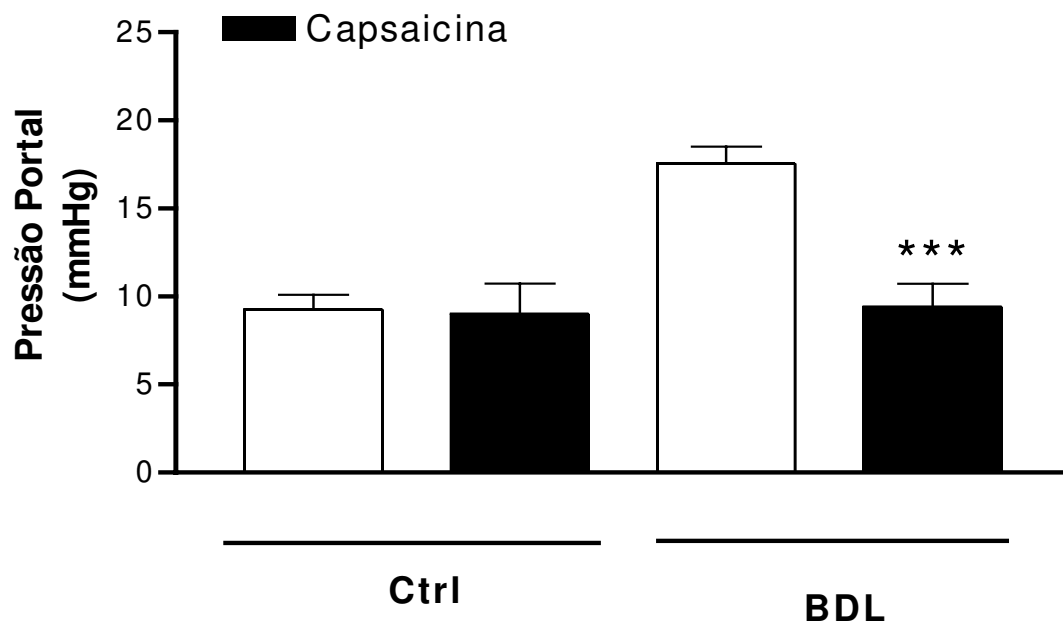


Figura 20- Pressão portal de animais Ctrl, BDL, e Ctrl e BDL capsaicinizados. *** $p < 0.001$ vs BDL ($n=5$).

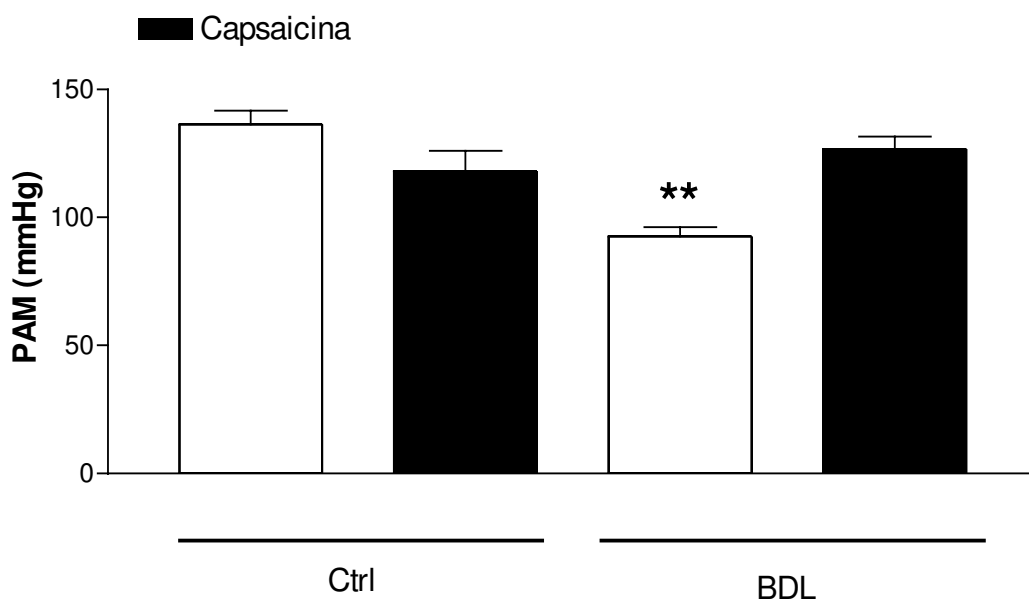


Figura 21- Pressão arterial média de animais Ctrl, BDL, e Ctrl e BDL capsaicinizados. ** $p < 0.01$ vs Ctrl ($n \geq 5$).

4.10- Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre a resistência da mucosa e sobre a resposta da microcirculação gástrica hipertensiva portal às lesões induzidas por etanol

A aplicação tópica de etanol em ratos BDL submetidos ao tratamento neonatal com capsaicina (50mg/Kg, i.d.) e tratamento agudo com o antagonista de receptor NK1 (A 5330: 5mg/Kg, i.p.) resultou em uma redução na área de lesão de mucosa gástrica nos dois grupos (21 ± 4) e (35 ± 1), respectivamente, quando comparada ao grupo BDL sem tratamento (76 ± 4). Entretanto, o tratamento com neonatal com capsaicina não alterou a área de lesão na mucosa gástrica dos animais controles (Figura 22).

Com relação à resposta microcirculatória gástrica ao estímulo com etanol, o tratamento neonatal com capsaicina não modificou significativamente esta, no grupo de animais Ctrl (Figura 23). Porém, a mucosa gástrica do grupo de animais BDL, antes hiporresponsiva ao estímulo com etanol (103 ± 5 : basal e 104 ± 3 : primeiro HCl), respondeu ao estímulo deste, após 10 minutos da sua aplicação, no grupo de animais BDL-capsaicinizados (103.5 ± 10 : basal para 86 ± 14 : primeiro HCl) ou tratados com o antagonista seletivo de receptor NK1 (104 ± 13 : Basal para 116 ± 12 : primeiro HCl) (Figura 24).

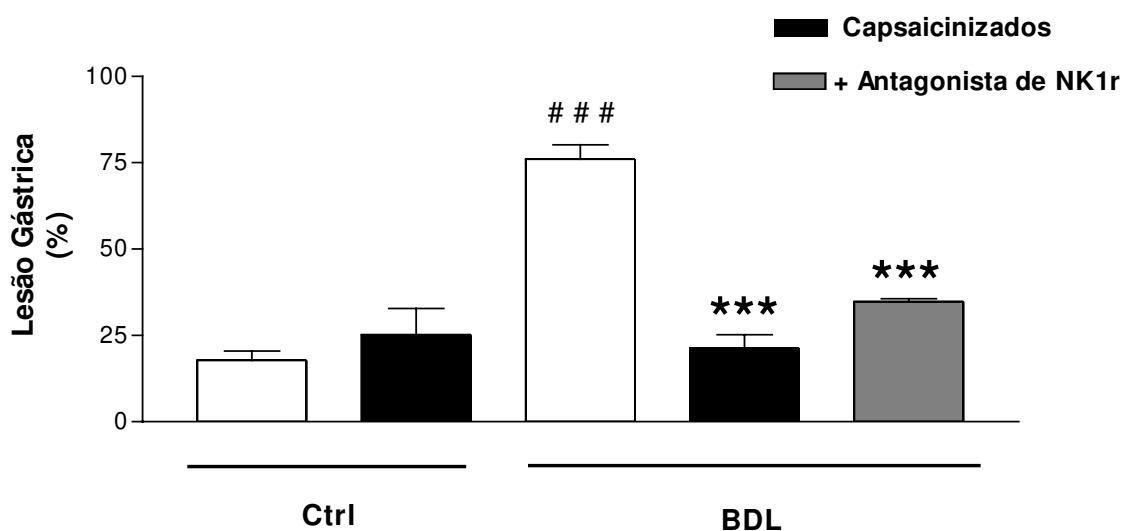


Figura 22– Lesão gástrica induzida pela aplicação tópica de EtOH (40%) em animais Ctrl, BDL, Ctrl e BDL/capsaicinizados, e BDL tratados com antagonista de receptor NK1 ($n \geq 5$). *** $p < 0.001$ em relação ao grupo BDL sem tratamento e ### $p < 0.001$ em relação ao grupo Ctrl.

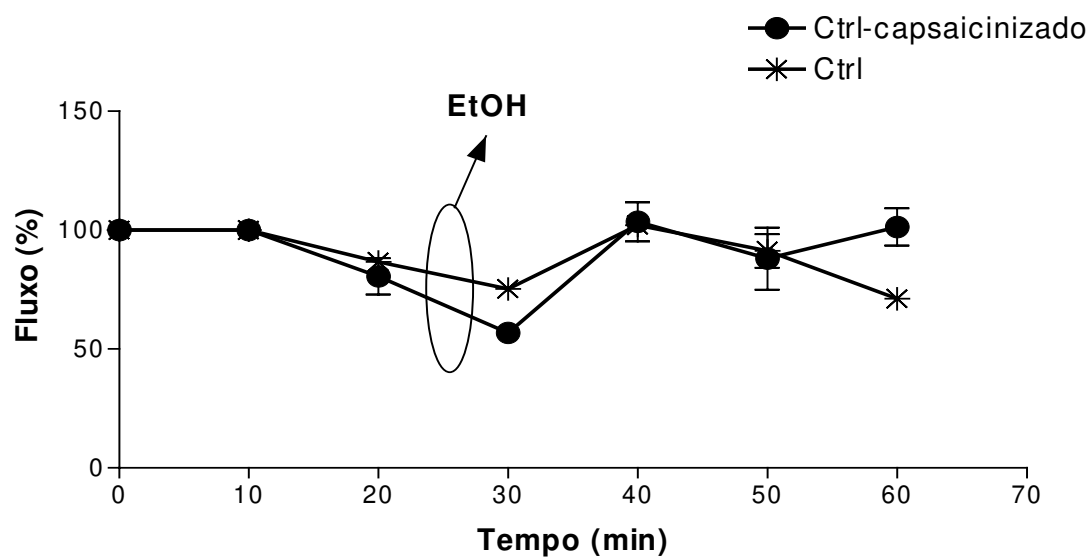


Figura 23- Resposta da microcirculação gástrica de ratos Ctrl e Ctrl capsaicinizados à aplicação tópica de etanol 40% (n≥5).

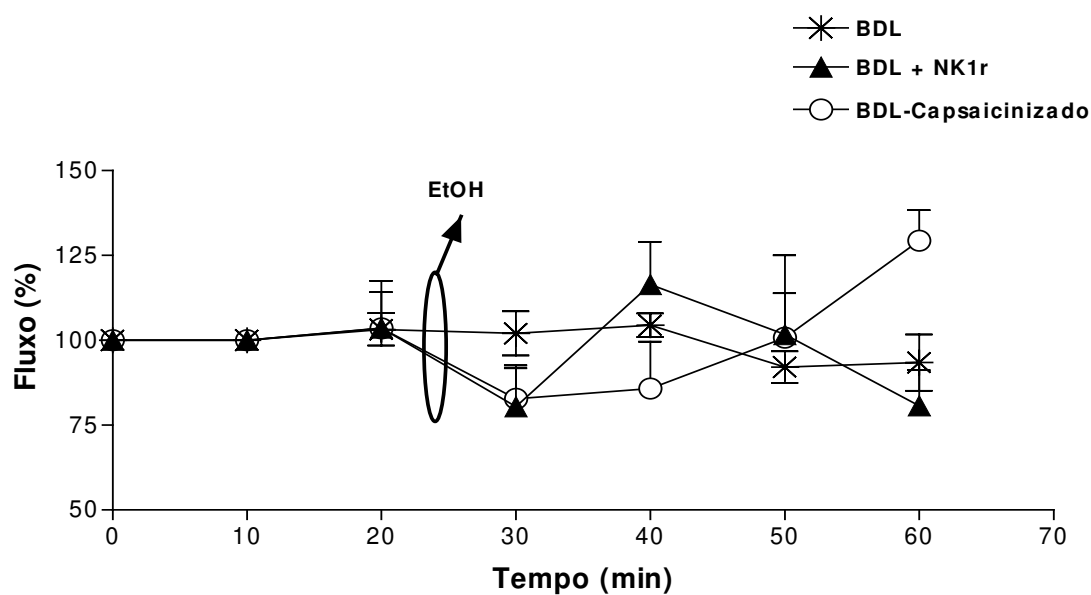


Figura 24- Resposta da microcirculação gástrica de ratos BDL, BDL/capsaicina e BDL tratados com antagonista de receptor NK1 à aplicação tópica de etanol 40% (n≥5).

4.11- Efeito da administração aguda e crônica de endotoxina sobre a resistência da mucosa gástrica à lesão induzida pela aplicação tópica de etanol 40% em animais controles e PVS

A administração aguda de LPS (0.3 - 3mg/Kg; i.p.), 6 horas antes dos protocolos, provocou um aumento dose-dependente ($76\% \pm 1$; $91\% \pm 3$; $96\% \pm 3$, respectivamente) na área de lesão de mucosa gástrica dos animais Ctrl após a administração do etanol quando comparado ao grupo Ctrl não tratados com o LPS ($20\% \pm 3$). O tratamento agudo com o LPS (0.3 e 1mg/Kg, i.p.) provocou um aumento significativo ($74\% \pm 4$ e $84\% \pm 6$, respectivamente) na área de lesão de mucosa gástrica dos animais PVS após a administração do etanol quando comparado ao grupo PVS não tratado com o LPS ($6\% \pm 2$). Entretanto, observamos uma leve diminuição na área de lesão quando administramos o LPS (3mg/Kg: $70\% \pm 7$) quando comparado à lesão induzida pela dose de 1mg/Kg (Figura 25) neste grupo. No grupo de animais controles, a área de lesão da mucosa gástrica foi significativamente reduzida ($10\% \pm 2$) após a administração crônica da endotoxina quando comparada à área de lesão ocasionada pela administração aguda ($91\% \pm 2$) (Figura 26). Semelhantemente, houve uma redução na área de lesão gástrica no grupo de animais PVS submetidos ao tratamento crônico ($38\% \pm 9$) em relação ao tratamento agudo ($84\% \pm 6$) com o LPS (Figura 26).

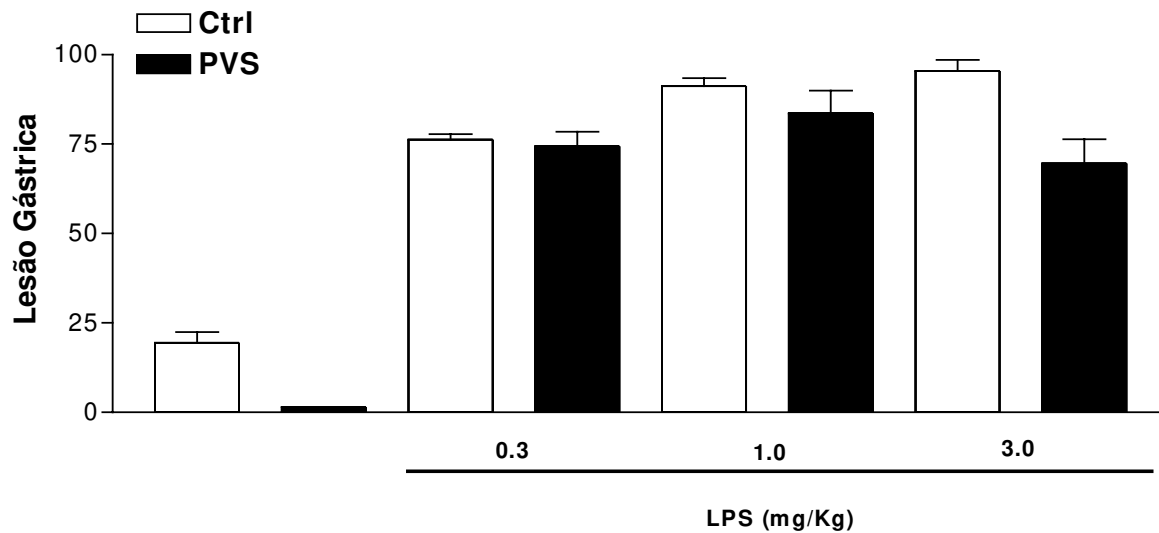


Figura 25- Curva dose-resposta da área de lesão gástrica induzida pelo etanol após o tratamento agudo (1mg/Kg; i.p.) com LPS em animais Ctrl e PVS (n≥5).

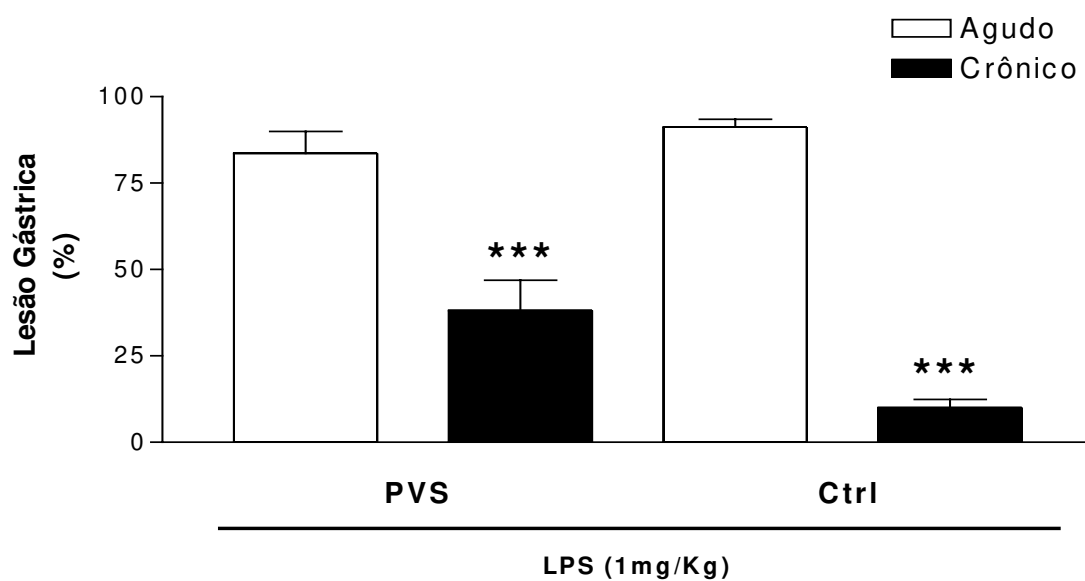


Figura 26- Efeito do etanol (40%) sobre a lesão de mucosa gástrica de animais Ctrl e PVS após tratamento agudo e crônico com LPS (1mg/Kg; i.p.) (n≥5).

4.12- Efeito do tratamento agudo e crônico com endotoxina sobre a resposta microcirculatória gástrica à aplicação tópica de etanol (40%) em controles e pvs

A administração aguda do LPS (1mg/Kg) não alterou a resposta o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica dos animais Ctrl ($72\% \pm 8$), após o contato com o etanol, quando comparado à resposta obtida nos animais controle sem tratamento ($75\% \pm 4$). Entretanto, na vigência de endotoxemia crônica, o fluxo sanguíneo gástrico apresentou-se um pouco mais elevado ($92\% \pm 5$), permanecendo, assim, mesmo após o contato da mucosa com o etanol (Figura 27).

A resposta microcirculatória permaneceu reduzida no grupo de animais PVS na presença de endotoxemia aguda ($99\% \pm 9$) ou crônica ($102\% \pm 4$) quando comparada ao grupo PVS sem tratamento ($118\% \pm 8$). Entretanto, após o estímulo com etanol, o fluxo sanguíneo dos animais PVS tratados cronicamente com LPS apresentou um aumento ($145\% \pm 10$) a partir do primeiro banho de HCl 100 mM (Figura 28).

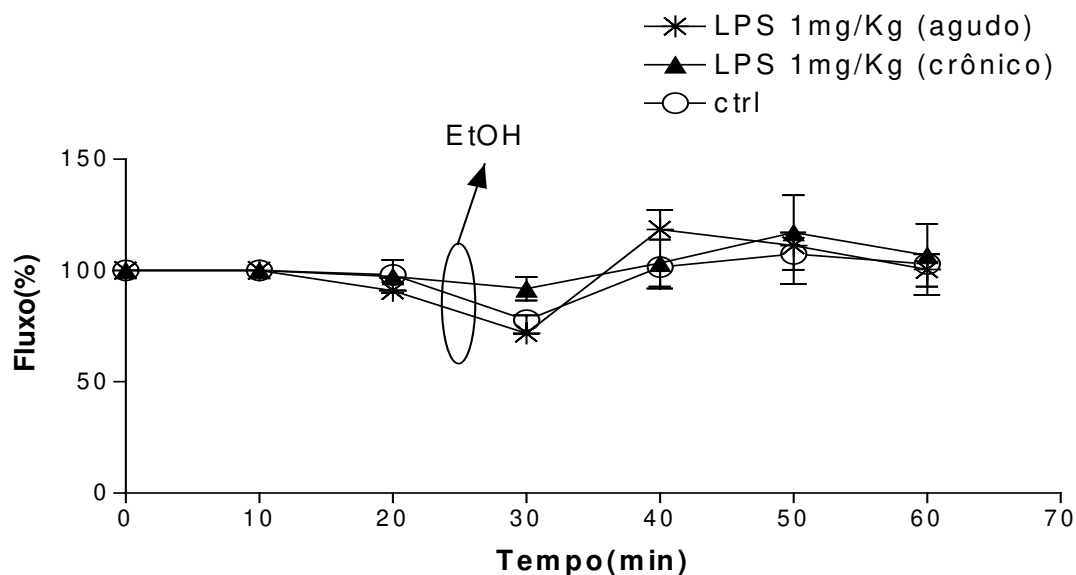


Figura 27- Efeito do etanol (40%) sobre o fluxo sanguíneo gástrico de controles após tratamento agudo e crônico com LPS (1mg/Kg, i.p., $n \geq 5$).

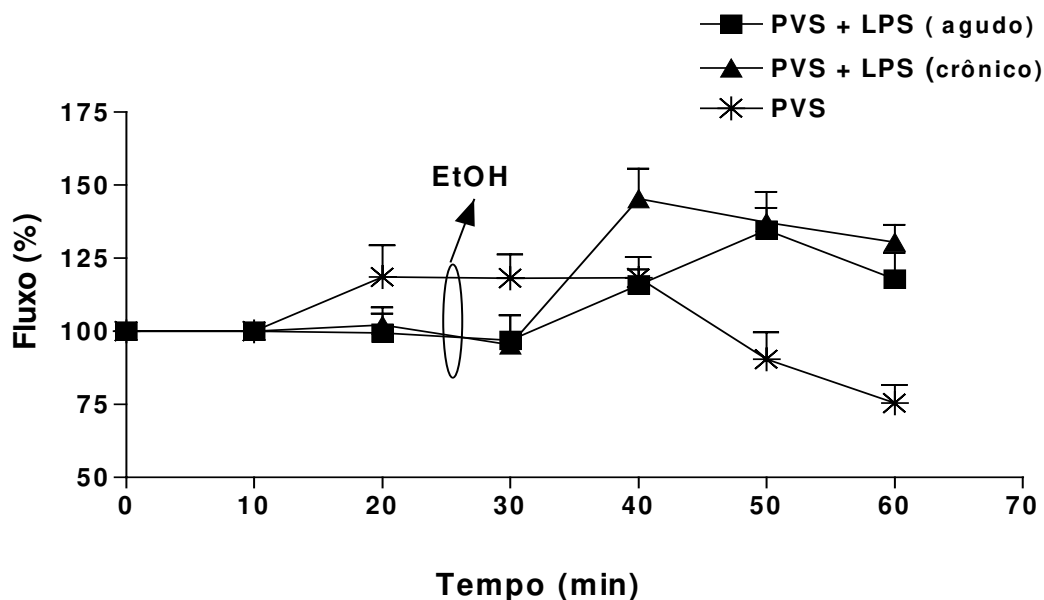


Figura 28- Efeito do etanol (40%) sobre o fluxo sanguíneo gástrico de animais PVS após tratamento agudo e crônico com LPS (1mg/Kg, i.p., n≥5).

4.13- Papel do pH intragástrico no Dano Lesivo Induzido pelo Etanol na Hipertensão Portal

A curva dose-resposta (Figura 29) feita em animais controles, utilizando-se soluções de HCl com diferentes valores de pH, mostra que existe uma variação de até 100% de área de mucosa gástrica lesada, quando oscila-se a faixa de pH das soluções de HCl entre os valores de 1-2. Não achamos necessário utilizar o valor de pH 1.0 para fazer uma curva dose-resposta em animais BDL, uma vez que, utilizando-se a solução padrão de pH 1.5, já obtemos uma área de mucosa lesada em torno de 75-80% para este grupo.

Foi observada uma pequena redução na área de lesão de mucosa gástrica no grupo Ctrl e uma significativa redução na área de lesão para o grupo BDL quando foi utilizada a solução de HCl pH 2.0. Entretanto, foi observado um aumento não significativo na área de lesão para o grupo de animais PVS (Figura 30).

O aumento no valor de pH da solução de HCl também exerceu um efeito gastroprotetor na mucosa do grupo de animais cirróticos submetidos ao tratamento crônico com L-NAME e L-NAME+indometacina (Figura 31), assim como no grupo de animais Ctrl submetidos ao tratamento agudo com o LPS (Figura 32).

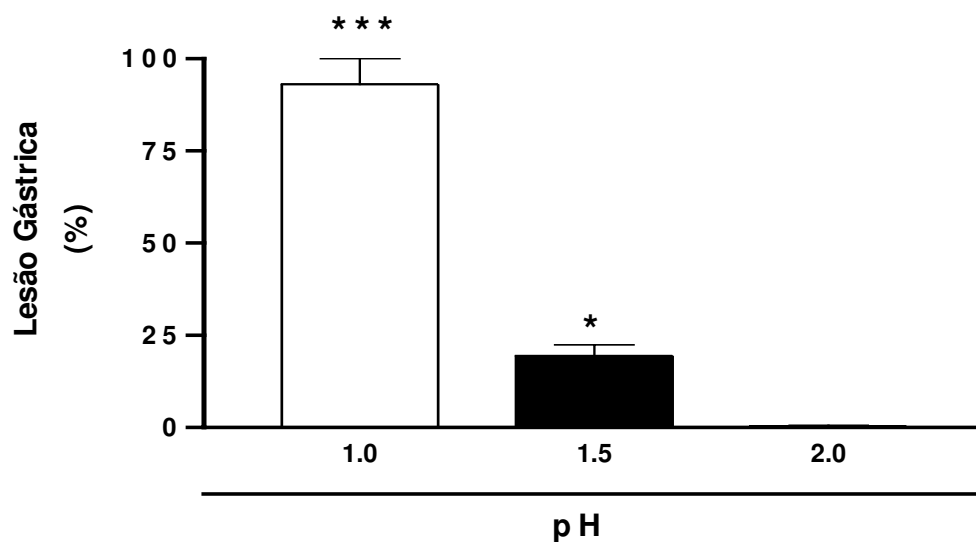


Figura 29- Curva dose-resposta das diferentes faixas de pH da solução de HCl 100mM sobre a resistência da mucosa gástrica à lesão induzida por etanol a 40% em animais Ctrl (n=5).

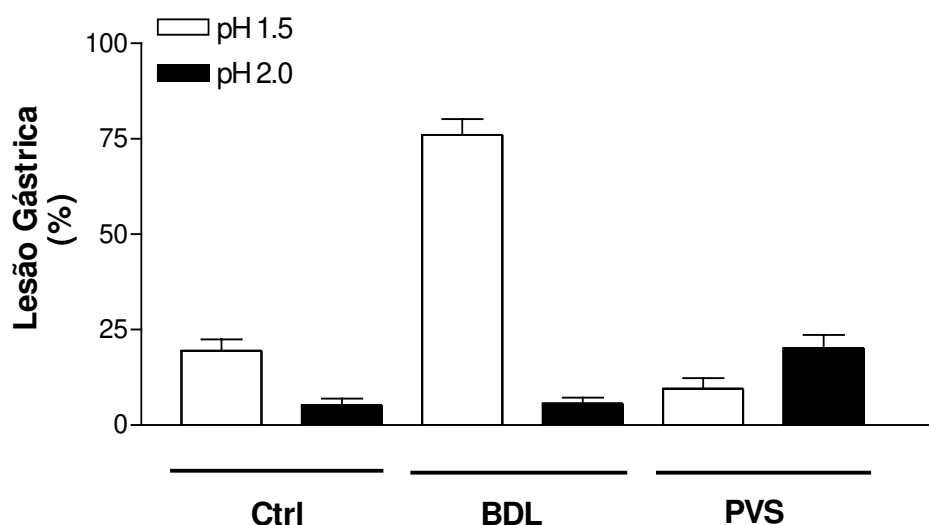


Figura 30- Efeito do pH da solução de HCl 100mM sobre a resistência da mucosa gástrica à lesão induzida por etanol a 40% nos grupos com hipertensão portal experimental e o grupo controle (n ≥ 5).

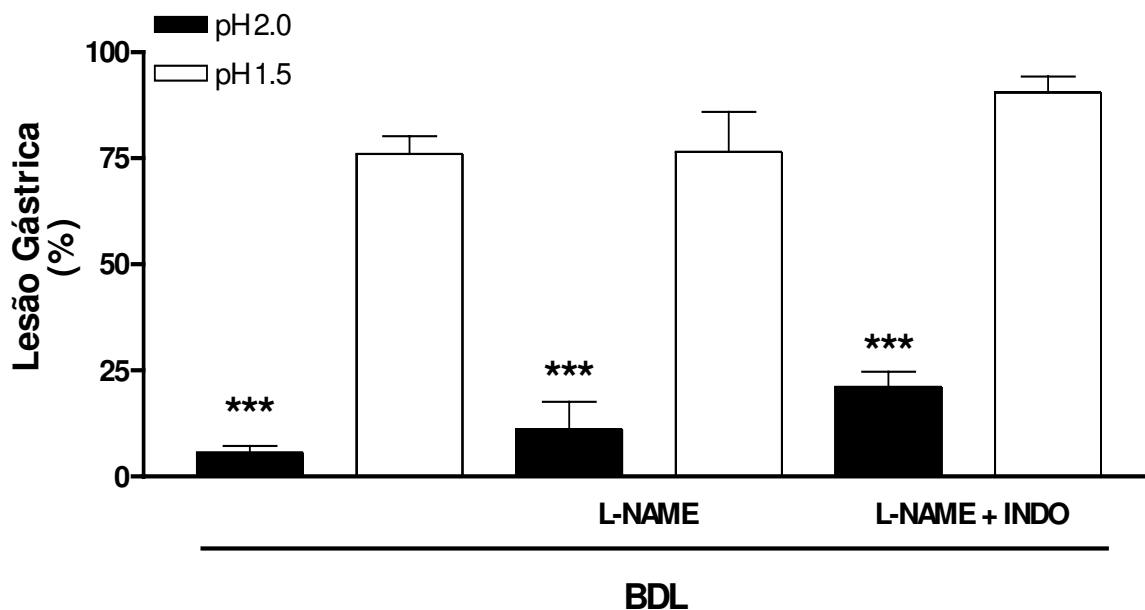


Figura 31- Efeito do pH da solução de HCl 100mM sobre a resistência da mucosa gástrica hipertensiva portal à lesão induzida por etanol a 40% durante a inibição crônica de NO e inibição aguda da síntese de PGE₂ (n≥5).

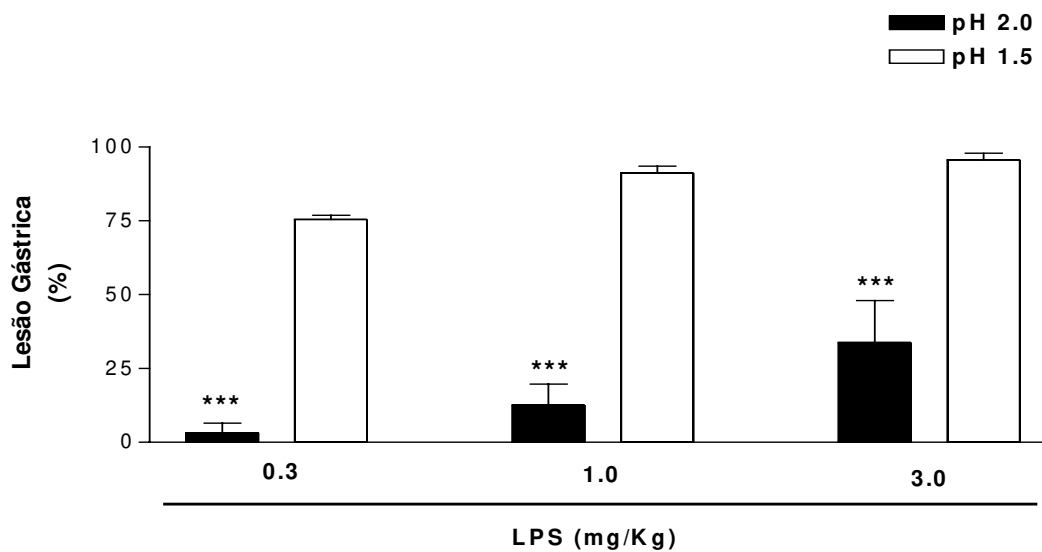


Figura 32–Efeito do pH da solução de HCl 100mM sobre a resistência da mucosa gástrica de animais Ctrl à lesão induzida por etanol a 40% 6 h após administração intraperitoneal única de LPS (0.3-3 mg/Kg, n≥5).

4.14- Dosagem de proteínas no tecido gástrico

Não foram observadas diferenças significativas na concentração de proteínas no tecido gástrico dos diferentes grupos experimentais testados (Figuras 33 e 34).

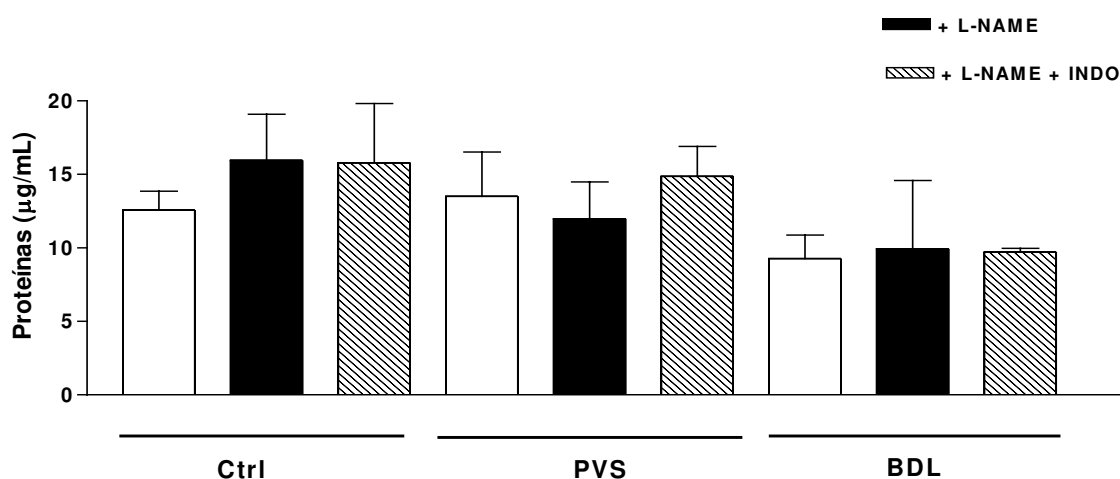


Figura 33- Dosagem de proteínas na mucosa gástrica de animais Ctrl, PVS e BDL, com e sem o tratamento crônico com L-NAME (n=4, em triplicata).

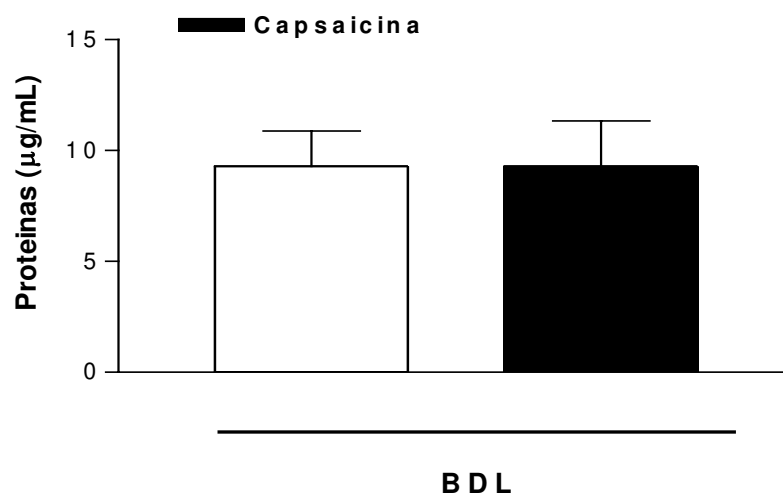


Figura 34- Dosagem de proteínas na mucosa gástrica de animais BDL e BDL/ capsaicina (n=4, em triplicata).

4.15- Determinação da Concentração de ETs e PGE₂ na Mucosa Gástrica Através de ELISA

Os resultados obtidos através de Elisa indicam que a ET-1 existe em uma proporção cerca de três vezes maior do que ET-3 na mucosa gástrica de todos os grupos estudados (Figura 35), e que o grupo de animais BDL apresentam cerca de 20-30% a mais de ET-1 e ET-3 do que os animais Ctrl e PVS, os quais não diferem entre si. Além disso, a Fig. 35 mostra que a inibição prolongada da NOS causou um leve aumento na concentração de ET-1 e ET-3 no grupo de animais BDL, mas a administração intragástrica de indometacina ocasionou uma redução na concentração de ET-1 e ET-3 na mucosa gástrica deste grupo.

Com relação ao grupo de animais BDL-capsaicinizados, a concentração de ET-1 é significativamente menor neste grupo do que no grupo de animais BDL, enquanto que não foi observada diferença significativa quanto à concentração de ET-3 entre estes dois grupos (Figura 36).

A dosagem de PGE₂ através de Elisa mostrou que não há diferença significativa entre as concentrações de PGE₂ na mucosa gástrica estimulada com etanol dos grupos de animais CTRL e com HP (Figura 37). Além disso, o tratamento crônico com o L-NAME não alterou a concentração de PGE₂ desses grupos. Entretanto, a administração aguda de indometacina nos grupos de animais tratados cronicamente com L-NAME significativamente ($p < 0,001$) reduziu a concentração de PGE₂ (Figura 37).

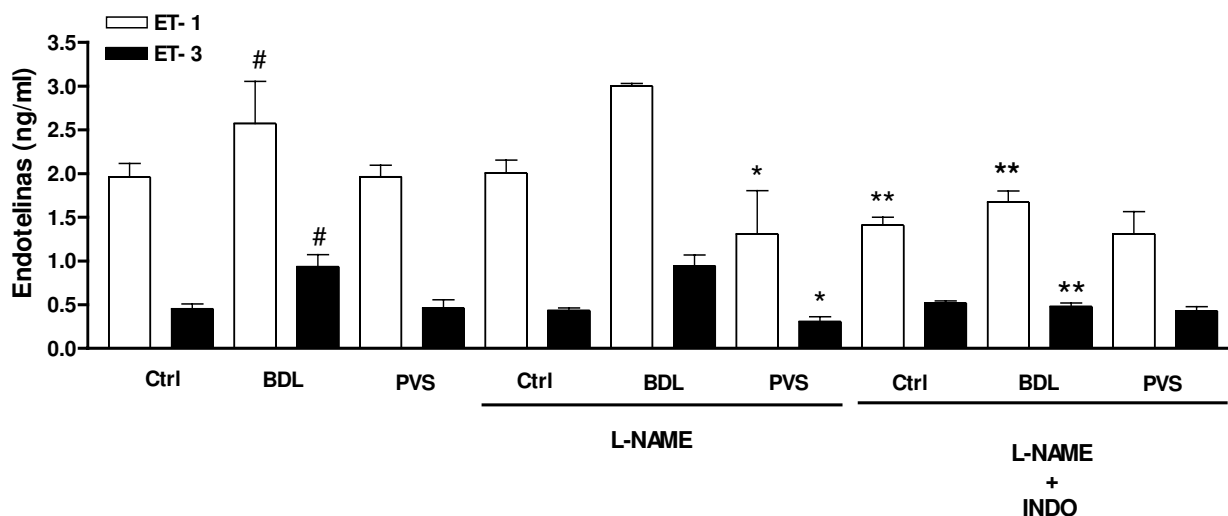


Figura 35- Concentração de ET-1 e ET-3 na mucosa gástrica dos grupos de animais Ctrl, BDL e PVS, com e sem tratamento crônico com L-NAME e L-NAME+indometacina (n=4, em duplicata). ** p<0,01 e * p<0,05 em relação aos seus respectivos grupos controles sem tratamento. # p<0,05 em relação ao grupo Ctrl.

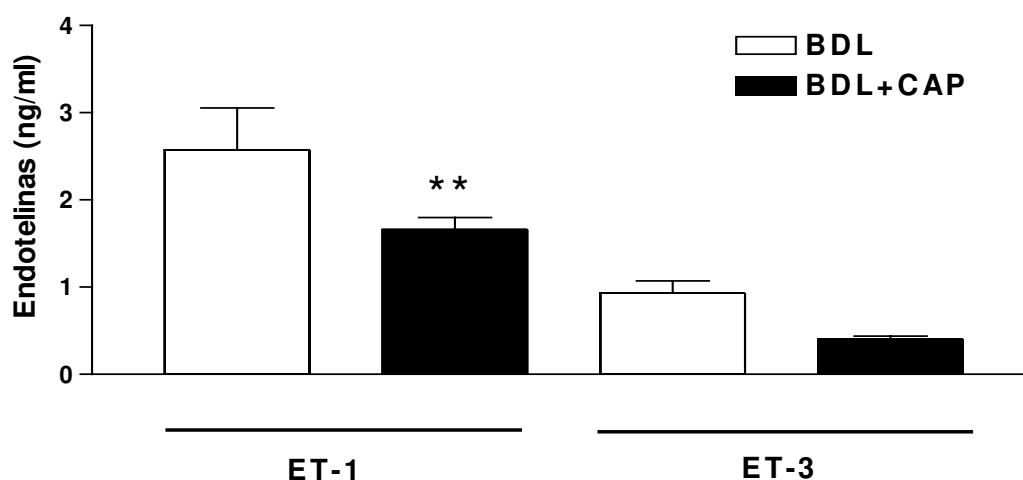


Figura 36- Concentração de proteínas (ET-1 e ET-3) na amostra de tecido gástrico de animais BDL e BDL-Capsaicina (n=4; em duplicata). ** p<0.01.

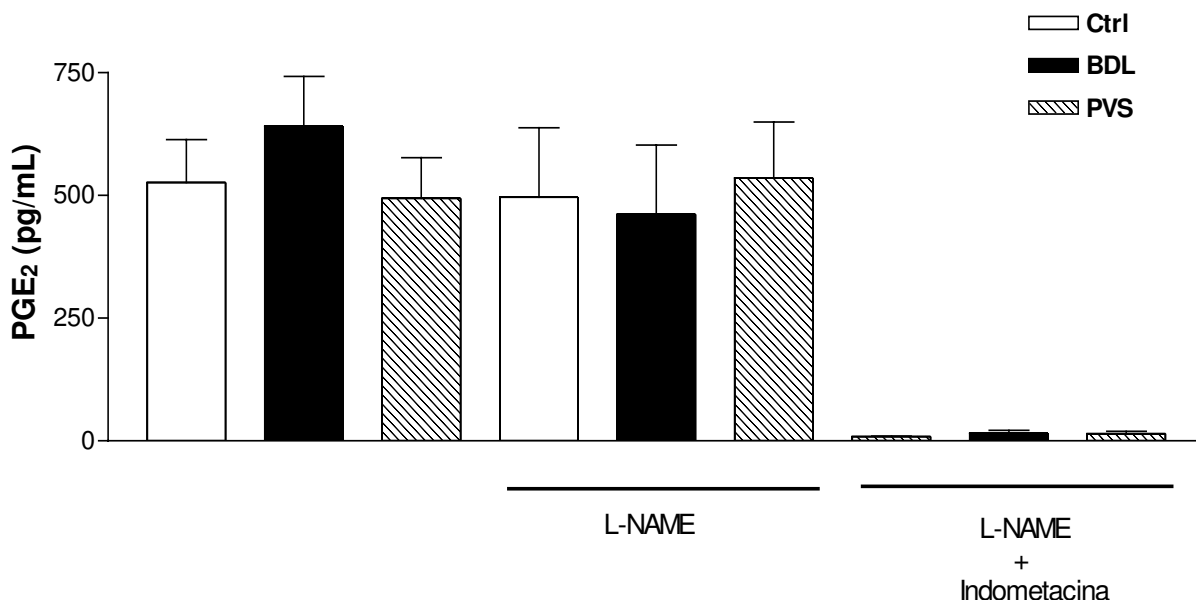


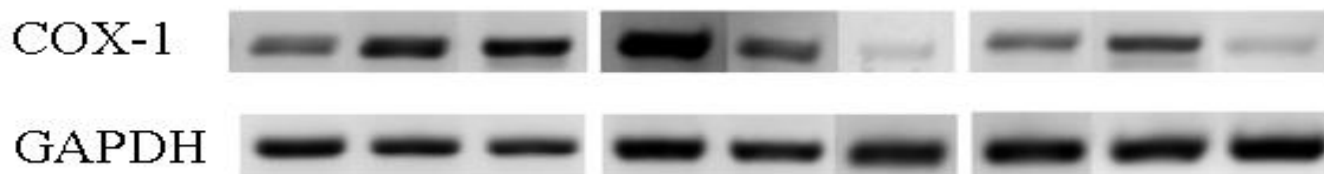
Figura 37- Concentração PGE₂ na amostra de tecido gástrico dos grupos de animais Ctrl, BDL e PVS, com e sem tratamento crônico com L-NAME e L-NAME+indometacina (n=4, em duplicata).

4.16- RT- PCR das isoformas de COX, NOS e ETs na mucosa gástrica de animais sadios ou com HP submetida ao estímulo lesivo com o etanol durante o tratamento crônico com L-NAME e L-NAME + indometacina

A Fig. 38 mostra que a mucosa gástrica estimulada com etanol do grupo de animais PVS e BDL apresenta uma maior expressão da COX-1, mas a expressão da COX-2 apresentou-se reduzida no grupo BDL, quando esses resultados são comparados aos resultados obtidos no grupo de animais Ctrl (Figura 39). O tratamento crônico com L-NAME reduziu a expressão da COX-1 nos grupos de animais com HP, a expressão da COX-2 no grupo de animais Ctrl, mas aumentou a expressão da COX-2 no grupo BDL (Figuras 38 e 39). A administração de indometacina não alterou os resultados obtidos para a expressão da COX-1 após o tratamento crônico com L-NAME, mas potencializou significativamente ($p < 0.001$) a expressão da COX-2 nos três grupos estudados (Figuras 38 e 39).

Com relação às isoformas de NOS, observamos que a mucosa gástrica do grupo PVS apresenta níveis maiores de eNOS e a mucosa dos animais BDL apresenta níveis mais elevados da iNOS em relação aos níveis encontrados na mucosa dos animais controle (Figuras 40 e 41). O tratamento crônico com L-NAME reduziu a expressão da iNOS no grupo BDL, a expressão da eNOS no grupo PVS e inibiu a expressão da iNOS no último grupo. Entretanto, a administração da Indometacina, concomitante com o tratamento crônico com o L-NAME, potencializou a expressão da iNOS nos grupos com HP, e reduziu significativamente ($p < 0.001$) a expressão da eNOS no grupo de animais PVS (Figura 40 e 41).

A Fig. 42 mostra que não há diferença na concentração de ET-1 na mucosa gástrica estimulada com etanol dos três grupos estudados. Entretanto, os animais controles apresentam uma maior concentração de ET-3 em relação aos animais com HP (Figura 43). O tratamento crônico com L-NAME ocasionou uma significativa ($p < 0.001$) redução na concentração de ET-3 apenas no grupo de animais Ctrl, mas a administração da indometacina, concomitante com o tratamento crônico com o L-NAME, aumentou significativamente ($p < 0.05$) a expressão da ET-1 nos grupos de animais Ctrl e BDL, e da ET-3 no grupo de animais Ctrl (Figuras 42 e 43).



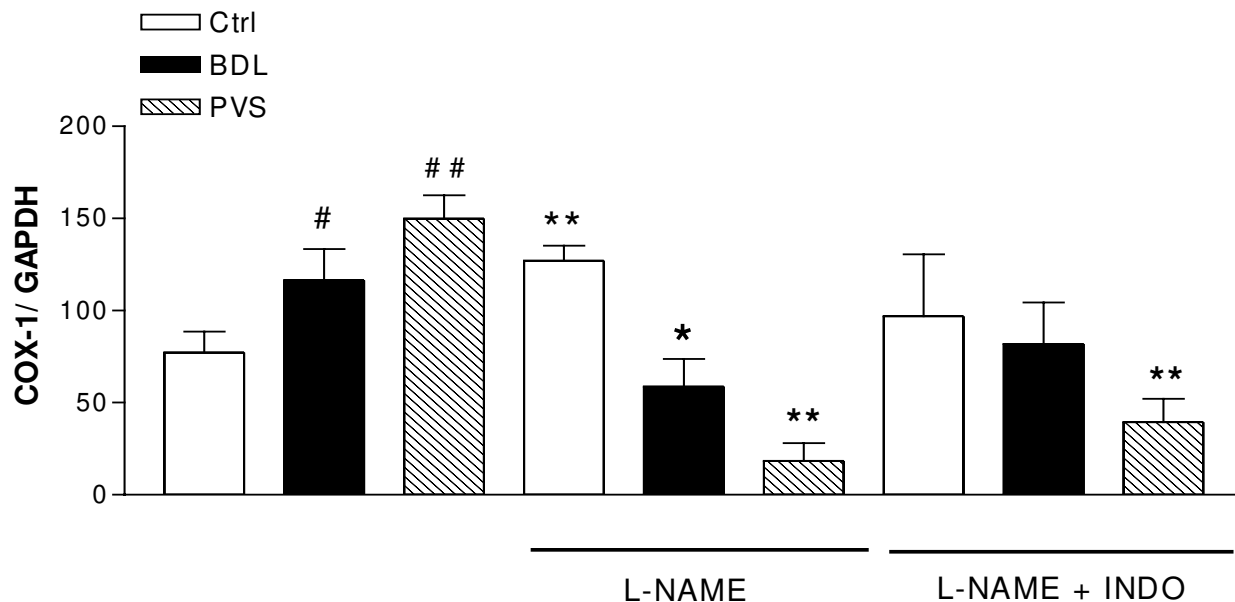
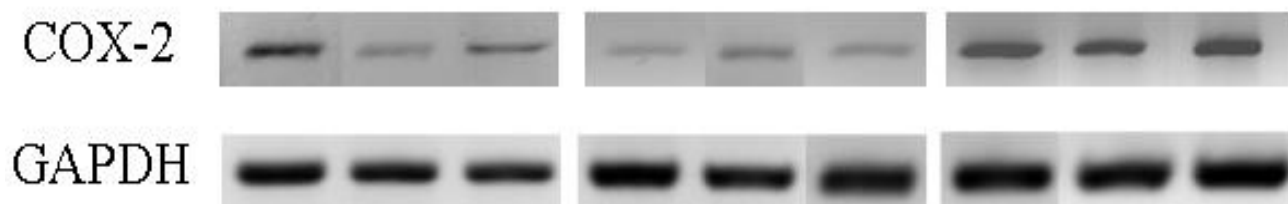


Figura 38– Densitometria da COX-1 na mucosa gástrica de animais Ctrl, BDL e PVS tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + ndometacina (n=6).** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação aos seus respectivos grupos controle sem tratamento. ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$ em relação ao grupo de animais Ctrl.



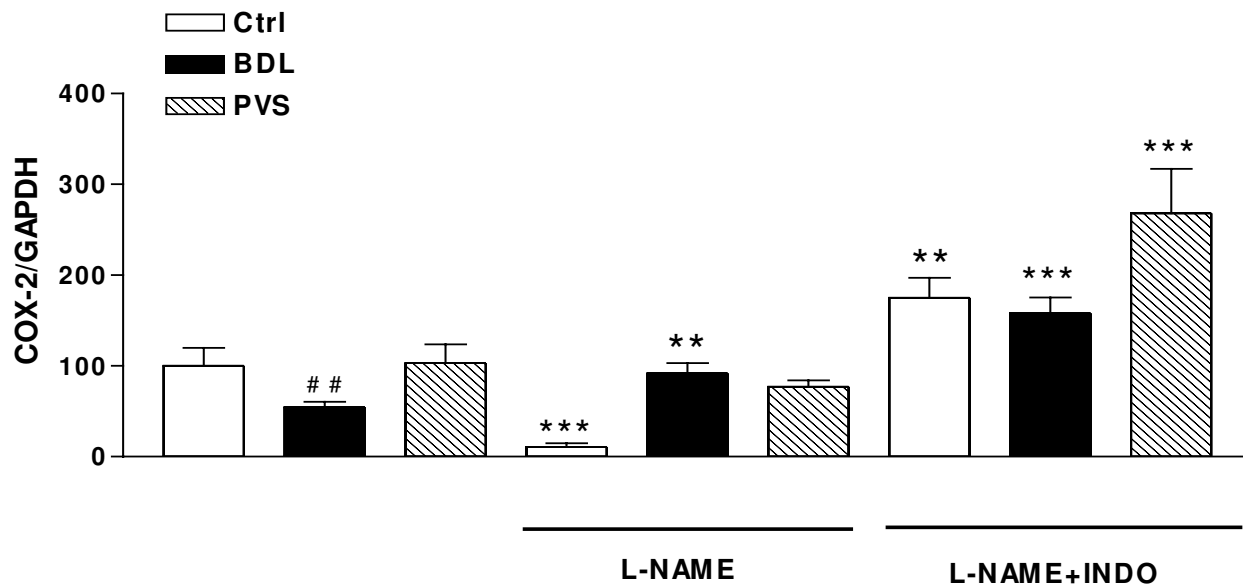
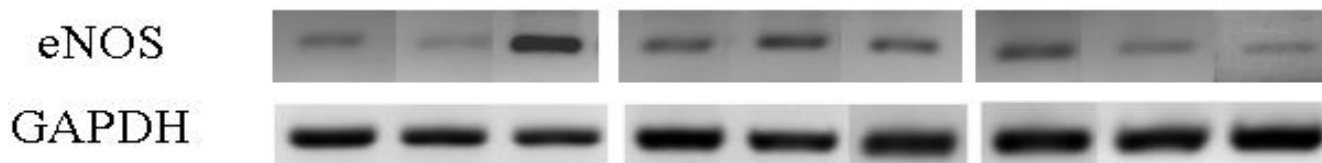


Figura 39– Densitometria da COX-2 na mucosa gástrica de animais Ctrl, BDL e PVS tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina (n=6). *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ em relação aos seus respectivos grupos controle sem tratamento. ## $p < 0,01$ em relação ao grupo de animais Ctrl.



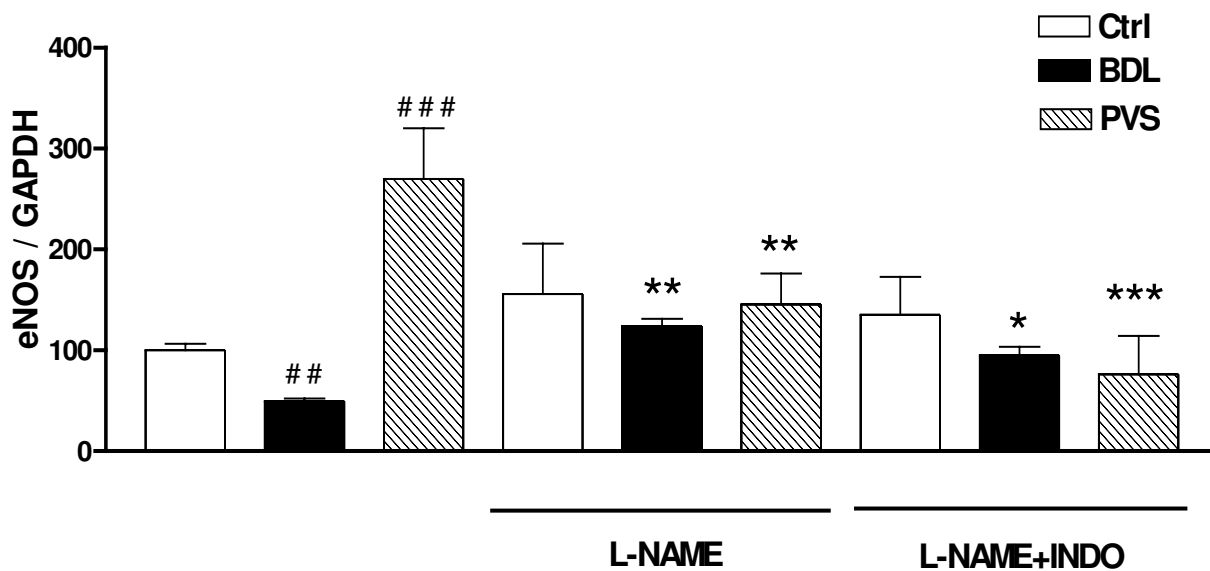
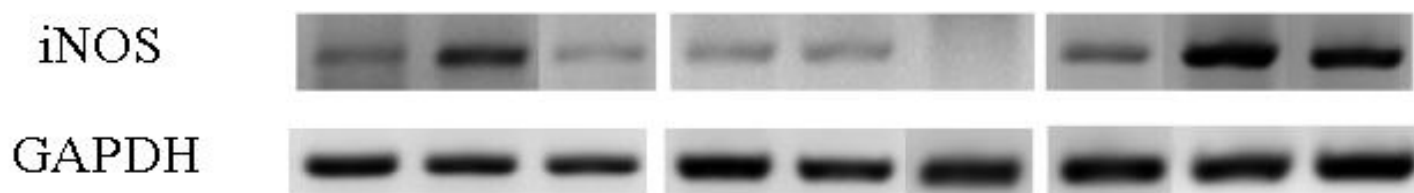


Figura 40 – Densitometria da eNOS na mucosa gástrica de animais Ctrl, BDL e PVS tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina (n=6).*** p<0,001 e * p<0,05 em relação aos seus respectivos grupos controle sem tratamento. ## p<0,001 e ### p<0,001 em relação ao grupo de animais Ctrl.



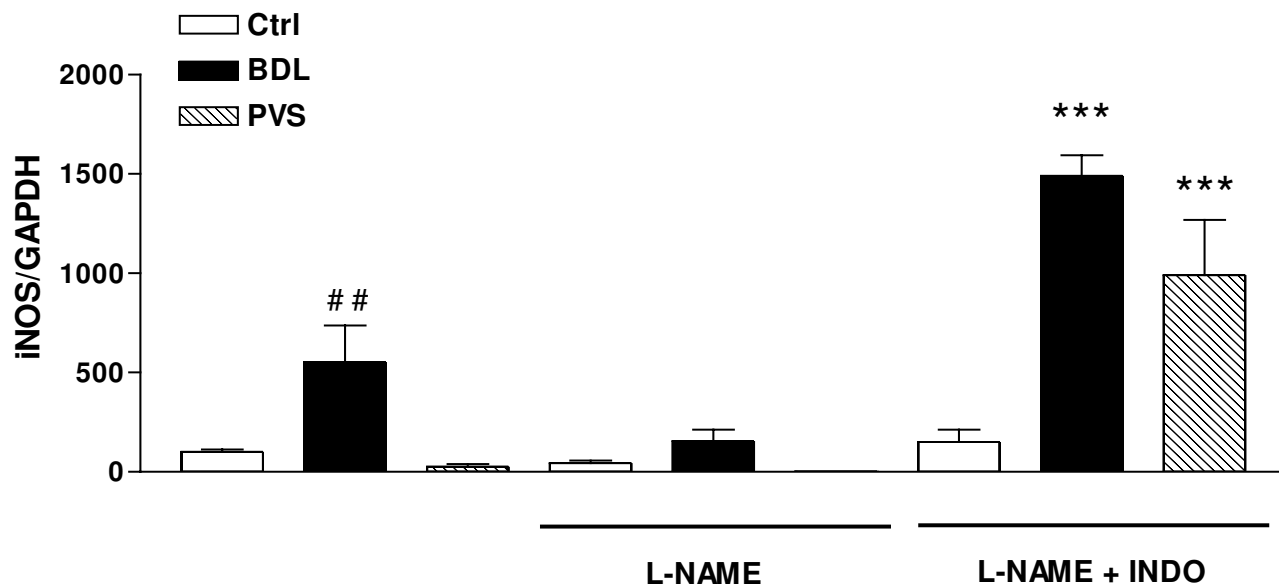


Figura 41– Densitometria da iNOS na mucosa gástrica de animais Ctrl, BDL e PVS tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina (n=6). *** $p < 0,001$ em relação aos seus respectivos grupos controle sem tratamento. ## $p < 0,01$ em relação ao grupo da animais Ctrl.



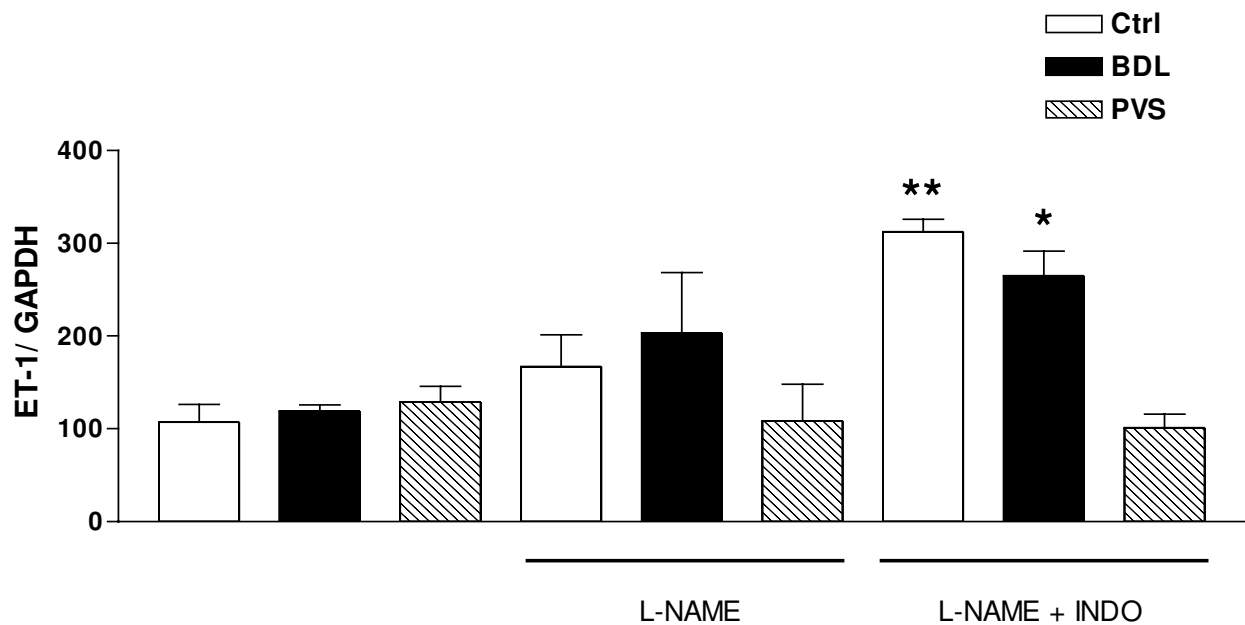
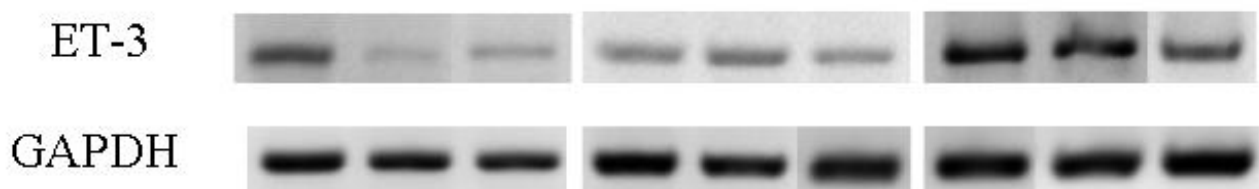


Figura 42 – Densitometria da ET-1 na mucosa gástrica de animais Ctrl, BDL e PVS tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina (n=6). **p<0,001 e * p<0,01 em relação aos seus respectivos grupos controle sem tratamento.



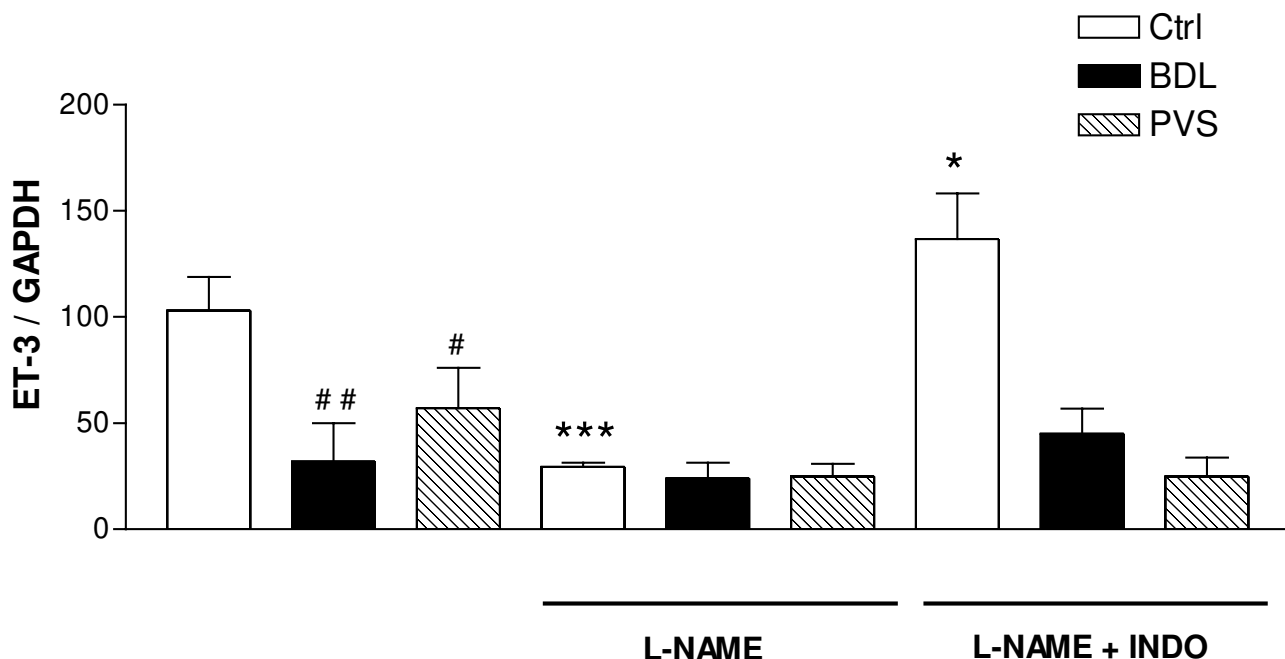


Figura 43– Densitometria da ET-3 na mucosa gástrica de animais Ctrl, BDL e PVS tratados cronicamente com L-NAME e L-NAME + indometacina (n=6). *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ em relação aos seus respectivos grupos controle sem tratamento. ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$ em relação ao grupo de animais Ctrl.

4.17- RT- PCR das isoformas de COX, NOS e ETs na mucosa gástrica submetida ao estímulo lesivo com o etanol de animais cirróticos tratados neonatal com capsaicina

Com relação aos grupos Ctrl e BDL e Ctrl e BDL-capsaicinizados, não houve diferença significativa quanto a expressão das isoformas de COX-1 e COX-2 (Figuras 44 e 45).

Para as isoformas de NOS, observamos que há um aumento significativo (*** $p < 0,001$) na expressão da eNOS (Figura 46) na mucosa dos animais BDL-capsaicinizados, enquanto há uma aumento significativo (* $p < 0,05$) da iNOS no grupo BDL (Figura 47).

Com relação à expressão das endotelinas, a mucosa gástrica dos animais BDL apresentou uma maior expressão de ET-1 (Figura 48) e uma redução na expressão de ET-3 (Figura 49) quando comparada ao grupo de animais BDL-capsaicinizados.

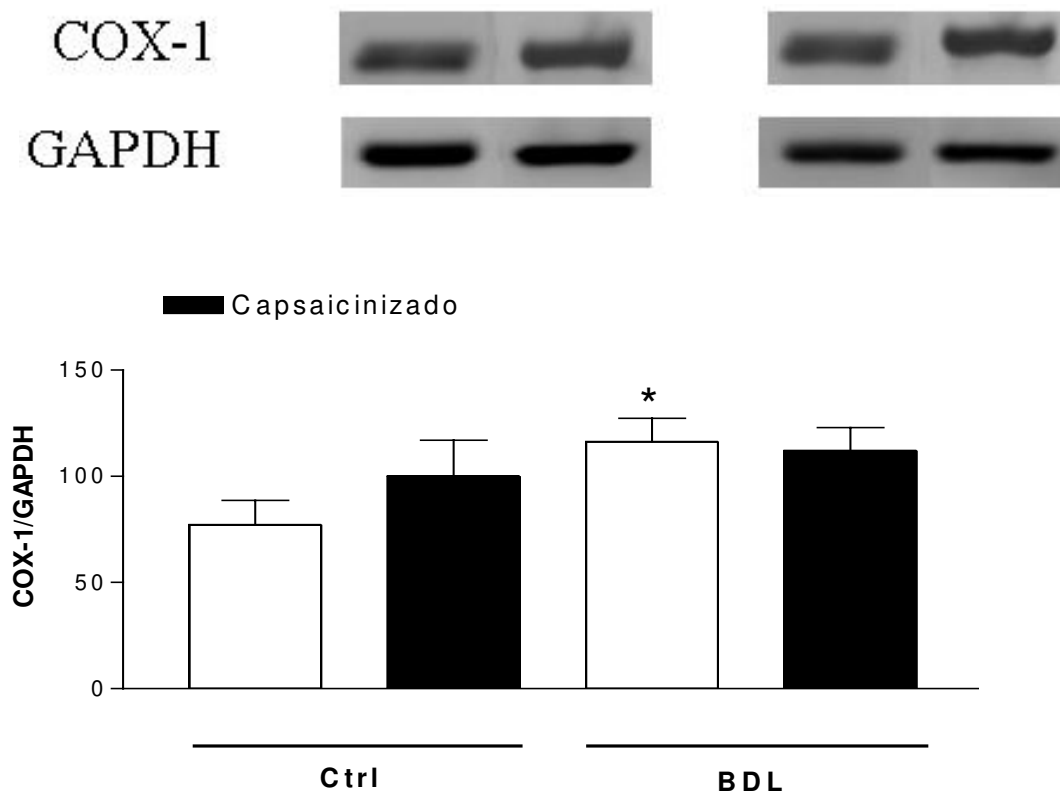
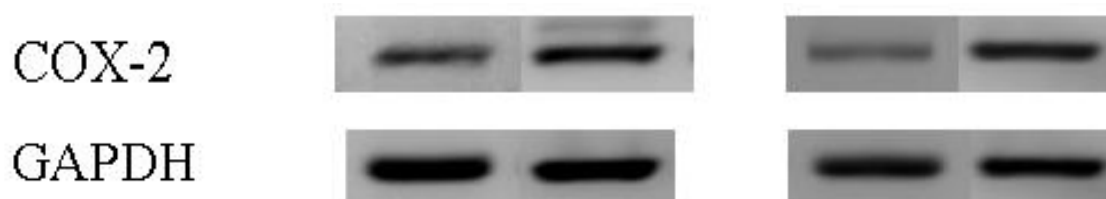


Figura 44– Densitometria da COX-1 na mucosa gástrica de animais Ctrl e BDL, Ctrl e BDL capsaicinizados (n=4). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Ctrl sem tratamento.



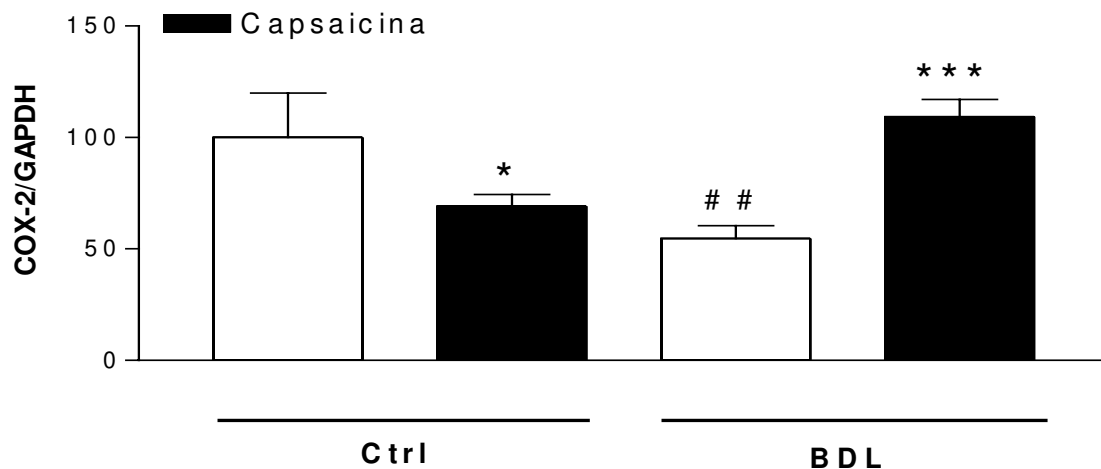


Figura 45– Densitometria da COX-2 na mucosa gástrica de animais Ctrl e BDL Ctrl e BDL capsaicinizados (n=4). *** p<0,001 e * p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle, ## p<0,001 em relação ao grupo Ctrl sem tratamento.

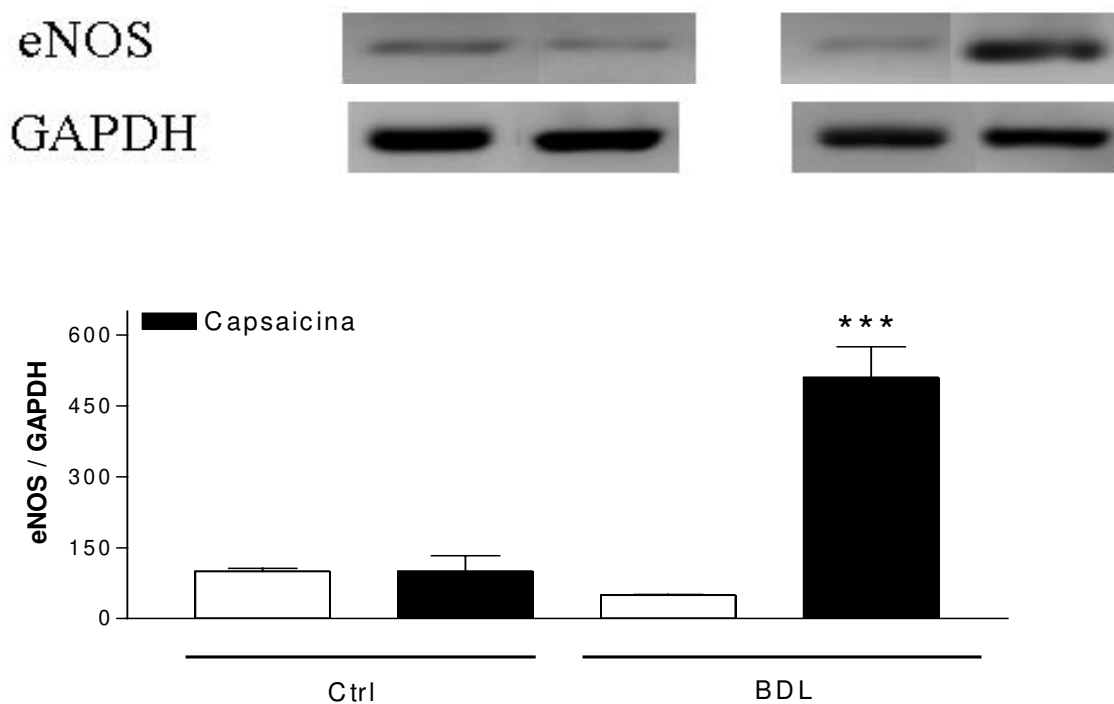


Figura 46– Densitometria da eNOS na mucosa gástrica de animais Ctrl e BDL Ctrl e BDL capsaicinizados (n=4). *** p<0,001 em relação ao seu respectivo grupo controle.

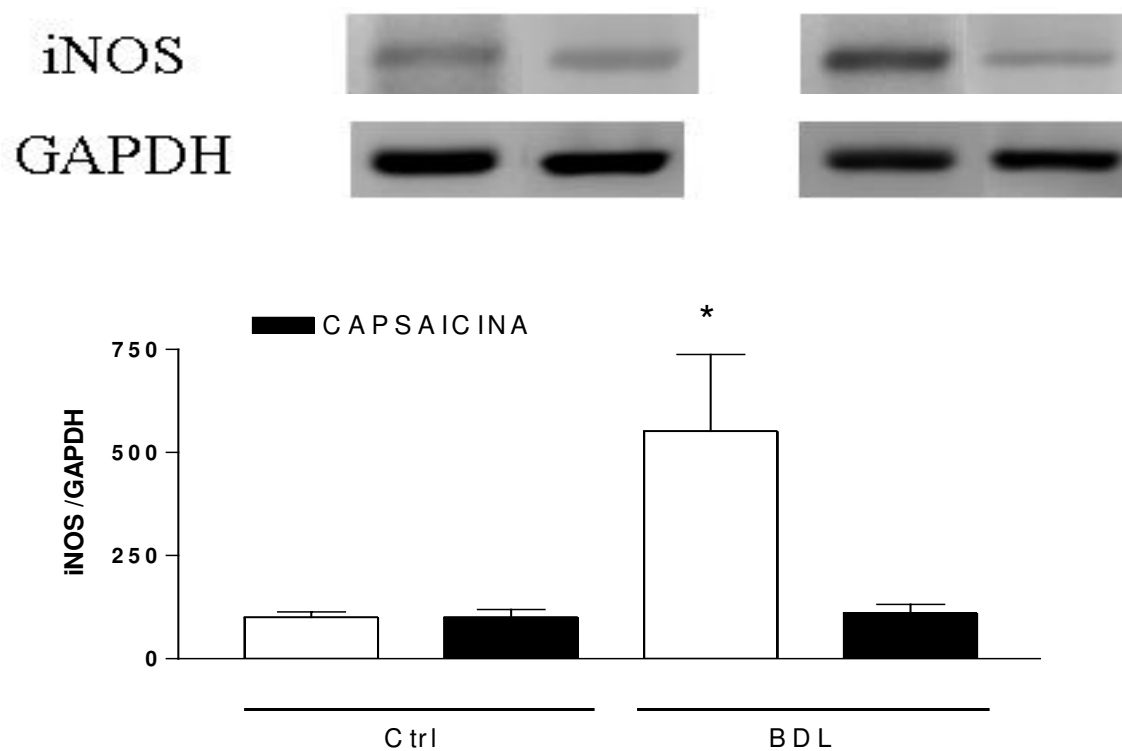
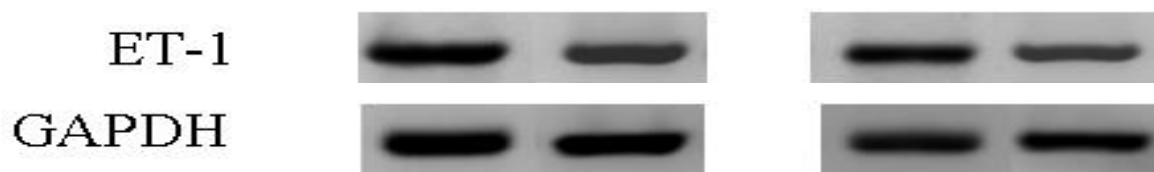


Figura 47– Densitometria da iNOS na mucosa gástrica de animais Ctrl e BDL Ctrl e BDL capsaicinizados (n=4). * $p < 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo controle.



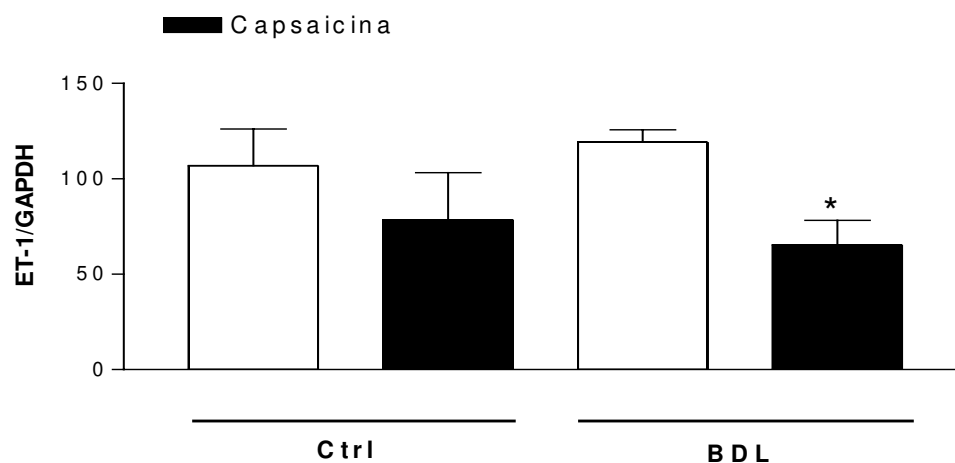


Figura 48 – Densitometria da ET-1 na mucosa gástrica de animais Ctrl e BDL Ctrl e capsaicinizados (n=4). * p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle.

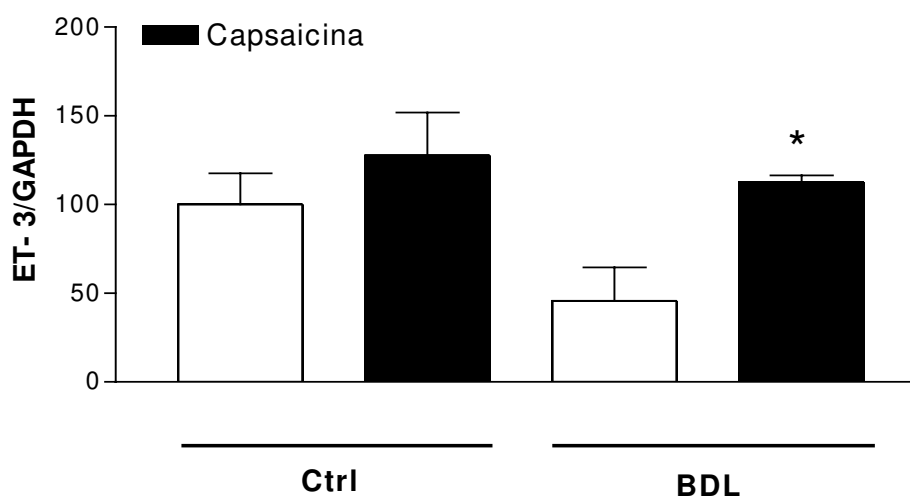
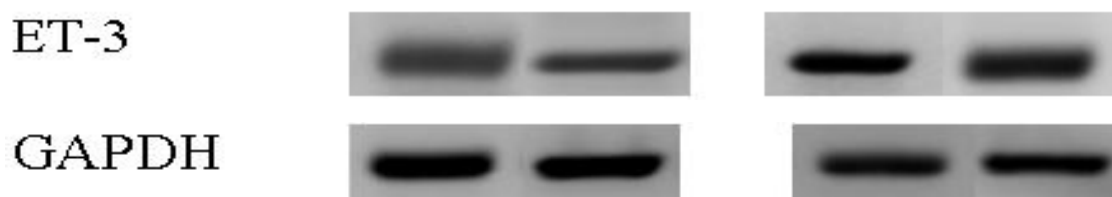


Figura 49– Densitometria da ET-3 na mucosa gástrica de animais Ctrl e BDL Ctrl e BDL tratados neonatal com capsaicina (n=4). * p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle.

4.18- Alterações Histológicas

4.18.1-Histologia do fígado

A cirrose biliar resulta da toxicidade da bilirrubina para os hepatócitos. Ela é histologicamente caracterizada pelo desarranjo parcial da arquitetura do parênquima hepático, com formação de septos fibrosos e alargamento dos espaços portais que mostram intensa proliferação ductal (HUNT, 1980). Os modelos experimentais de cirrose hepática devem mimetizar tais características para que os resultados possam se aproximar ao máximo das alterações observadas na clínica (TSUKAMOTO et al., 1990).

Em nossos achados histológicos, o fígado dos animais controles não apresentou alterações na sua arquitetura hepática, e observou-se a presença de quantidades habituais de colágeno nos espaços-porta (Figura 50 a). Semelhantemente, no fígado dos animais PVS, o espaço-porta apresenta-se morfológicamente dentro dos padrões de normalidade (Figura 50 b). No fígado de animais BDL e BDL-capsaicinizados, observou-se alteração da estrutura lobular hepática com expansão fibrosa dos espaços-porta, emissão de freqüentes septos fibrosos unindo dois ou mais espaços-porta (septos porta-porta) e unindo espaços-porta a veias centro-lobulares (septos porta-centro). Foi observada também a formação de freqüentes nódulos no parênquima, caracterizando cirrose morfológica. Nos septos fibrosos constatou-se a presença de grande quantidade de ductos biliares neoformados, assim como alguns “plugs” de bile, compatíveis com cirrose de causa biliar. Não houve diferença significativa entre os escores observados entre o grupo BDL e BDL- capsaicinizados pela coloração de MASSON (Figuras 50 c e d).

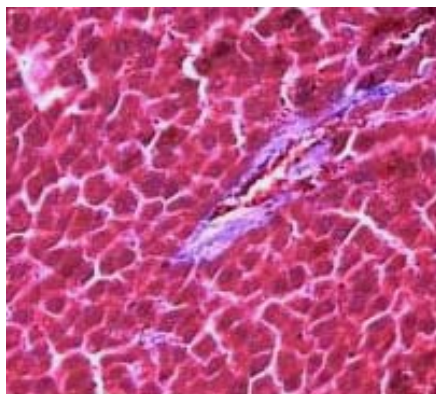


Figura 50-a- (controle): Espaço-porta com quantidade habitual de colágeno. Arquitetura lobular preservada (Masson 200X).

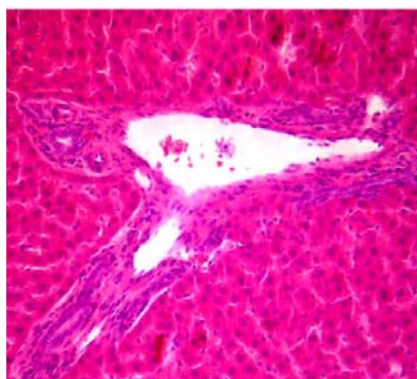


Figura 50-b- (PVS): Espaço-porta morfologicamente dentro dos padrões de normalidade (HE 400X).

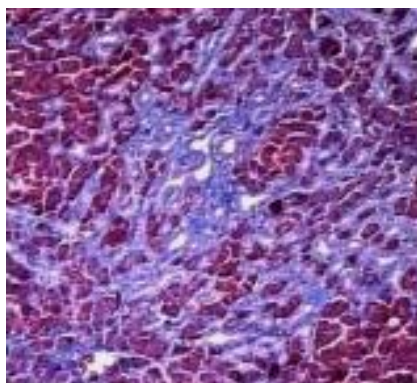


Figura 50-c- (BDL): Distorção da arquitetura lobular com pontes fibrosas no parênquima (Masson 200X).

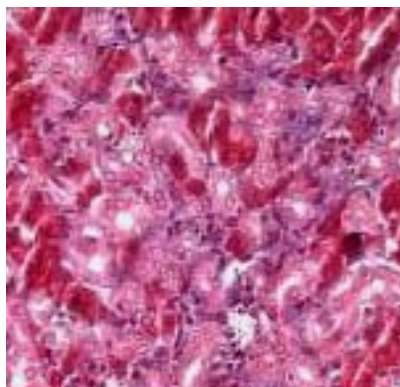


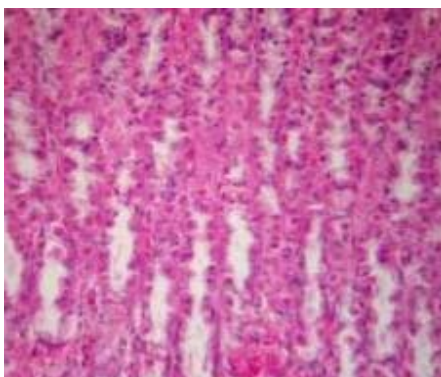
Figura 50-d- (BDL-capsaicina): fibrose portal de padrão biliar (ductos biliares proliferados); Masson 200X.

4.18.2- Histologia da mucosa gástrica

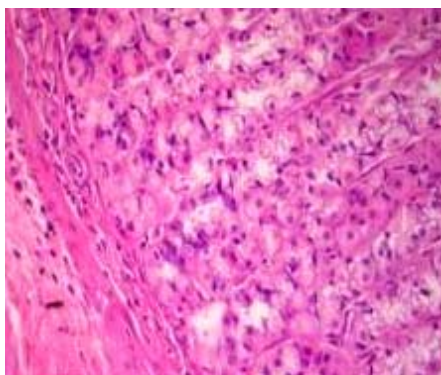
A histologia do tecido gástrico realizada por meio da coloração rotineira por HE mostrou que a mucosa gástrica dos animais Ctrl e Ctrl-capsaicinizados não apresentou alterações histológicas relevantes. Esta mostrou-se, em ambos os grupos, com epitélio preservado, de padrão habitual e ausência de processo inflamatório (Figura 51 a e b). Os animais BDL-capsaicinizados, à semelhança dos controles, também apresentaram mucosa gástrica íntegra e sem alterações histológicas dignas de nota (Figura 51 c).

Os animais cirróticos apresentaram congestão moderada à intensa dos vasos da lâmina própria. Em algumas áreas observa-se ectasia de linfáticos a este nível. A mucosa mostra-se íntegra, porém em algumas áreas há erosões superficiais. Nestes animais, também foi evidente a congestão dos vasos da submucosa (Figuras 52 a e b). Com relação aos animais cirróticos tratados cronicamente com L-NAME, estes não apresentaram diferenças histológicas relevantes quando comparados com os animais cirróticos sem algum tratamento. Além disso, foram observadas focos de erosão superficial da mucosa, congestão dos vasos da lâmina própria, assim como edema e discreto infiltrado inflamatório linfonodo nuclear na submucosa (Figuras 52 c e d).

(a)



(b)



(c)

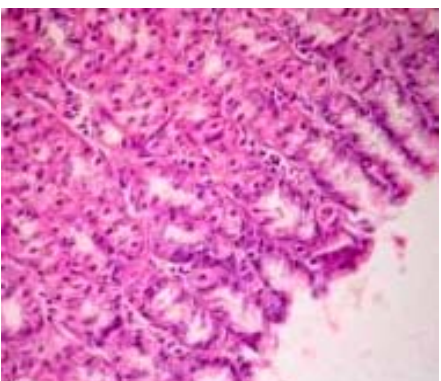


Figura 51- (a) Ctrl, (b) Ctrl-capsaicina e (c) BDL-capsaicina: Mucosa íntegra com epitélio preservado e ausência de processo inflamatório; HE 200 X .

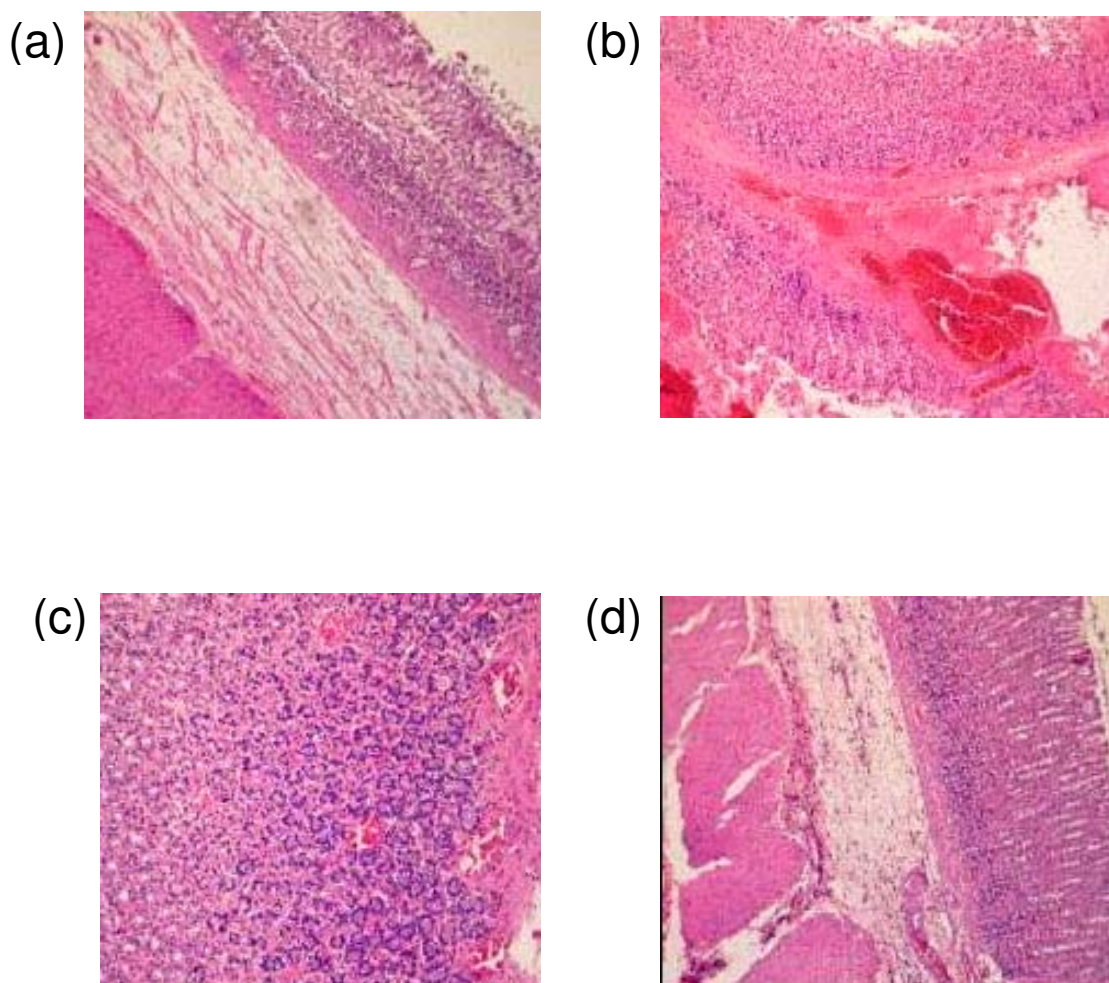


Figura 52- (a) e (b) BDL: erosões superficiais e congestão dos vasos da lâmina própria e submucosa; (c) e (d) BDL-L-NAME: congestão dos vasos da lâmina própria, edema e focos de erosão superficial; HE 100 e 200 X.

4.19- Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) e foram analisados pelo teste de ANOVA de um critério seguido do teste de Student - Newman - Keuls para múltiplas comparações. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

5- DISCUSSÃO

5.1- Resistência da MGHP ao estímulo lesivo com etanol

A mucosa gástrica dos animais com hipertensão portal secundária à cirrose apresentou uma maior susceptibilidade à lesão induzida por estímulo lesivo com o etanol 40%. A medida do fluxo sanguíneo gástrico, realizada por meio de fluxometria por laser doppler, revelou que este grupo possui um fluxo sanguíneo reduzido, e conseqüentemente, uma resposta hiperêmica praticamente nula em comparação ao grupo de animais saudáveis. Por outro lado, no grupo de animais com hipertensão portal pura, a área de lesão após a aplicação tópica de etanol foi considerada insignificante; e o fluxo sanguíneo deste grupo mostrou-se mais elevado do que os fluxos observados nos grupos de animais cirróticos e saudáveis.

A mucosa gástrica hipertensiva portal em modelos animais tem uma maior susceptibilidade aos estímulos lesivos como etanol e aspirina (SARFEH et al., 1988, FERRAZ et al., 1997a). Alguns autores sugerem que há um aumento no fluxo sanguíneo gástrico (OHTA et al., 1994), enquanto outros sugerem que o fluxo está reduzido na GHP (IWAO et al., 1993). Então, existem dúvidas se a condição da GHP é uma congestão ativa ou passiva.

Pelo fato de termos utilizado dois modelos experimentais distintos para induzir hipertensão portal de origem cirrótica e não cirrótica, pudemos observar que o fluxo sanguíneo da MGHP está diretamente relacionado ao modelo de hipertensão portal utilizado. Além disso, a presença do comprometimento do fígado contribui na maior susceptibilidade da mucosa gástrica dos animais cirróticos ao dano lesivo induzido pela aplicação tópica do etanol.

Talvez essa participação do fígado possa ser explicada pelo fato de que há relatos da existência de níveis elevados dos potentes vasoconstrictores ET-1 e do TXA₂ no fígado (XU et al., 2005) e em outros tecidos (ERMERT et al., 2000) durante a endotoxemia.

A resposta da circulação hepática portal está aumentada à ET-1 durante a endotoxemia e a ativação de enzimas chaves como COX, PLA₂ ou TXA₂ sintase pela ET-1, precede a um rápido aumento na liberação do TXA₂ (XU et al., 2005). Esse aumento da resposta vascular portal à ET-1 resulta em uma deficiência na entrega de oxigênio, o que causa o aparecimento de áreas focais de hipóxia no fígado, levando a problemas locais entre a entrega de oxigênio e a demanda de metabólicos (BAVEJA et al., 2002a,b). As células de Kupffer ativadas são capazes de liberar o TXA₂ em resposta ao estímulo com LPS in vitro (URAYAMA et al., 1996; GRACE, 2003) o que sugere uma participação do TXA₂ na patogênese da disfunção circulatória local durante a endotoxemia aguda. Dessa forma, o TXA₂ liberado pelas células de Kupffer, bem como as endotelinas, contribui para o desenvolvimento da hipertensão portal, e, conseqüentemente, nas alterações hemodinâmicas que podem contribuir para a maior susceptibilidade da mucosa gástrica dos animais BDL à injúria induzida por agentes lesivos (YOKOYAMA et al., 2003),

Adicionalmente, a lesão tecidual associada com inflamação, isquemia ou infecção induz a produção de vários mediadores químicos capazes de sensibilizar e ativar nociceptores. Dessa forma, a inflamação e substâncias irritantes podem contribuir para ativação dessas fibras nociceptivas (CATERINA e JULIUS, 2001). O etanol possui a habilidade de afetar as fibras nociceptivas C e A-δ, e desta forma estimular a liberação de taquicinininas como a substância P dos terminais periférico e central destas fibras. Ele também é capaz de potencializar a ativação dos VR1 por outros fatores, como o calor, vanilóides, anandamida e pelos prótons, de maneira dose-dependente (TREVISANE et al., 2002). Em circunstâncias patológicas, a liberação excessiva de peptídeos neurogênicos liberados pelos nervos sensoriais contribui para a inflamação crônica associada com as doenças inflamatórias intestinais e outras (CAMPBELL, 1993; LUNDBERG, 1993).

5.2- Participação do óxido nítrico e prostaglandinas na patologia da GHP

A inibição prolongada da síntese de óxido nítrico pelo L-NAME produziu aumento considerável na PAM de animais Ctrl, como esperado (SVENTEK et al., 1996). Porém, o tratamento crônico com L-NAME não corrigiu o quadro de hipotensão arterial encontrado nos animais com HP.

A inibição crônica da síntese do NO potencializou a área de lesão induzida pela aplicação tópica de etanol na mucosa gástrica animais controle e PVS, como também promoveu uma redução do fluxo sanguíneo gástrico destas mucosas. Isso indica que, apesar de o tratamento crônico com o inibidor da NOS não ter produzido qualquer efeito sobre a pressão arterial média dos animais com HP, a produção local de NO foi afetada conforme esperado.

Além disso, a inibição prolongada da síntese de NO não modificou a gravidade das lesões induzidas pelo etanol no grupo de animais BDL quando comparados ao grupo de animais BDL que não receberam o tratamento com L-NAME e não alterou significativamente o fluxo sanguíneo deste grupo, nem mesmo quando a concentração do etanol foi reduzida à metade.

Alguns autores indicam o efeito pró-apoptótico do NO em vários tipos celulares (GHAFOURIFAR et al, 2001; AUKRUST et al., 1999; MESSMER e BRÜNE, 1996). Em fibroblastos cardíacos de ratos, a iNOS é a responsável pela apoptose dependente de NO (TIAN et al., 2002). Adicionalmente, OHTA et al., (1997) afirmam que a superexpressão de NO, na mucosa gástrica de animais com hipertensão portal, é a chave para a maior susceptibilidade ao dano lesivo.

Entretanto, nossos resultados, obtidos após o uso crônico do L-NAME, sugerem que o NO não é o principal mediador envolvido na maior susceptibilidade ao dano lesivo apresentada pela mucosa gástrica de animais cirróticos, e, pelo contrário, o NO exerce um papel protetor na mucosa gástrica dos grupos de animais com hipertensão portal pura e sadios.

De acordo com PIQUET et al. (1989;1993), a perfusão sanguínea da mucosa gástrica é dependente da síntese de NO, pois ocorre uma redução no fluxo sanguíneo basal quando há um bloqueio da NOS. O NO interage com neuropeptídios de neurônios aferentes e regula o tônus vascular (TOPPERMAN e WHITTLE, 1992). A estimulação desses neurônios evoca uma hiperemia da mucosa devido a liberação do CGRP que ativa a liberação do NO, o qual no fim media o efeito vasodilatador. Esta resposta hiperêmica da mucosa é relatada como um mecanismo de defesa contra agressões (KONTUREK et al.,

1994), sugerindo então que o NO está envolvido em um sistema de emergência desencadeado por um estímulo nocivo moderado, com objetivo de defender a mucosa de mais ataques.

Embora seja sugerido que os níveis elevados de NO, na vasculatura periférica, sejam os responsáveis pela hipotensão sistêmica e pela circulação hiperdinâmica, a liberação do NO está reduzida nos fígados cirróticos, devido a alterações na função e diminuição da expressão da eNOS, em diferentes modelos experimentais de cirrose (BAVEJA et al., 2002a).

Nossos dados corroboram com os de IWAKIRI et al. (2002), os quais induziram HP através da estenose calibrada da veia porta, em ratos que sofreram deleção gênica da eNOS e eNOS/iNOS e, apesar da deleção gênica, estes animais continuaram a desenvolver circulação hiperdinâmica. Além disso, a inibição crônica do NO pelo L-NAME atenuou, mas não corrigiu a circulação sistêmica hiperdinâmica em desvios porto-cavais de ratos (BANDI et al., 1999).

Com relação à administração de indometacina, esta potencializou tanto o efeito lesivo como a redução do fluxo sanguíneo obtidos pela inibição prolongada de NO nos grupos com HP. Entretanto, a adição de indometacina, após o tratamento crônico com o L-NAME, reduziu de forma significativa a área de lesão no grupo de animais controles, sendo esse resultado o contrário do que era esperado. Esse foi um resultado interessante e associado a um aumento da resposta microcirculatória gástrica após exposição ao etanol. É importante saber que a PGE₂ tem efeito bifásico dependendo da situação circunstancial: ação protetora e ação deletéria sob condições pró-inflamatórias onde outros mediadores inflamatórios estão sendo liberados concomitantemente (HASE et al. 2003; MURATA et al., 1997).

Recentes evidências sugerem que a interação dinâmica, entre os diversos mediadores endógenos, resulta em um fenômeno no qual, quando um elemento é supresso, outros elementos assumem a sua função. Por exemplo, a administração prolongada de aspirina, que conseqüentemente reduz a síntese gástrica de prostaglandinas, está associada com o aumento da expressão de eNOS na mucosa gástrica (FISCHER et al., 1999).

TREVISI et al. (2002) também demonstraram que a ET-1 ativa a cascata do ácido araquidônico, favorecendo a síntese de prostanóides como o TXA₂ que possui uma potente ação vasoconstrictora e está presente na circulação portal (XU et al., 2005). Além disso, a própria ET-1, que também é uma potente vasoconstrictora, causa aumento na resistência portal (MIGOH et al., 2000).

As prostaglandinas são liberadas do endotélio em resposta a um estímulo humoral ou mecânico e podem afetar profundamente a resistência vascular periférica e intra-hepática (BIRNEY et al., 2003). No fígado, a COX-2 e a produção de prostaglandinas têm sido implicadas na regeneração hepática, remodelamento da matrix hepática e hipertensão portal (NUNEZ et al., 2003). A administração crônica de PGE1 foi citoprotetora para o fígado e para a mucosa gástrica de ratos cirróticos (BECK et al., 1993). A expressão de COX-2 e PGI₂ no tecido gástrico está aumentada na hipertensão portal (WU et al., 2003). Entretanto, PGI₂, como um mediador inflamatório moderado, danifica a mucosa gástrica por expandir vasos e outros mecanismos na hipertensão portal. O conteúdo de 6-keto-PGF1 alpha (um metabólito estável da prostaciclina) na região do fundo na mucosa gástrica foi significativamente maior em pacientes cirróticos com GHP do que naqueles sem GHP (OTHA et al., 1995). O tratamento com prostaciclina aumenta a lesão gástrica induzida pelo etanol na mucosa gástrica hipertensiva portal (KISHIHARA et al., 2002). Por isso, mudanças induzidas pelos eicoisanóides sobre a resposta estrutural e funcional da vasculatura e do fígado podem ser importantes fatores na contribuição do desenvolvimento da GHP.

5.3- Participação das endotelinas na patologia da GHP

De acordo com MORALES et al. (1992) a infusão de ET-1 é mais tóxica para a microvasculatura gástrica do que a ET-3, mas tanto a ET-1 quanto a ET-3, dependendo da dose administrada, potencializam de maneira similar, a área de lesão induzida pela aplicação tópica de etanol na mucosa gástrica de ratos (WALLACE et al., 1989).

Em nossos resultados, a administração exógena da ET-1 e do antagonista seletivo de seu receptor ETA não alterou a área de lesão de mucosa gástrica induzida pela aplicação tópica de etanol no grupo de animais Ctrl e BDL.

THAKALI et al. (2004) mostraram que a dessensibilização à ET-1 ocorre via a ativação do receptor ETA de artérias. Talvez isso possa explicar a falta de alteração na área de lesão de mucosa, do grupo de animais BDL e Ctrl, após a administração exógena de ET-1 e do antagonista de receptor ETA.

Entretanto, a administração exógena de endotelina ET-3 e o tratamento com o antagonista seletivo de seu receptor ETB (BQ 788) promoveu uma redução na área de lesão, da mucosa gástrica dos ratos BDL e Ctrl, acompanhada por um aumento do fluxo sanguíneo gástrico.

Existem dois subtipos de receptor ETB, o subtipo ETB₁ e o subtipo ETB₂ e dois subtipos de receptor ETA, o subtipo ETA₁ e o subtipo ETA₂ (YONEYAMA et al., 1995). O BQ 788 possui uma maior seletividade para o receptor ETB₂ do que para receptor ETB₁ (YONEYAMA et al., 1995).

As células endoteliais expressam restritamente o receptor ETB, enquanto que as células do músculo liso vascular (CMLV) expressam tanto o receptor ETA quanto o ETB (HONORE et al., 2005). Segundo SHYAMALA et al. (1994), o receptor ETB₁ é ausente em ratos, bovinos e suínos, sendo expresso apenas em humanos. Por isso, poderíamos supor que o bloqueio do receptor ETB₂ das CMLV, pelo BQ788, ocasionou o aumento do fluxo sanguíneo gástrico por relaxar as veias que inervam o estômago.

As artérias expressam predominantemente o receptor ETA, enquanto que as veias expressam tanto o receptor ETA quanto o receptor ETB (THAKALI et al., 2004); a ET-3 possui um efeito ionotrópico positivo via ativação do receptor ETA (NOROTA e ENDOH, 1996) e altas doses de ET-3 ativa receptor ETA₁ em traquéia de coelhos e cobaias (YONEYAMA et al. 1995). Então, podemos sugerir que a administração exógena de ET-3 ativou o receptor ETA das artérias que inervam o estômago, o qual estava dessensibilizado apenas à ET-1, fazendo com que a mucosa gástrica dos animais BDL voltasse a responder contra o estímulo lesivo do etanol.

Adicionalmente, poderíamos sugerir que seria, possivelmente, o receptor ETB₂ o subtipo de receptor ETB expresso nos neurônios sensoriais. Dessa forma, a inibição desse receptor estaria bloqueando a liberação da potente vasodilatadora, a taquicinina substância P, mas seriam necessários estudos futuros para tentar provar essa hipótese.

Diferentemente, administração exógena das ET-1 e ET-3, bem como o tratamento prévio com os antagonistas seletivos de seus receptores ETA ou ETB₂, promoveu uma redução no fluxo sanguíneo e aumentou significativamente a área de lesão gástrica nos ratos PVS.

Entretanto, no grupo de animais PVS, os receptores ETA e ETB, principalmente o receptor ETA, estão envolvidos na manutenção do fluxo sanguíneo elevado observado à mucosa gástrica deste grupo. Este fluxo sanguíneo elevado promoveu uma proteção à mucosa gástrica deste grupo frente ao estímulo lesivo com o etanol.

KURIHARA et al. (1992) sugerem que reduções no fluxo sanguíneo gástrico são principalmente causadas pela ET-1 via ativação do receptor ETA, pois o uso do antagonista seletivo de receptor ETA, BQ123, inibe esta redução; enquanto que a redução no fluxo do tecido hepático é causada principalmente pela ET-3, mas não pela ativação do receptor ETA.

Várias linhas de evidência têm sugerido que os receptores ETB são os responsáveis por mediar o extravasamento de plasma induzido pelo Bosentan (um antagonista não seletivo de receptores de ETs) e pelo o efeito endógeno das ETs. Um estudo anterior mostrou que um antagonista seletivo de receptor ETB, RO 46-8443, mas não um antagonista seletivo de receptor ETA, BQ 123, foi capaz de prevenir o extravasamento de proteína plasmática na dura mater (BRANDLI et al., 1995). Além disso, o efeito do sarafoxin S6c, um agonista seletivo de receptor ETB, foi prevenido pelo espantide, um antagonista seletivo de receptor de taquicininas, sugerindo que a ativação do receptor ETB não causa um aumento direto na permeabilidade, mas induz extravasamento de proteína plasmática através da liberação de substância P de fibras perivasculares (BRANDLI et al., 1995).

Adicionalmente, as ETs podem evocar a liberação de SP pela despolarização de neurônios no corno dorsal da raiz espinhal (YOSHIZAWA et al., 1989) e do hipotálamo (CALVO et al, 1990); elas podem também aumentar a liberação de SP e CGRP em culturas de neurônios sensoriais de ratos (DYMSHITZ e VASKO, 1994) e exercer outras ações pré-sinápticas (WIKLUND et al., 1988).

Recentes estudos farmacológicos sugerem que quando as ETs são liberadas em tecidos periféricos, elas podem atuar diretamente sobre seus receptores ETA expressos em neurônios sensoriais e sobre seus receptores ETB expressos em células satélites do gânglio da raiz dorsal ou em células de Schwann não mielinizadas. Além disso, em alguns tecidos, a expressão do receptor ETA pode desempenhar um papel na sinalização aguda ou neuropática da dor, enquanto a expressão do receptor ETB pode estar envolvida na transmissão da dor inflamatória crônica (POMONIS et al., 2001; GOKIN et al., 2001; ZHOU et al., 2001; DOGULU et al., 2003).

5.4- Participação dos neurônios sensoriais na patologia da GHP

Alguns trabalhos sugerem que a hipertensão portal e a circulação hiperdinâmica podem ser prevenidas pelo tratamento neonatal com capsaicina (CASINI et al., 1990; LEE et al., 1993; LI et al., 2003). Desde de que a GHP é uma entidade subclínica da hipertensão portal, a normalização da hipertensão portal poderia prevenir o seu desenvolvimento.

Em nossos resultados, o tratamento neonatal com capsaicina normalizou na pressão portal e a pressão arterial dos animais cirróticos, inibiu a formação de ascite e reduziu significativamente a área de lesão induzida pela aplicação tópica do etanol, apesar de não ser observada uma significativa resposta hiperêmica. Esse fato pode ser explicado pelo fato de que alterações na permeabilidade vascular gástrica não necessariamente afetam a integridade macroscópica da mucosa gástrica (CALATAYUD et al, 1998).

Paralelamente, o uso do antagonista seletivo de receptor NK1 de taquicininas, promoveu uma melhora na resposta microcirculatória gástrica dos animais BDL frente ao estímulo do etanol que resultou em uma significativa redução na área de lesão.

É interessante dizer que os neurônios aferentes primários exercem um efeito gastroprotetor independente da resposta hiperêmica. Sugere-se que este efeito ocorra via ativação do receptor NK₂ de taquicinas e do receptor CGRP1 (HOLZER, 1998a).

Os resultados de fluxo sanguíneo e de lesão de mucosa obtidos para o grupo de animais BDL, após o tratamento neonatal com capsaicina e o tratamento com o antagonista seletivo de receptor NK1, assemelham-se aos resultados observados nos ratos BDL após a administração do antagonista seletivo de receptor ETB de endotelinas, corroborando com os achados de BRANDLI et al (1995). Estes autores sugerem que as endotelinas, especificamente ET-3 no SNC, interagem com seus receptores ETB no SNC (espinha dorsal, cérebro e meninges) e SNSomatosensorial (neurônios sensoriais) para promover a liberação de taquicinas (especificamente, a substância P) dos neurônios nociceptivos (MILNER et al., 2000). Estes neuropeptídeos interagem com seus receptores presentes nas fibras do SNA (hipotálamo e medula) que controlam as funções do TGI (POMONIS et al., 2001; YONEDA et al, 2001).

As endotelinas ET-1 e ET-2 possuem uma maior afinidade pelo receptor ETA do que a ET-3, entretanto todas as três ETs possuem uma afinidade similar ao receptor ETB (THAKALI et al, 2004). A ativação do receptor ETA estimula a formação de AMPc, enquanto a ativação do receptor ETB inibe a formação do AMPc e aumenta o turnover do fosfoinositol e dos estoques de cálcio intracelular (POMONIS et al., 2001). É interessante dizer que o influxo do cálcio extracelular é um pré-requisito para a liberação de neuropeptídeos. Sem o cálcio extracelular, os neuropeptídeos não são liberados das terminações nervosas dos neurônios sensoriais quando estas terminações são despolarizadas (MAGGI, 1993). Então, o aumento do influxo de Ca^{+2} induzido pelas ETs poderia potencializar a liberação de neuropeptídeos (DYMSHITZ e VASCO, 1994)

Por isso, podemos sugerir que as endotelinas podem estar liberando a taquicina SP das fibras sensoriais via ativação de seu receptor ETB expresso nestas fibras (POMONIS et al, 2001, DOGULU et al., 2003). Esses neuropeptídeos podem agir indiretamente, ao interagirem com seus receptores específicos presentes nas fibras do SNA que controlam as funções do TGI; e/ou podem agir diretamente, ao se ligarem aos seus receptores específicos presentes nas células endoteliais dos vasos sanguíneos locais dos

sistemas digestivo e hepático (BANG et al., 2003, 2004). Dessa forma, a liberação dos neuropeptídeos evocada pelas ETs, como também as próprias ETs, estariam atuando em conjunto, induzindo o aumento da pressão portal, vasodilatação sistêmica, extravasamento de proteínas plasmáticas, entre outros (Figura 53)

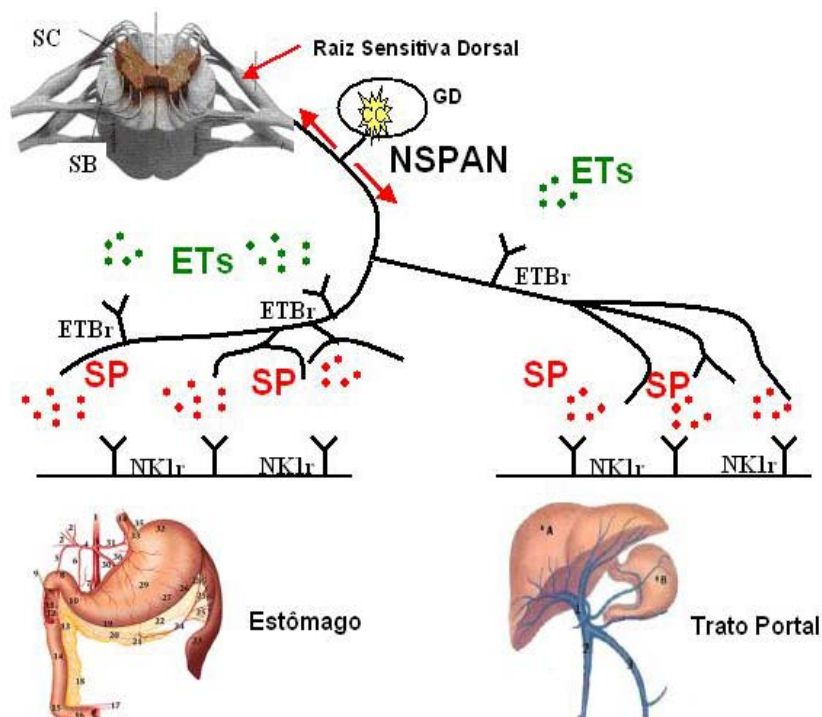


Figura 53- Mecanismo de ação proposto para a interação entre as endotelinas e os neuropeptídeos no controle hemodinâmico do TGI durante a hipertensão portal

5.5- Participação das endotoxinas na GHP

HELLER et al., (2000) descreveram que obtiveram 50% de mortalidade dos animais BDL após uma única administração de LPS na dose de 1.5 mg/Kg. Em nossos resultados, a administração de endotoxina nas doses (0.1, 0.3, 1.0 mg/Kg) induziu 100% de mortalidade nos animais cirróticos. Isto ocorreu entre um período de 1-3 horas após a administração do LPS. Os animais, em sua maioria, apresentaram sangramento difuso intenso pelas vias aéreas e urinárias. Vale a pena salientar que pode ocorrer a reconecção do

ducto biliar, e alguns animais não venham a se tornar cirróticos. Nossos experimentos, por sua vez, foram realizados com animais considerados realmente cirróticos após confirmação por inspeção clínica.

Segundo OTTESEN et al. (2001), o aumento da sensibilidade e mortalidade de animais BDL após a injeção de LPS pode ser devido ao fato que o LPS causa um aumento na síntese de NO, bem como uma rápida infiltração no fígado por neutrófilos ativados que formam superóxidos. Ânions superóxidos reagem com o NO para formar peroxinitritos e outras espécies reativas de nitrogênio, que acarretam na S-nitrosação de tióis e nitratação de proteínas hepáticas (KOPPENOL et al., 1992; SCORZA et al., 1998).

Vários estudos em ratos tratados com LPS têm evidenciado que a hiporreatividade a vasoconstrictores *in vitro* e a hipotensão resistente a vasopressores *in vivo* são relacionadas a uma superprodução de NO pela iNOS (PIEPOT et al, 2002; SANDERS et al, 1999). Evidências baseadas nos efeitos vasoconstrictores dos inibidores de NO e os níveis elevados de metabólitos de NO no sangue, sugerem um importante papel para a produção excessiva de NO no choque séptico em humanos (STOCLET et al., 1999; AVONTUUR et al., 1999).

Estudos em ratos exdotoxêmicos demonstraram um aumento na mortalidade quando todas as formas de NOS foram inibidas pelo L-NAME (HALLEMEESCH et al., 2003; PERNET et al., 1999). Isto pode refletir na indispensabilidade do NO durante a sepsis. Recentes evidências experimentais indicam que o NO é essencial durante a endotoxemia devido seu efeito estimulador sobre a síntese e divisão de proteínas (VISSERS et al., 2004), e que a inibição da síntese de NO, em ratas grávidas, teve consequências teratogênicas (TIBONE e CLEMENTINI, 2004).

A administração de uma dose única de LPS provocou um significativo aumento dose-dependente na área de lesão de mucosa gástrica dos animais Ctrl e PVS após o estímulo lesivo com o etanol, como também ocasionou uma redução no fluxo sanguíneo gástrico. Entretanto, a administração crônica da endotoxina reduziu significativamente a área de lesão ocasionada pelo etanol nos grupos de animais Ctrl e PVS, e induziu uma melhora na resposta do fluxo sanguíneo gástrico. Vale salientar que foi observada uma leve

redução na área de lesão de mucosa gástrica no grupo de animais PVS tratados com uma única dose de LPS (3mg/Kg), indicando, talvez, que esta dose de LPS já começa a induzir uma certa tolerância ao estímulo lesivo do etanol.

De acordo com HINOHARA et al. (2003) a administração intraperitoneal de endotoxina induz tolerância a bloqueadores neuromusculares não-despolarizantes em ratos. Adicionalmente, FERRAZ et al. (1997b) observaram que a administração intraperitoneal de endotoxina induz tolerância ao etanol em ratos saudáveis, por uma via dependente das prostaglandinas. Eles sugerem que a endotoxina induz a expressão da COX-1 e da COX-2, mas que a produção de PGs ocorreria via COX-1. Os animais PVS possuem uma maior expressão da COX-1 em relação aos animais saudáveis (HOU et al., 1998) e talvez isso explique o fato deste grupo já começar a apresentar uma leve tolerância após a dose única de LPS de 3mg/Kg.

Alguns trabalhos revelaram que a estimulação prévia da mucosa gástrica com um agente irritante leve resulta em aumento da resistência a um segundo contato subsequente de outro agente irritante, mecanismo esse, denominado de adaptação reativa (OLIVERO e GRAHAN, 1992). O mecanismo não está bem certo, mas inclui um aumento nos mecanismos compensatórios através do NO ou neurônios entéricos que podem mediar a resposta defensiva da mucosa (WALLACE e BELL, 1996; FISCHER et al., 1999) ou corrigindo as taxas de proliferação (BAUMGARTNER, 1986) ou perda celular (HAWKEY, 2000).

Respostas adaptativas têm sido reportadas, mas são menos evidentes do que para o uso de antiinflamatórios não esteroidais e podem depender do intervalo da dose em relação à meia vida de eliminação da droga (SKELJO et al, 1996). Além disso, TAKEUCHI et al. (2003) ressaltaram que após a administração da indometacina, bem como de endotoxinas, ocorre uma superexpressão da COX-2 como um mecanismo compensatório para repor a redução das PGs, devido à inibição da COX-1 pela endotoxina. Esse mecanismo é proposto para explicar a falta de propriedade ulcerogênica dos inibidores seletivos da COX-1.

5.6- Papel do pH intragástrico na lesão induzida pelo etanol na GHP

Os resultados obtidos sugerem que um aumento no valor do pH da solução de HCl produziu um aumento na resistência da mucosa gástrica à lesão induzida pela aplicação tópica de etanol. De acordo com CHEUNG et al. (2001) a secreção ácida gástrica está diminuída em alguns pacientes com cirrose, e, particularmente naqueles com GHP, o que resulta em um pH mais básico nessas mucosas, como ocorre em um subgrupo de pacientes infectados pelo *H. pylori* (ANNIBALE et al., 2003).

Uma relação inversa entre a secreção ácida gástrica e a hipertensão portal tem sido encontrada experimentalmente e em alguns pacientes, mas não há associação com a severidade da doença e a etiologia da cirrose. A congestão crônica da mucosa, secundária à hipertensão portal, provavelmente desempenha algum papel, mas vários fatores hormonais não conhecidos também afetam diretamente a secreção gástrica (FRASER et al., 1992).

Segundo TAKEONO et al. (2004), quando há uma diminuição gradativa do pH de uma solução utilizada para estimular as células epiteliais gástricas, há um aumento na resistência e diminuição da permeabilidade trans-epitelial, que evita a passagem do ácido para a mucosa. Este efeito é bloqueado pela indometacina, mas não por inibidor seletivo de COX-2, indicando que este efeito é modulado pelas PGE₂ derivadas da COX-1.

A circulação hiperdinâmica, observada na presença de hipertensão portal experimental, é acompanhada de produção e liberação excessiva de NO (KAVIANI et al., 1997). Sabe-se ainda que tanto o NO exógeno quanto o endógeno são capazes de inibir a liberação de histamina a partir de células cromafins-like (KATO et al., 1998). Essa potencial redução na liberação de histamina pode resultar em elevação do pH da mucosa secundária a uma secreção ácida gástrica diminuída (FREITAS et al., 2004); uma vez que o estímulo com histamina aumentou a secreção ácida de pacientes cirróticos (OSTROW et al., 1960). A secreção de muco também estabiliza o gradiente de pH pré-epitelial o qual é regulado por mecanismos neurohumorais que aumentam a secreção de bicarbonato e o fluxo sanguíneo (KAUNITZ e AKIBA, 2001).

Paralelamente, os neurônios sensoriais também exercem efeito sobre a regulação da secreção gástrica por meio de dois mecanismos distintos. A mucosa gástrica possui um grupo de fibras nervosas que são sensíveis ao ácido e liberam o CGRP, o qual atua sobre o seu receptor CGRP1 para facilitar a liberação de somatostatina e interromper a secreção de gastrina, inibindo dessa forma a liberação ácida (GEPPETTI et al., 1991). Um outro grupo de fibras sensoriais são sensíveis à distensão, e constituem o arco aferente de reflexos secretórios e anti-secretórios autonômicos (HOLZER et al., 1998b).

5.7- Análises imunológicas e Biologia Molecular

5.7.1-Concentração de Endotelinas e PGE₂ na MGHP

OTHA et al. (1997; 2000) sugerem que existe uma superprodução de ET-1 na mucosa gástrica de animais PVS quando comparado aos controles, e que essa superexpressão de ET-1 desempenha um importante papel no aumento da susceptibilidade da mucosa gástrica de animais com HP à injúria.

Nossos resultados indicam que a ET-1 existe em uma proporção cerca de três vezes maior do que ET-3 na mucosa gástrica de todos os grupos estudados. Em nossos resultados, observamos que os grupos de animais BDL apresentam cerca de 20-30% a mais de ET-1 e ET-3 do que os animais Ctrl e PVS, os quais não diferem entre si. Além disso, a inibição prolongada da NOS causou um leve aumento na concentração de ET-1 e ET-3 apenas para o grupo de animais BDL e reduziu a concentração no grupo PVS. Porém, a inibição da síntese dos prostanóides ocasionou uma redução na concentração de ambas as ETs na mucosa gástrica de animais BDL e ET-1 no grupo Ctrl.

Com relação ao grupo de animais BDL-capsaicinizados, a concentração de ET-1 é significativamente menor neste grupo do que no grupo de animais BDL, indicando que, provavelmente, a ET-1 é um dos principais mediadores que modulam as funções da mucosa gástrica na HP. Entretanto, não foi observada diferença quanto à concentração de ET-3 entre os grupos de animais BDL e BDL-capsaicina, o que sugere que a ET-3 não desempenha um papel maléfico para a mucosa gástrica hipertensiva portal.

A dosagem de PGE₂ através de Elisa mostrou que não há diferença significativa entre as concentrações de PGE₂ na mucosa gástrica estimulada com etanol dos grupos de animais Ctrl e com HP. Além disso, o tratamento crônico com o L-NAME não alterou a concentração de PGE₂ desses grupos. Entretanto, a administração aguda de indometacina nos grupos de animais tratados cronicamente com L-NAME significativamente ($p < 0,001$) reduziu a concentração de PGE₂.

As células endoteliais têm a capacidade de produzir e liberar mediadores vasoativos, incluindo aqueles com propriedades vasodilatadoras como a prostaciclina e NO e vasoconstritoras como a endotelina-1, que produz vasoconstrição via receptor ETA e parcialmente via receptor ETB, presentes nas células do músculo liso vascular. Por outro lado, as endotelinas podem produzir vasodilatação via receptores ETB através da liberação de NO e prostaciclina (De GOTTARDI et al., 2000).

CHAN et al. (2004) sugerem que o NO endógeno desempenha um importante papel na modulação dos efeitos da ET-1, em colaterais porto-sistêmicas de animais cirróticos. Adicionalmente, a liberação de prostaglandinas (YOUSUFZAI e ABDEL-LATIF, 1997; TREVISI et al., 2002) e de NO (HIRATA et al, 1993; TSUKAHARA et al., 1994) após ativação de receptores de endotelina foi amplamente relatada na literatura. Por isso, nossos resultados obtidos após o tratamento crônico com o L-NAME sugerem que o NO sozinho não modula a concentração das PGE₂ nem das ETs. Por sua vez, os resultados das concentrações de ETs obtidos após o tratamento crônico com o L-NAME + indometacina revelam que o NO talvez module a concentração das ETs ao atuar sinergicamente com as PGs; ou, por sua vez, a indometacina pode por si própria produzir algum efeito sobre a síntese das ETs, já que ela induz a expressão das isoformas de COX-2 e iNOS (TAKEUCHI et al., 2003).

5.7.2- RT-PCR das isoformas de COX, NOS e ETs na MGHP durante a inibição crônica do NO

Em ratos com ligadura da veia portal (PVL), a expressão da linha basal da COX-1 foi significativamente acentuada, mas os níveis de expressão de COX-2 não foram detectados por toda a progressão da HP, pelo menos dentro da artéria mesentérica superior da aorta torácica desses animais (HOU et al., 1998).

A mucosa gástrica estimulada com etanol dos grupos PVS também apresentou níveis mais elevados da expressão da COX-1, além da eNOS. Possivelmente, existe uma maior produção de prostaglandinas vasodilatadoras neste grupo e NO, o que poderia explicar a presença de um fluxo sanguíneo mais elevado e a maior resistência à lesão induzida pelo etanol. A mucosa gástrica dos animais BDL também apresentou uma elevada expressão da COX-1, apesar dessa mucosa ser mais susceptível à injúria. Porém, foi observada também uma maior expressão da iNOS neste último grupo. Além disso, também foi observada a expressão da COX-2 na mucosa estimulada com etanol dos três grupos estudados.

Não foi observada diferença significativa na expressão de ET-1 na mucosa gástrica estimulada com etanol dos três grupos estudados, entretanto, o grupo de animais controle apresentou uma maior expressão da ET-3.

O tratamento crônico com L-NAME reduziu a expressão da COX-1 nos grupos com HP inibiu a expressão da iNOS no grupo PVS e reduziu a expressão da COX-2 e ET-3 no grupo de animais Ctrl, mas potencializou a expressão da COX-2 no grupo BDL.

O L-NAME é um inibidor não seletivo da NOS que inibe irreversivelmente a eNOS, mas reversivelmente a iNOS (BÔER et al, 2000). Ele exerce um efeito inibitório sobre a expressão de endotelinas em vasos sanguíneos (SVENTEK et al., 1996) sem alterar os níveis plasmáticos destas (NAKAMURA et al., 1997) o que explicaria nossos resultados para ETs após a inibição crônica do NO.

Existem evidências suportando a cooperação entre COX/NOS ao nível do TGI. Em células epiteliais do cólon, uma importante indução da COX-2 foi observada quando a produção do NO foi estimulada. Estes resultados sugerem que o NO modula a expressão da COX-2 e a síntese de PGs derivadas desta enzima (MARTIN et al., 2001). Por isso, em nossos resultados, observamos que, após o tratamento crônico com o L-NAME, houve uma alteração na expressão da COX-1 no grupo de animias com HP e da COX-2 no grupo de animais Ctrl.

Em algumas condições, o NO pode estimular a síntese de PGs via COX, porque similarmente à guanilato ciclase (GC), a enzima COX também possui um grupo heme-Fe²⁺ como sítio ativo, o que a faz um alvo em potencial para o NO (MARTIN et al., 2001). Além disso, alguns trabalhos asseguram que o NO e PGI₂ ou PGE₂ atuam sinergicamente amplificando respostas fisiológicas ou patológicas (SALVEMINI et al., 1993). As enzimas constitutivas COX-1 e eNOS sintetizam produtos que atuam sinergicamente em condições fisiológicas. Por outro lado, as proteínas indizíveis COX-2 e iNOS são expressadas concomitantemente em tecidos inflamados (SALVEMINI et al., 1993).

O tratamento com indometacina reduziu a expressão da eNOS na mucosa gástrica do grupo de animais PVS, mas potencializou a expressão a COX-2 nos três grupos estudados, e a expressão da iNOS nos grupos com HP e das ET-1 no grupo Ctrl e BDL, o que pode laborar para o aumento na área de lesão observado nos grupos com HP após este tratamento. Além disso, a indometacina aumentou a expressão da ET-3 no grupo de animais Ctrl e isto pode contribuir para a redução na área de lesão e no aumento do fluxo sanguíneo gástrico observado neste grupo.

A indometacina inibe não seletivamente as isoformas da COX, porém possui uma potência maior sobre a COX-1. Ela também potencializa a expressão da COX-2 e iNOS (TAKEUCHI et al., 2003), potencializa expressão da enzima conversora de endotelina (SLOMIANY e SLOMIANY, 2001), a contração do músculo liso gástrico induzida pelas endotelinas (SHIMOMURA et al., 1994) e bloqueia os efeitos do L-NAME (OYEKAN e MCGIFF, 1998).

Paralelamente, SPINELLA et al (2004) afirmaram que a ET-1 aumenta a expressão da COX-1 e COX-2, promove a atividade da COX-2 e a produção de PGE₂, via ETA receptor em células de carcinomas ovarianos de humanos, sendo esse efeito relacionado com a progressão do câncer e da quimioresistência.

Adicionalmente, as PGE₂ derivadas da via da COX-1 são responsáveis pela redução da motilidade intestinal, como também por inibir a atividade da iNOS, similarmente ao aminoguanidine (antagonista seletivo da iNOS). Essa superexpressão da COX-2 induzida pela indometacina é reportada como sendo a responsável pela produção

compensatória de PGs durante a inibição da COX-1 pelos AINES. Dessa forma, o aumento das PGs induzido pela COX-2 devido à inibição da COX-1, pelos AINES não seletivos, contribui para a integridade da mucosa intestinal (TAKEUCHI et al., 2003). Tais achados corroboram com as alterações observadas na expressão das isoformas de COX-2, eNOS, iNOS e ETs observados em nossos resultados após o tratamento com a indometacina.

5.7.3- RT- PCR das isoformas de COX, NOS e ETs na MGHP de animais cirróticos capsaicinizados

Os nossos resultados mostraram que a mucosa gástrica, estimulada com etanol, dos animais BDL-capsaicinizados possui uma expressão significativamente ($***p<0,001$) aumentada da eNOS e da COX-3. Entretanto, a mucosa gástrica, estimulada com etanol, dos animais BDL sem tratamento possui uma expressão significativamente ($*p<0,05$) aumentada da iNOS e ET-1, e significativamente ($*p<0,05$) reduzida da ET-3 em relação ao grupo de animais BDL-capsaicinizados. Além disso, não observamos diferenças significativas para a isoforma de COX-1 entre os grupos de animais BDL e BDL- capsaicinizado.

Várias horas são requeridas para a expressão da iNOS após a administração do LPS, e leva 2h para a formação do mRNA e 4h para a proteína iNOS. A atividade dessa proteína está sempre associada à produção de grandes quantidades de NO (SZABÓ, 1995; KIKERBOEN et al., 1999) e elevadas concentrações séricas do nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^- ; KILBOURN et al., 1992; STHUER e MARLETTA, 1985). Os principais tipos celulares que expressam iNOs são os macrófagos e neutrófilos. Entretanto, com fortes sinais para a indução, células endoteliais podem expressar iNOS, como no caso da colite experimental (ZHANG et al., 1998).

Entretanto, em estados moderados de inflamação como a gastrite, iNOS é encontrada somente em infiltrados de células imunes (MANNICK et al., 1996). Em modelos experimentais de inflamação, iNOS também tem sido identificada em neurônios (MILLER et al., 1995). A formação de grandes quantidades de NO pela iNOS explica a citotoxicidade de macrófagos ativados, e é considerada lesiva para a mucosa gástrica (BROWN et al., 1993).

A hiperprodução de NO (na periferia) ou hipoprodução (intra-hepaticamente) é a causa (indução da iNOS, estímulo da eNOS) ou a consequência (deficiência da eNOS intra-hepática) da síndrome hiperdinâmica. Esta incerteza resulta da significância indefinida da ativação suave e transitória do eixo citocina-endotoxina para indução da iNOS e os dados contraditórios sobre a atividade específica das iNOS e eNOS (PATERMANN et al., 1999; SARELA et al., 1999). A contribuição de cada isoforma de NOS na patogênese da síndrome hiperdinâmica depende provavelmente do modelo de PTH em estudos animais e da etiologia e gravidade da cirrose em estudos em humanos (CAHILL et al., 2001), mas uma coisa é certa até o presente momento, o NO possui um papel muito importante no metabolismo de proteínas intestinais para todo o corpo, tanto em condições fisiológicas normais como durante a sépsis (VISSERS et al., 2004) e sua ausência está sendo relatada como teratogênica (TIBONE e CLEMENTINI, 2004). Além disso, tem sido reportado que a administração exógena de NO reduz a expressão de ET-1 (BLUMBERG et al., 2001) e que o NO atua no controle da pressão arterial ao regular a ET-1 (SVENTEK et al., 1996). Por sua vez a ET-1 inibe a expressão da iNOS em adipócitos (MERIAL-KIENY et al., 2003).

5.8- Alterações histológicas

No presente trabalho, os animais submetidos à ligadura de ducto biliar comum e utilizados nos diferentes protocolos experimentais apresentaram as alterações histológicas compatíveis com as alterações observadas na cirrose biliar desenvolvida em humanos, o que torna os resultados bastante confiáveis.

Todos os animais cirróticos, exceto o grupo de animias BDL-capsaicinizados, e os cirróticos que foram tratados cronicamente com L-NAME apresentaram congestão moderada à intensa dos vasos da lâmina própria, ectasia de linfáticos em algumas áreas, edema e congestão dos vasos da submucosa, sendo essas alterações semelhantes às alterações vistas na GHP de humanos. Esses resultados sugerem que o NO não contribui para as alterações histológicas observadas na GHP.

Os animais BDL-capsaicinizados, à semelhança dos animais controles, apresentaram mucosa gástrica íntegra e sem alterações histológicas dignas de nota, o que indica a provável participação de um ou mais componentes neurogênicos no desenvolvimento das alterações histológicas observadas na GHP.

6- CONCLUSÕES

- 1- A mucosa gástrica de animais cirróticos é mais susceptível à lesão induzida pelo etanol, um fenômeno modulado pela presença da hipertensão portal, disfunção do fígado e pH intragástrico.
- 2- O tratamento crônico com LPS induz tolerância ao estímulo nocivo do etanol, na mucosa gástrica de animais saudáveis ou com hipertensão portal pura, provavelmente através de mecanismo de adaptação reativa. Entretanto, é extremamente nocivo quando há o comprometimento do fígado.
- 3- A inibição crônica do NO aumenta a susceptibilidade gástrica à injúria induzida pelo etanol, indicando que o NO é o principal mediador para a manutenção da integridade da mucosa gástrica em animais saudáveis e com hipertensão portal pura. Em adição, a presença da disfunção do fígado contribui para a diminuição da resistência da mucosa gástrica à injúria, um fenômeno modulado por prostaglandinas e potencialmente por outros mediadores vasoativos.
- 4- Os resultados desta Tese demonstram que as ETs, principalmente ET-1, e os neuropeptídeos são a chave para o desenvolvimento da hipertensão portal ao atuarem de maneira integrada. O uso dos antagonistas seletivos de receptor ETB de endotelinas e/ ou de antagonistas seletivos de receptor NK1 de taquicinas poderia ser uma importante ferramenta terapêutica no combate ao desenvolvimento da hipertensão portal, conseqüentemente, da gastropatia hipertensiva portal, entre outras doenças, decorrentes do aumento da pressão portal.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRALDES, J.G. ; BOSCH, J. Novel approaches to treat portal hypertension. **J Gast Hepatol**, 17 (Supl 3): S232-S241, 2002a.

ABRALDES, J.G. ; BOSCH, J. Somatostatin and analogues in portal hypertension. **Hepatology**, 35 (6): 1305-12, 2002b.

AIYAR, N., RAND, K., ELSHOUBAGY, N.A. A cDNA encoding the calcitonin gene-related peptide type 1 receptor. **J Biol Chem**, 271:11325-9, 1996.

AMARA SG, EVANS RM, ROSENFELD MG. Calcitonin/calcitonin gene-related peptide transcription unit: tissue-specific expression involves selective use of alternative polyadenylation sites. **Mol Cell Biol**, 4: 2151-60, 1984.

ANNIBALE, B., CAPURSO, G., LAHNER, E., PASSI, S., RICCI, R., MAGGIO, F., DELLE FAVE, G. Concomitant alterations in intragastric pH and ascorbic acid concentration in patients with *Helicobacter pylori* gastritis and associated iron deficiency anaemia. **Gut**, 52: 496-501, 2003.

ANSEL, J.C., ARMSTRONG, C.A., SONG, I., QUINLAN, K.L., OLERUD, J.E., CAUGHMAN, S.W., BRUNET, N.W. Interactions of the skin and nervous system. **J Inv Dermatol Proc**, 2:23-6, 1997.

APPLEYARD, C.B., McCAFFERTY, D.M., TIGLEY, A. W., SWAIN, M.G., WALLACE, J.L Tumour necrosis factor mediation of NSAID-induced gastric damage: role for leukocyte adherence. **Am J Physiol**, 270: G42-48, 1996.

ARROYO, V., GINES, P. Arteriolar vasodilatation and the pathogenesis of the hiperdinamic circulation and renal sodium and water retention in cirrhosis. **Gastroenterology**, 102: 1077-79, 1993.

ARROYO, V., JIMENEZ, W. Complications of cirrhosis II. Renal and circulatoru dysfunction. Lights and Shadows in an important clinical problem. **J. Hepatol**, 32: 157- 170, 2000.

ARROYO, V., GUEVARA, M., GINES, P. Hepatorenal syndrome in cirrhosis: pathogenesis and treatment. **Gastroenterology**, 122: 1658-76, 2003.

AUERBACK, L. Über einen plexus myentericus. **Morgenstern: Breslau**, 1863.

AUKRUST, P., UELAND, T., LIEN, E., BENDTZEN, K., MULLER, F., ANDREASSEN, A.K., NORDOY, I., AASS, H., ESPEVIK, T., SIMONSEN, S., FROLAND, S.S., GULLESTAD, L. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. **Am J Cardiol**, 83(3):376-82, 1999.

AVENTUUR, J. A. M., BOOMSMA, F., VAN DEN MEIRACKER, A.H., DE JONG, F. e BRUINING, H.A. Endothelin-1 and blood pressure after inhibition of oxid nitric synthesis in human septic shock. **Circulation**, 99: 271-75, 1999.

BALUK, P. Neurogenic inflammation in skin and airways. **J. Inv Dermatol Symp Proc**, 2: 76-81, 1997.

BANDI J.C., FERNANDEZ, M., BERNADICH, C., DE LACY, A.M., GARCIA-PAGAN, J.C., BOSCH, J., RODES, J. Hyperkinetic circulation and decreased sensitivity to vasoconstrictors following portacaval shunt in the rat. Effects of chronic nitric oxide inhibition. **J Hepatol**, 31(4) :719-24, 1999.

BANG, R., SASS, G., KIEMER, A.K., VOLLMAR A.M., NEUHUBER, W.L., TIEGS, G. Neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and L-733,060 protect mice from cytokine-mediated liver injury. **J Pharmacol Exp Ther**, 305 (1) :31-9, 2003.

BANG, R., BIBURGER, M., NEUHUBER, W.L., TIEGS, G. Neurokinin-1 receptor antagonists protect mice from CD95- and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptotic liver damage. **J Pharmacol Exp Ther**, 308 (3) :1174-80, 2004.

BAUMGARTNER, A., KOELZ, H.R., HALTER, F. Indomethacin and turnover of gastric mucosal cells in the rat. **Am J Physiol**, 250: G830–G835, 1986.

BAVEJA, R., KELLER, S., YOKOYAMA, Y., SONIN, N., CLEMENS, M.G. AND ZHANG J.X. LPS-induced imbalanced expression of hepatic vascular stress genes in cirrhosis: possible mechanism of increased susceptibility to endotoxemia. **Shock**, **17** (4): 316–21, 2002a.

BAVEJA, R., YOKOYAMA, Y., KORNESZCZUK, K., ZHANG, J.X., AND CLEMENS, M.G. Endothelin 1 impairs oxygen delivery in livers from LPS-primed animals. **Shock**, **17**: 383–8, 2002b.

BAYLISS, W.M. On the origin from the spinal cord of the vasodilator fibers of the hindlimb, and the nature of these fibers. **J Physiol**, London **28**: 173-209, 1901.

BECK, P.L., MCKNIGHT, W., LEE, S.S., WALLACE, J.L. Prostaglandin modulation of the gastric vasculature and mucosal integrity in cirrhotic rats. **Am J Physiol**, **265**:G453-G458, 1993.

BECK, P. L.; WALLACE, J.L. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Mediators Inflamm**, **6**: 95-103, 1997.

BECK, P. L., LEE, S.S., MCKNIGHT, W.; WALLACE, J.L. Characterization of spontaneous and ethanol-induced gastric damage in cirrhotic rats. **Gastroenterology**, **103**, 1048 – 55, 1993.

BENDTSEN, F., SCHIFTER, S., HENRIKSEN, J.H. Increased circulating calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cirrhosis. **J. Hepatol**, **12**; 118-23, 1991.

BENIGNI, A.; REMUZZI, G. Endothelin antagonists. **New Drug Classes**, **353**: 133-8, 1999.

BEVAN, S., SZOLCSÁNYI, J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. **Trends Pharmacol Sci**, Cambridge Eng **11** (8): 330-3, 1990.

BEVAN, S., YEATS, J. Protons activate a cation conductance in a subpopulation of rat dorsal root ganglion neurones. **J Physiol**, London (433): 145-161, 1991.

BIRNEY, Y., REDMOND E.M., SITZMANANN, J.V., CAHILL, P.A. Eicosanoids in cirrhosis and portal hypertension. **Prostaglandins Other Lip Med**, 72: 3-18, 2003.

BLENDIS, L.; WONG, F. Is there a cirrhotic cardiomyopathy? **Am J Gastroenterol**, 95, 3026-8, 2000.

BLENDIS, L.M., SOLE, M.J., LOSSING, A.G., GREIG, P. D., TAYLOR, B.R. e LANGER, B. The effect of peritoneovenous shunting on catecholamine metabolism in patients with hepatic ascites. **Hepatology**, 7, 143-8, 1987.

BLOOM, S.R. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent vasodilator in humans. **J Card Pharmacol**, 20: 83-7, 1992.

BODE, C., KUGLER, V., BODE, J.C. Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. **J Hepatol**, 4 (1):8-14, 1987.

BOER R, ULRICH WR, KLEIN T, MIRAU B, HAAS S, BAUR I. The inhibitory potency and selectivity of arginine substrate site nitric-oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes. **Mol Pharmacol**, 58 (5):1026-34, 2000.

BOJE KM, ARORA PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. **Brain Res**, 7;87(2):250-6, 1993.

BRADFORD, M. M. *Anal. Biochem*, 72: 248, 1976.

BRAEGGER, C.P., NICHOLLS, S., MURCH, S.H, Stephens, S., MacDonald, T.T. Tumour necrosis factor-alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. **Lancet**, 339: 89-91, 1992.

BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J. Interaction between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema and blood flow in rat skin. **Br J Pharmacol**, 97:77-82, 1989.

BRAIN, S.D.;CAMBRIDGE, H. Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role. **Gen Pharmacol**, 27: 607-611, 1996.

BRANDLI, P, LOFFER, BM, BREU, V., Osterwalder, R., Maire, J.P.; Clozel, M. Role of endothelin in mediating neurogenic plasma extravasatio in rat dura mater. **Pain**, 64: 315-22, 1995.

BREDT, DS, SNYDER, SH. Nitric Oxide: a physiologic messenger molecule. **Annu Rev Bioch**, Palo Alto, 63:175-95, 1994.

BRICOLA AA, TEIXEIRA SA, DE LUCA IM, MUSCARA MN, ABDALA FM, PORTO CS, ZANESCO A, ANTUNES E, DE NUCCI G. Upregulation of muscarinic receptors by long-term nitric oxide inhibition in the rat ileum. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 30 (3):168-73, 2003.

BRIMIJOIN, S., LUNDBERG, J.M., BRODIN, E., HOKFELT, T., NILSSON, G. Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of guinea-pig. **Brain Res**, Amsterdam,191(2): 443-57, 1980.

BROUILLETEE, J.; COUTURE, R. Evidence for a GABA (B) receptor component in the spinal cord action of substance P (SP) on arterial blood pressure in the awake rat. **Br J Pharmacol**, 136 (8): 1169-77, 2003.

BROWN, J.F., KEATES, A.C., HANDON, P.J., WHITTLE, B.J.R. Nitric Oxide generators and GMPc stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. **Am J Physiol**, 265: G418-G422, 1993.

BULL, H.A, HOTHERSALL, J., CHOWDHURY, N., COHEN, J., DOWD, P.M . Neuropeptides induces release of nitric oxide from human dermal microvascular endothelial cells. **J Invest Dermatol**, 106: 655-60, 1996.

CAHILL, P. A., REDMOND, E., SITZMANN, J. V. Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension. **Pharmacology e therapeutics**, 89; 273-293, 2001.

CALATAYUD, S., RAMIREZ, C., SANZ, M.J., MORENO, L., HERNANDEZ, C., BOSCH, J., PIQUE, J.M.; ESPLUGUES, J.V. Gastric Mucosal Resistance to acute injury in experimental portal hypertension. **British J Pharm**, 132, 309–17, 2001a.

CALATAYUD, S., BARRACHINA, D., ESPLUGUES, J.V. Nitric Oxide: Relation to integrity, injury, and Healing of the Gastric Mucosa. **Micros Res Tech**, 53: 325-35, 2001b.

CALATAYUD, S., BARRACHINA, D., GARCIA-ZARAGOVA, E., MATTSSON, H.; ESPLUGUES, J.V. Changes in Gastric Mucosal Permeability Induced by Haemorrhagic Shock in the Anaesthetized Rat: Modulation by Acid. **J Pharm Pharm**, 50: 1095-100, 1998.

CALVO, J.J., GONZALEZ, R., DE CARVALHO, L.F., TAKAHASHI, K., KANSE, S.M., HART, G.R., GHATEI, M.A. AND BLOOM, S.R. Release of substance P from rat hypothalamus and pituitary by endothelin, **Endocrinology**, 126: 2288-95, 1990.

CAMPBELL, E. Clinical applications of capsaicin and its analogues. In: CAMPBELL, E. **Capsaicin and the Study of Pain**, ed. J Wood, 255–72, 1993.

CAO T, GERARD NP, BRAIS S. Use of NK1 knockout mice to analyse substance P-induced oedema formation. **Am J Physiol**, 277: (2-pt2):476-81, 1999.

CAPUGGI, P., GERINI, G., VERRONE, C., VELLUZZI. M., DEL SERE, F., TSAMPAU, D., PETRINI, N., FABBRI, P. Preliminary experiences with chemotactic activity of CGRP using the skin window test. **G Ital Dermatol Venereol**, 125: 135-8 (abstract), 1990.

CASATELL M.A., MEDA L., GASPERINI, S., BOMORA, S. Interleukin-10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. **J Exp Med**, 179:1695-99, 1994.

CASINI A, LIPPE IT, EVANGELISTA S, GEPPETTI P, SANTICIOLI P, URSO C, PAGLIERANI M, MAGGI, C. A., SURRENTI C. Effect of sensory denervation with capsaicin on liver fibrosis induced by common bile duct ligation in rat. **J Hepatol**, 11(3):302-12, 1990.

CATERINA, M.J. ; JULIUS, D. Vanilloid receptors take a TRP beyond the sensory afferent. **Pain**, 105: 5-9, 2003.

CATERINA, MJ. The vanilloid receptor; a molecular gateway to the pain pathway. **Annu Rev Neurosci**, 24: 487-517, 2001.

CEBERNACEK, P.; STEWART, D.J. Immunoreactive endothelin in human plasma:Marked elevations in patients in cardiogenic shock. *Biochem. Biophys. Res Commun*, 161: 562-7, 1989.

CERVERO, F., MCRITCHIE, H.A. Neonatal cap-saicin and thermal nociception: a paradox. **Brain Res**, 215:414–18, 1981.

CHEUNG, R.C., COOPER, S., KEEFFE, E.B. Endoscopic gastrointestinal manifestations of liver disease. **Gastrointest Endosc Clin N Am**, 11(1):15-44, 2001.

CHO, S.W., KIM, I.K., LIM, S.H., KIM, D.I., KANG, S.W., KIM, S.H., KIM, Y.H., LEE, E.Y., CHOI, C.Y., KIM, B.S. Smooth muscle-like tissues engineered with bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, 25: 2979-86, 2004.

CHU, C.J., LEE, F.Y., WANG, S.S., CHANG, F.Y., LIN, H.C., LU, R.H., WU, S.L., CHAN, C.C., TAI, C.C., LAI, I.N., LEE, S.D. Evidence against a role for endotoxin in the hyperdynamic circulation of rats with prehepatic portal hypertension. **J Hepatol**, 30(6):1105-11,1999.

CLARIA, J., TITOS, E., JIMENEZ, W., ROS, J., GINES, P., ARROYO, V., RIVERA, F., RODES, J. Altered biosynthesis of leukotrienes and lipoxins and host defense disorders in patients with cirrhosis and ascites. **Gastroenterology**, 115 (1): 147-56, 1998.

COWAN, D.B. ; LANGILLE, B.L. Cellular and molecular biology of vascular remodeling. **Curr Opin Lipidol**, 7, 94-100, 1999.

CROWE, R., PARKHOUSE, N., McGROUTHER, D., BURNSTOCK, G. Neuropeptides-containing nerves in painful hypertrophic human scar tissue. **Br J Dermatol**, 130:444-52,1994.

DALE, HH; FELDBERG, W, W. The chemical transmitter of vagus effects to the stomach. **J Physiol**, London, 81: 320-34, 1934.

DALY, R.N.; HIEBLE, J.P. Neuropeptide Y modulates adrenergic neurotransmission by an endothelium dependent mechanism **Eur J Pharmacol**, 138: 445-6, 1987.

DAVID, F.L., MONTEZANO, A.C., REBOUCAS, N.A., NIGRO, D., FORTES, Z.B., CARVALHO, M.H., TOSTES, R.C. Gender differences in vascular expression of endothelin and ET(A)/ET(B) receptors, but not in calcium handling mechanisms, in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. **Braz J Med Biol Res**, 35(9):1061-8, 2003.

DEL-RIO, G., CASTRO-OBREGON, S., RAO, R., ELLERBY, H.M., BREDENSEN, D.E. APAP, a sequence pattern recognition approach identifies substance P as a potential apoptotic peptide. **FEBS Lett**, 494:213-19, 2001.

DINARELLO, C.A. Cytokines: interleukin and tumour necrosis factor (cachectin). In: GALLIN, J.I., GOLDSTEIN, I.M, SNYDERMAN, R. Eds. **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. New York: raven Press:195-208, 1988.

DINARELLO CA . The interleukin-1 family: 10 years of discovery. **FASEB J** 8: 1314-25, 1994.

DOGULU, F.H., OZOGUL, C., AKPEK, S., KURT, G., EMMEZ, H., ERCAN, S., BAYKANER, M. K. Intra-arterial simultaneous administration of anandamide attenuates endothelin-1 induced vasospasm in rabbit basilar arteries. **Acta Neurochir** (Wien), 145(7):579-82, 2003.

DORNER, G.T., WOLZT, M., EICHLER, H.G., SCHMETTERER, L. Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 1-27 on ocular, cerebral and skin blood flow in humans. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, 358: 657-62, 1998.

DOUCETTE, R., THERIAULT, E., DIAMOND, J. Regionally selective elimination of cutaneous thermal nociception in rats by neonatal cap-saicin. **J Comp Neurol** 261:583–91, 1987.

DYMSHITZ, J.; VASKO, M.R. Endothelin-1 enhances capsaicin-induced peptide release and cGMP accumulation in cultures of rat sensory neurons. **Neurosci Lett**, 167: 128-32, 1994.

EDMONDS-ALT, X., VILAIN, P., GOULAOUIC, P., PROIETTO, V., VAN BROECK, D., ADVENIER, C., NALINE, E. NELIAT, G., LÇE FUR, G., BRELIERE, J.C. A potent and seletive non-peptide antagonist of the neurokinin A (NK2) receptor. **Life Sci**, 50: PL101- PL106 1992.

EDVINSSON, L., EKBLAD, E., HAKANSON, R., WAHLESTEDT, C. Neuropeptide Y potentiates the effect of various vasoconstrictor agents no rabbit blood vessels. **Br J Pharmacol**, 5: 84-7, 1984.

ELLIOTT, S.N., MCKNIGHT, W., CIRINO, G., WALLACE, J.L. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology**, 109:524-30, 1995.

ERMERT, M., MERKLE, M., MOOTZ, R., GRIMMINGER, F., SEEGER, W.; ERMERT, L. Endotoxin priming of the cyclooxygenase-2-thromboxane axis in isolated rat lungs. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 278: L1195–L1203, 2000.

FARBER, E., LIANG, H., SHINOZUKA, H. Dissociaton of effects on protein synthesis and ribossomes from membrane changes induced by carbon tetrachloride. **AmJ Pathol**, 64: 601, 1971.

FERRAZ, J.G., MCKNIGHT, W., LEE, S.S., WALLACE, J.L. Impaired vasodilatory responses in the gastric microcirculation of anesthetized rats with secondary biliary cirrhosis. **Gastroenterology**, 108:1183-91, 1995.

FERRAZ, J.G.P; WALLACE, J.L. Prostaglandins modulate the responsiveness of the gastric microcirculation to Sodium Nitroprusside in cirrhotic rats. **Hepatology**, 23, 123- 9, 1996.

FERRAZ, J.G., TIGLEY, A. W., APLEYARD, C.B. e WALLACE, J.L. TNF-alpha contributes to the pathogenesis of ethanol-induced gastric damage in cirrhotic rats. **Am J Physiol**, 272: G809 - G814, 1997a.

FERRAZ, J.G., SHARKEY, K.A., REUTER, B.K., ASFAHA, S., TIGLEY, A.W., BROWN, M.L., MCKNIGHT, W., WALLACE, J.L. Induction of cyclooxygenase 1 and 2 in the rat stomach during endotoxemia: role in resistance to damage. **Gastroenterology**, 113(1):195-204, 1997b.

FIGINI, M., EMANUELI, C., GRADY, E.I., KIRKWOOD, K., PAYAN, D.G., ANSEL, J., GERARD, C., GEPPETTI, P., BUNNETT, N. Substance P and bradykinin stimulate plasma extravasation in the mouse gastrointestinal tract and pâncreas. **Am J Physiol**, 272: G785-G93, 1997.

FISCHER, H., BECKER, J.C., BOKNIK, P., HUBER, V., LUSS, H., NEUMANN, J., SCHMITZ, W., DOMSCHKE, W., KONTUREK, J.W. Expression of endothelial cell-derived nitric oxide synthase (eNOS) is increased during gastric adaptation to chronic aspirin intake in humans. **Alim Pharm Ther**, 13: 507-14, 1999.

FLISIAK, R., PROPOWICZ, D. Plasma iPGE2 and i6-keto PGF1 alpha in the course of liver cirrhosis. **Prostaglandins**, 53 (1): 11-20, 1997.

FLORAS, J.S., LEGAULT, L., MORALI, G.A., HARA, K.; BLENDIS, L.M. Increased sympathetic outflow in cirrhosis and ascites: direct evidence from intraneural recordings. **Ann Int Med**, 114; 373-80, 1991.

FOREMAN JC . Peptides and neurogenic inflammation. **BR Méd Bulletin**. 43 (2):386-400, 1987.

FRANCO L, DORIA D. Nitric oxide enhances prostaglandin production in ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Eur J Pharmacol**, 8:348(2-3):247-56, 1998.

FRASER, AG, POUNDER, RE, BURROUGHS, AK. Gastric secretion and peptic ulceration in cirrhosis. **J Hepatol**, 19:171-82, 1993.

FREITAS CS, BAGGIO CH, DA SILVA-SANTOS JE, RIECK L, DE MORAES SANTOS CA, JUNIOR CC, MING LC, GARCIA CORTEZ DA, MARQUES MC. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sci**, 16;74(9):1167-79, 2004.

FUKURODA T, FUJIKAWA T, OZAKI S, ISHIKAWA K, YANO M, NISHIKIBE M. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. **Biochem Biophys Res Commun**, 199 (3): 1461-5, 1994.

FURNESS, J.B., MORRIS, J.L., GIBBINS, J.L., COSTA, M. Chemical coding of neurons and plurichemical transmission. **Ann Pharmacol Toxicol**, Palo Alto, 29:289-306, 1989.

FURNESS, J.B., BORNSTEIN, J.C., MURPHY, R., POMPOLO, S. Roles Of Peptides In Transmission In The Enteric Nervous System. **Trends Neurosci**, Cambridge Eng, 15 (2): 66-71, 1993.

FURNESS, J.B., YOUNG, H.M., POMPOLO, S., BORNSTEIN, J.C., KUNZE, W.A.A., McCONALOGUE, K. Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract **Gastroenterology**, Philadelphia, 108 (2): 554-63, 1995.

FURNESS, J.B., BORNSTEIN, J.C., KUNZE, W.W.A., BERTRAND, H.K., THOMAS, E.A. Experimental basis for realistic large-scale computer simulation of the enteric nervous system. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, Melbourne, 23: 786-92, 1996.

FURNESS, J.B. Types of neurons in the enteric nervous system. **J Auton Nerv Syst**, Amsterdam, 81 (1-3): 87-96, 2000.

GANDHI, C.R., STEPHENSON, K., OLSON, M.S. Endothelin, a potent peptide agonist in the liver. **J Biol Chem**, 265: 17432-5, 1990.

GARCIA-PAGAN J.C., ESCORSELL, A., MOITINHO, E., BOSCH, J. Influence of pharmacological agents on portal hemodynamics: basis for its use in the treatment of portal hypertension. **Semin Liver Dis**, 19(4):427-38, 1999.

GARRET, C, CARRUETTE, A., FARDIN, V., MOUSSAOUI, S., PEYRONEL J-F., BLANCHARD J.C., LADURON, P.M. Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist. **Proc Nat Acad Sci USA** 88: 10208-12, 1991.

GEPPETTI, P., TRAMONTANA, M., EVANGELISTA, S., RENZI, D., MAGGI, C.A., FUSCO, B.M., DEL BIANCO, E. Differential effect on neuropeptide release of different concentrations of hydrogen ions on afferent and intrinsic neurons of the rat stomach. **Gastroenterology**, 101:1505-11, 1991.

GEPPETTI, P., HOLZER, P. Neurogenic inflammation. **Boca raton**: CRC Press, 1996.

GEPPETTI, P, TRAMONTANA, M., SANTICIOLI, P., DEL BIANCO, E., GIULIANI, S., MAGGI, C.A. Bradykinin induced release of CGRP from capsaicin-sensitive nerves in guinea-pig atria: mechanism of action and calcium requirements. **Neuroscience**, Oxford 38: 687-92, 1990.

GERAGHTY, J.G., ANGERSON, W.J., CARTER, D.C. Portal venous pressure and portasystemic Shunting in experimental portal hypertension. **Am J Physiol**, 257 (1 Pt 1):G52-7, 1989.

GHAFOURIFAR, P., BRINGOLD, U., KLEIN, S.D., RICHTER, C. Mitochondrial nitric oxide synthase, oxidative stress and apoptosis. **Biol Signals Recept**, 10(1-2):57-65. Review, 2001.

GINAP, T., KILBINGER, H. NK1- and NK3-receptor mediated inhibition of 5-hydroxytryptamine release from the vascularly perfused small intestine of the guinea-pig. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 356(5):689-93, 1997.

GISLASON, H., HERFJORD, J.K., GUTTU, K., GRONG, K., GRONBECH, J.E., ULVIK, R., SVANES, K. Adaptive protection to clearance of ethanol in gastric mucosa of cats. **Scand J Gastroenterol**, 28:361-8, 1993.

GOKIN, A.P., FAREED, M.U., PAN, H.L., HANS, G., STRICHARTZ, G.R., DAVAR, G. Local injection of endothelin-1 produces pain-like behavior and excitation of nociceptors in rats. **J Neurosci**, 15;21(14):5358-66, 2001.

GOYAL, R.K., HIRANO, I. The enteric nervous system. **N Engl J Med**, 25;334(17):1106-15, 1996.

GRACE, L.U. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of kupffer cell activation. **Am J Physiol gastrointest Liver Physiol**, 283: G256-G65, 2003.

GRADY, E.F., BALUK, P., BÖHM, S., GAMP, P.D., WONG, H., PAYAN, D.G., ANSEL, J., PORTBURY, A.L., FURNESS, J.B., McDONALD, D.M., BUNNETT, N.W. . Characterization of antisera specific to NK1, NK2, NK3 neurokinin receptors and their utilization to localize receptors in the rat gastrointestinal tract. **The J Neuros**, 16 (21): 6975-86, 1996.

GRANGER, D.N., KVIETYS, P.R., e WILBORN, W.H. Mechanism of glucagon-induced intestinal secretion. **Am J. Physiol** 239; G30-G38, 1980.

GREEN, T.; DOCKRAY, G.J. Calcitonin gene-related peptide and substance P in afferents to upper gastrintestinal tract in the rat. **Neurosci Lett**, Limerick, 76 (2): 51-161, 1987.

GRIESS, P. **Ber Dtsch Chem Ges**, 12, 426-8, 1879.

GRIFFIT, OW, STUEHR, DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. **Ann Rev Physiol**, 57: 707-36, 1995.

GRINKO I, GEERTS A, WISSE E. Experimental biliary fibrosis correlates with increased numbers of fat-storing and Kupffer cells, and portal endotoxemia. **J Hepatol**, 23(4):449-58, 1995.

GROSZMANN, R.J. Nitric oxide and hemodynamic impairment. *Digestion*, 59: (Supl 2): 6-7, 1998.

GUARNER, C., SORIANO, G., SUCH, J. Prostaglandin and portal hypertension. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 48; 203-206, 1993.

GUARNER C, SORIANO G, SUCH J, TEIXIDO M, RAMIS I, BULBENA O, ROSELLO J, GUARNER F, GELPI E, BALANZO, J. Systemic prostacyclin in cirrhotic patients. Relationship with portal hypertension and changes after intestinal decontamination. **Gastroenterology**, 102(1) :303-9, 1993.

HADOCKE, P.W.F.; HAYES, P.C. In vitro evidence for vaascular hyporesponsiveness in clinical experimental cirrhosis. **Pharmacol Ther**, 75: 1-18, 1997.

HAEGERSTRAND, A., DALSGAARD, C.J., JONZON, B., LARSSON, O., NILSSON, J. Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endotelial cells. **Proc Natl Acad Sci**, 87: 3299-303, 1990.

HäGERMARK, Ö., HÖKFEL,T.T., PERNOW, B. Flare and itch induced by substance P in human skin. **J Invest Dermatol**, 71: 233-5, 1978.

HALLEMESCH, M.M., COBBEN, D.C., SOETERS, P.B.; DEUTZ, N.E.P. Differential effects of selective and nonselective NOS inhibition on renal arginine and protein metabolism during endotoxemia in rats. **Clin Nutr**, 21:111–7, 2003.

HARA M, TOYODA M, YAAR M et al. Innervation of melanocytes in human skin. **J Exp Med**, 184: 1385-95, 1996.

HARRISON, S. ; GEPPETTI, P. Substance P. **Int J Bioc Cell Bio**, 33: 555-76, 2001.

HARTSCHUH, W., WEIHE, E., YANAIHARA, N., REINECKE, M. Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in Merkel cells of various mammals: evidence for a neuromodular function of the Merkel cell. **J Invest dermatol**, 81: 361-4, 1983.

HASHIM, M.A., TADEPALLI, A.S. Cutaneous vasomotor effects of neuropeptide Y. **Neuropeptides**, 29: 263-71, 1995.

HAWKEY, J.C. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropaty. **Gastroenterology**, 119 (2): 521-35, 2000.

HAYES, A.G., SCADDING, J.W., SKINGLE, M., TYERS, M.B. Effects of neonatal administra-tion of capsaicin on nociceptive thresholds in the mouse and rat. **J Pharm Pharmacol**, 33:183–85, 1981.

HEINEMANN, A., JOCIC, M., HERZEG, G.; HOLZER, P. Tachykinin inhibition of acid-induced gastric hyperaemia in the rat, **Br.J. Pharmacol.**, 119 1525–32, 1996.

HEINEMANN, A., SATTLER, V., JOCIC, M., HOLZER, P. Inhibition of acid-induced hyperaemia in the rat stomach by endogenous NK2 receptor ligands. **Neuroscience Letters**, 237:133–5, 1997.

HELKE, C.J., KRAUSE, J.E., MANTYH, P.W., COUTURE, R., BANNON, M.J. Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors and regulatory mechanisms. **FASEB J**, 4: 1606-15, 1990.

HELLER, J., SOGNI, P., BARRIÈRE, E., TAZI, K.A., CHAUVELOT-MOACHON, L., GUIMONT, M.C., BORIES, P.N., POIREL, O., MOREAU, R. e LEBREC, D. Effects of lipopolysaccharide on TNF- α production, hepatic NOS2 activity, and hepatic toxicity in rats with cirrhosis. **J Hepatol** ,33: 376-81, 2000.

HIBBS JR, J.B., TAINTOR, R.R., VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, Washington DC, 253: 473-6, 1987.

HINOHARA, H., MORITA, T., OKANO, N., KUNIMOTO, F., GOTO, F. Chronic intraperitoneal endotoxin treatment in rat induces tolerance to d-tubocurarine, but does not produce up-regulation of acetylcholine receptors. **Acta Anesthesiol scand**, 47: 335-41, 2003.

HOCHER, B., THÖNE-REINEKE, C., BAUER, C. et al. The paracrine endothelin system: Pathophysiology and implications in clinical medicine. **Eur J Clin Biochem**, 35, 175-89, 1997.

HOLZER, P., JURNA, I., GAMSE, R., LEMBECK, F. Nociceptive threshold after neonatal capsaicin treatment. **Eur J Pharmacol**, 58:511–14, 1979.

HOLZER P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin-gene related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, 24: 739-68, 1988.

HOLZER, P., LIVINGSTON, E.H., SARIA, A., GUTH, P.H. Sensory neurons mediate protective vasodilatation in rat gastric mucosa. **Am J Physiol**, 260:G363-G370, 1991a.

HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanism of action, and selectivity for thin sensory neurones. **Pharmacol Rev**, 43: 143-98, 1991b.

HOLZER, P. Peptides sensory neurons in the control of vascular function: mechanisms and significance in the cutaneous and vascular splanchnic beds. *Ver. Physiol. Biochem. Pharmacol*, 121 : 52-145, 1993.

HOLZER, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. **Gen Pharmac**, 30: 5-11, 1998a.

HOLZER, P. Neural Emergency System in the Stomach. **Gastroenterology**, 114:823-39, 1998b.

HONGZHI, X.U.H., KORNESZCZUK, K., KARAA, A., LIN, T., CLEMENS, M.G.; ZHANG, J.X. Thromboxane A2 from Kupffer cells contributes to the hyperresponsiveness of hepatic portal circulation to endothelin-1 in endotoxemic rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 288: G277-G83, 2005.

HORI, T. Capsaicin and central control of thermoregulation. **Pharmacol Ther**, 26:389-416, 1984.

HOU, M.C., CAHILL, P.A., ZHANG, S., WANG, Y.N., HENDRICKSON, R.J., REDMOND, E.M.; SITZMANN, J.V. Enhanced cyclooxygenase-1 expression within the superior mesenteric artery of portal hypertensive rats; role in the hyperdynamic circulation. **Hepatology**, 27, 20-7, 1998.

HOYER, D., BELL, G.I., BERELOWITZ, M., EPELBAUM, J., FENIUK, W., HUMPHREY, P.P. et al. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. **Trends Pharmacol sci**, 16: 86-8, 1995.

HULME, E.C, BIRDSALL, N.J., BUCKLEY, N.J. Muscarinic receptor subtypes. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**, Palo Alto, 30: 633-73, 1990.

IWAKIRI, Y., CADELINA, G., SESSA, W.C., e GROSZMANN, R. J. Mice with targeted deletion of eNOS develop hyperdynamic circulation associated with portal hypertension. **Am J Physiol Gastroint Liver Physiol**, 283; G1074-G81, 2003.

IWAO, T., TOYONAGA, A., IKEGAMI, M., OHO, K., SUMINO, M., HARADA, H., SAKAKI, M. et al. Reduced gastric mucosal blood flow in patients with portal-hypertensive gastropathy. **Hepatology**, 18: 36-40, 1993.

JANCSÓ, G. Role of the nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. **Bull Millard Fillmore Hosp**, 7: 53-7, 1960.

JANCSÓ, G.; KIRALY, E.; JANKSÓR-GABOR, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. **Nature**, 270: 741-3, 1977.

JANCSÓ, G., KARCSU, S., KIRALY, E., SZEBENI, A., TOTH, L., BACSY, E., JOO, F., PARDUCZ, A.. Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. **Brain Res**, 295:211-16, 1984.

JANCSÓ, G. Pathobiological reactions of C-fiber primary sensory neurones to peripheral nerve injury. **Exp. Physiol**, 77:405-31, 1993.

JANCSÓ, G.; AMBRUS, A. Capsaicin sensitivity of primary sensory neurones and its regulation. In: BESSON, J.M., GUIBAUD, G., OLLAT, H (Ed.) **Peripheral neurons in nociception**: physio-pharmacological aspects. S.1:sn: 71-87, 1994.

JANCSÓ-GABOR A, SZOLCSANYI J, JANCSÓ N. Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structures by capsaicin in rats. **J Physiol**, 208:449-59, 1970.

JANCSÓ, N; JANCSÓ, A. Desensitization of sensory nerve ending (in Hungarian). **Kiserletes Orvostudomány**, 2: 15, 1949.

JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GABOR, A.; SZOLCSANYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pre-treatment with capsaicin. **Br J Pharmacol**, 31:138-51, 1967.

JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GABOR, A.; SZOLCSANYI, J. The role of sensory nerves endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. **Br J Pharmacol** (33):32-41, 1968.

JEREMY, J.Y., MIKHAILIDIS, D.P., KARATAPANIS, S., HARRY, D., BURROUGHS, A.K., MCINTYRE, N., STANSBY, G., JACOBS, M., MCCORMICK, A. Altered prostacyclin synthesis by aortae from hepatic portal vein-constricted rats: evidence for effects on protein kinase C and calcium. **J Hepathol**, 21: 1017-22, 1994.

JIANG, J., WANG, Z.G., LAI, X.N., ZHU, J.M., ZHU, P.F. Effects of substance P on granulation tissue fibroblasts proliferation and expression of basic fibroblast growth factor mRNA. **Zhonghua Wai Kzzhi**, 42 (6): 366-8, 2004.

JIMENEZ, W., POO, J.L.; LEIVAS, A. Endothelin ans systemic, renal and hepatic memidynamic disturbances in cirrhosis. In: V.ARROYO, P.GINES, J.RODES, R.W.SCHIER (Eds.), **Ascites and renal dysfunction in liver disease**. Malden, Oxford, Edinburgh and Carlton: Blackwell Science, 1999, p.291-306.

JOHANSSON, O., FANTINI, F., HU, H. Neuronal structural proteins, transmitters, transmitter enzymes and neuropeptides in human Meissner corpuscles: a reappraisal using immunohistochemistry. **Arch Dermantol Res**, 291: 419-24, 1999.

JOHNSTONE, C.I.; JOSE, A.D. Reduced vascular response to angiotensin II in secondary hyperaldosteronism. **J Clin Invest**, 42; 1411-20, 1963.

KALIL-GASPAR, P. Neuropeptides in the skin. **An Bras Dermatol** 78 (40); 483-498, 2003.

KAMOI, K., ISHIBASHI, M.; YAMAJI, T. Plasma endothelin-1 levela in patients with hyponatremia. **Nephron** 62, 469-70, 1993.

KAPLAN, N.M.;SILLAH, J.G. The effect of angiotensin II on the blood pressure in humans with hypertensive disease. **J Clin Invest**, 43; 659-69, 1964.

KARMELI, F., ELIAKIN, R., OKON, E.; RACHMILEWITZ, D. Gastric mucosal damage by ethanol is mediated by substance P and prevented by ketotifen, a mast cell stabilizer. **Gastroenterology**, 100: 1206-16, 1991.

KATAYAMA, I.; NISHIOKA, K. Substance P augments fibrogenic cytokine-induced fibroblast proliferation: possible involvement of neuropeptides in tissue fibrosis. **J Dermatol Sci**, 15:201-6, 1997.

KATO, S., KITAMURA, M., KOROLKIEWICZ, R.P., TAKEUCHI, K. Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: effects of NO donors and NO synthase inhibitor. **Br J Pharmacol**, 123(5):839-46, 1998.

KAUNITZ, J.D.; AKIBA, Y. Duodenal intracellular bicarbonate and the 'CF paradox'. **JOP**, 2 (4suppl): 268-73, 2001.

KAVIANI A, OHTA, M., ITANI, R., SANDER, F., TARNAWSKI, A.S., SARFEH, I.J. Tumor Necrosis Factor-Alpha Regulates Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Portal Hypertensive Gastric Mucosa of The Rat. **J Gast Surg**, 371-6, 1997.

KILBOURN, R.G.; GOLDFARB R. Can nitric oxide production be modulated by altering L-arginine levels? **Crit Care Med**, 27(11):2586-7. Review, 1999.

KILBOURN, R.G.; GRIFFITH, O.W. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. **J Natl Cancer Inst** 3;84(11):827-31. Review, 1993.

KINCY-CAIN, T. ; BOST, K.L. Increased susceptibility of mice to salmonella infection in vivo treatment with substance P antagonist, spantide II. **J Immunol**, 157: 255-264, 1996.

KIRKEBOEN, K.A.; STRAND, O..A. The role of nitric oxide in sepsis- an overview. **Acta anesthesiologica Scandinavica**, 43:275-288, 1999.

KISHIHARA, F., HASHIZUME, M., OHTA, M., KAWANAKA, H., TOMIKAWA, M., HIGASHI, H., TANOUE, K., SUGIMACHI, K. The effect of prostacyclin on the gastric mucosa in portal-hypertensive rats. **Hepatogastroenterology**, 49 (43): 279-84, 2003.

KONTUREK, S.J., BRZOZOWSKI, T., MAJKA, J., SZLACHCIC, A., CZARNOBILSKI, K. Nitric Oxide in gastric protection by sucralfate, mild irritant, and nocloprost. Role of mucosal blood flow. **Dig Dis Sci**, 39: 593-600, 1994.

KOPPENOL, W.H., MORENO, J.J., PRYOR, W.A., ISHIROPOULOS, H., BECKMAN, J.S. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. **Chem. Res. Toxicol**, 5: 834-42, 1993.

KOTZAMPASSI, K., ELEFThERIADIS, E., ALETRAS, H. The 'mosaic-like' pattern of portal hypertensive gastric mucosa after variceal eradication by sclerotherapy. **J Gastroenterol Hepatol**, 5(6):659-63, 1990.

KROWKA, M. J. Hepatopulmonary syndrome versus portopulmonary hypertension: distinctions and dilemmas. **Hepatology**, 25, 1282-84, 1997.

KUNKEL, S.L., WIGGINS, R.C., CHENSUE, S.W., LARRICK, J. regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E3. **Biochem Biophys res Commun**, 137: 404-10, 1996.

KURIHARA, T, AKIMOTO, M, KUROKAWA, K., ISHIGURO, H., NIIMI, A., MAEDA, A., SIGEMOTO, M., YAMASHITA, K., YOKOYAMA, I., HIRAYAMA, Y. et al. ET-3 sensitive reduction in tissue blood flow in rat liver. *Life Sci* 51 (10): 101-106, 1992.

LAMBRECHT, N., BURCHERT, M., RESPONDEK, M., MULLER, K.M., PESKAR, B.P. Role of calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in the gastroprotective effect of capsaicin in the rat. **Gastroenterology**, 104:1371-80, 1993.

LARAGH, J. H., CANNON, P.G., BENTZEL, C.J., SICINSKI, A.F., MELTZER, J.L. Angiotensin II Norepinephrine, and renal transport of electrolytes and water in normal mice and in cirrhosis with ascites. **J Clin Invest**, 42; 1179- 92, 1963.

LAWSON, S.N., NICKELS, S.M. The use of morphometric techniques to analyse the effect of neonatal capsaicin treatment on rat dorsal root ganglia and dorsal roots. **J Physiol**, 303:12P, 1980.

LEBREC, D.; MOREAU, R. Pathophysiology of portal hypertension. **Hepatogastroenterology**, 46 (suppl. 2): 1426- 28, 1999.

LEE, F.Y., COLOMBATO, L.A., ALBILLOS, A., GROSZMANN, R.J. Administration of N-nitro-L-arginine ameliorates portal-systemic shunting in portal hypertensive rats. **Gastroenterology**, 105: 1464-70, 1993.

LEE, S.S., JOHASEN, K, LEBREC, D. Circulatory changes induced by portal venous diversion and mesenteric hypertension in rats. **Hepatology**, 15: 117-21, 1993.

LEMBECK, F.; HOLZER, P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. **Naunyn Schmied Arch Pharmac**, 310: 175-83, 1979.

LI, Y., SONG, D., ZHANG, Y., LEE, S.S. Effect of neonatal capsaicin treatment on haemodynamics and renal function in cirrhotic rats. **Gut**, 52(2):293-9, 2003.

LIN, P.W., SHAN, Y.S. Portal hemodynamics and humoral factors involved in a portal hypertensive rabbit model. **Proc Natl Sci C Rep China B** 19 (4): 240-5, 1995.

LISNEY, S.J.W., BHARALI, L.A.M. The axon reflex. An outdated idea or a valid hypothesis? **New Physiol Sci**, 4: 45-8, 1989.

LISS, P., CARLISSON, P.O., NYGREN, A., PALM, F.; HANSELL, P. ET-A receptor antagonist BQ123 prevents radiocontrast media-induced renal medullary hypoxia. **Acta Radiológica**, 44: 111-7, 2003.

LIU, H., CAO, Y., BASBAUM, A.I., MAZARATI, A.M., SANKAR, R., WASTERLAN, C.G. Resistance to excitotoxin-induced seizures and neuronal death in mice lacking the preprotachykinin A gene. **Proc. Natl Acad Scien USA**, 96: 12096-101, 1999.

LIU, H.; LEE, S.S. Cardiopulmonary dysfunction in cirrhosis. **J. Gastroenterol Hepatol** 14; 600-8, 1999.

LOPEZ, F., ESTEVE, J.P., BUSCAIL, L., DELESQUE, N., SAINT-LAURENT, N., VAYSSE, N., SUSINI, C. Molecular mechanisms of antiproliferative effect of somatostatin; involvement of a tyrosine phosphatase. **Metabolism**, 45: 14-6, 1996.

LOTTI, T., HAUTMANN, G., PANCONESI, E. Neuropeptides in skin. **J Am Acad Dermatol**, 33:482-96, 1995.

LOWMAN, M.A.; BENYON, R.C.; CHURCH, M.K. Characterization of neuropeptide-induced histamine release from human dispersed skin mast cell. **Br J Pharmacol**, 95: 121-30, 1988.

LUEBKE, A.E., DAHL, G.P., ROOS, B.A., DICKERSON, I.M. Identification of a protein that confers calcitonin gene-related peptide responsiveness to oocytes by using a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator assay. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93: 2455-60, 1996.

LUNDBERG, J.M. Capsaicin-sensitive sensory nerves in the airways: implications for protective reflexes and disease. **See Wood**, p. 220-37, 1993.

LUNDBERG, J.M. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. **Pharmacol. Rev**, 48 :114-35, 1996.

MACCOMARCK, T.T., SIMS, J., EYRE-BROOK, Y., KENNEDY, H., GOEPEL, J., JOHNSON, A. G. e TRIGGER, D.R. Gastric lesions in portal hypertension, inflammatory gastritis or congestive gastropathy? **Gut**, 26, 1226 – 32, 1995.

MACGILCHRIST, A. J.; SUMNER, D.; REID, J.L. Impaired pressor reactivity in cirrhosis: evidence from a peripheral vascular defect. **Hepatology**, 13; 689-94, 1991.

MACLEOD, A.M., MERCHANT KJ, CASCIERI MA, SADOWSKI S, BER E, SWAIN CJ, BAKER R. **J Med Chem**, 36 (14): 2044-5, 1993.

MACNAUGHTON, W.K., CIRINO, G., WALLACE, J.L. Endothelium-derived relaxing factor nitric oxide has protective actions in the stomach. **Life Sci**, 45:1869-76, 1989.

MAGGI, C.A. The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. **J Auton Pharmac**, 11: 173-208, 1991.

MAGGI, C.A. The pharmacological modulation of neurotransmitter release. In Wood John, ed. **Capsaicin in the study of pain**. New York, Harcourt Brace e Company, 161-89, 1993.

MAGGI, C.A. Tackylkinins and calcitonin gene-related peptides (CGRP) as co-tansmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Prog. Neurobiol.**, 45: 1-98, 1995.

MANNICK, E.E., BRAVO, L.E., ZARAMA, G., RELAP, J.L., ZHANG, X.J., RUIZ, B. et al. Inducible nitric oxide syntase, nitrotyrosine, and apoptosismin helicobacter pylori gastritis: effects of antibiotic and antioxidants. **Cancer Res**, 56: 3238-43, 1996.

MARKUS, A.M.; KOCKERLING, F.; NEUHUBER, W.L. Close anatomical relationship between nerve fibers and MHC class II-expressing dendritic cells in the rat liver and extrahepatic bile duct. **Histochem Cell Biol**, 109: 409-15, 1998.

MARRIOT, I., MASON, M.J., ELHOFY, A., BOST, K.L. Substance P activates NF κ B independent of elevations in intracellular calcium in murine macrophages and dendritic cells. **J neuroimmunol**, 102: 163-71, 2000.

MARSHAK, D.W., ALDRICH, L.B., DEL VALLE, J., YAMADA, T. Localization of immunoreactive cholecystokinin precursor to amacrine cells and bipolar cells of the macaque monkey retina. **J Neurosci**, 10(9):3045-55, 1990.

MARTIN, M.J.; JIMENEZ, M.D.; MOTILVA, V. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. **Current Pharmaceut Design**, 7: 881-908, 2001.

MASAKI, T.; YANAGISAWA, M. Endothelins. **Assays Biochem** 27, 79-89, 1993.

MASAKI, T.; YANAGISAWA, M. Physiology and pharmacology of endothelins. **Medicinal Research Reviews**, 12, 391-421, 1993.

MASHIMO, H., GOYAL, R.K. Lessons from genetically engineered animal models IV: nitric oxide syntase gene knockout mice. **Am J Physiol**, 277: G745-G750, 1999.

MASUDA, E., KAWANO, S., NAGANO, K., TSUJI, S., TAKEI, Y., TSUJI, M., OSHITA, M., MICHIDA, T., KOBAYASHI, I., NAKAMA, A. et al. Endogenous nitric oxid modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Gastroenterology**, 108 (1): 58-64, 1995.

MAY, V., BRAAS, K.M . Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). Regulation of sympathetic neuron neuropeptide Y and catecholamine expression. **J Neurochem**, 65: 978-87, 1995.

MEADE, E.A.; SMITH, W.L.; DEWITT, D.L. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. **J Biol Chem** 25;268(9):6610-4, 1993.

MEISSNER, G. Über die nerven der Darmwand. **Z Ration Med**, 8: 364-6, 1857.

MESSMER, U.K.; BRUNE, B. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. **Biochem J**, 1;319 (Pt 1):299-305, 1996.

MIGOH, S., HASHIZUME, M., TSUGAWA, K., TANOUE, K. ; SUGIMACHI, K. Mechanism and control of gastric mucosal injury and bleeding. Role of endothelin-1 in congestive gastropathy in portalk hypertensive rats. **J Gastroenterol Hepatol**, 15: 142-7, 2000.

MILLER, M.J.S., SANDOVAL, M. Nitric oxide III: a molecular prelude to intestinal inflammation. **Am J Phy**, 276: G315-G21, 1999.

MILLER, M.J.S., THOMPSON, J.H., ZHANG, X.J, SADOWSKA-KROWICKA, H., KAKKIS, J.L., MUNSHI, U.K. et al. Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxinitrite formation in guinea pig ileitis. **Gastroenterology**, 109: 1475-83, 1995.

MILNER, P., LOESCH, A., BURNSTOCK, G. Endothelin immunoreactivity and mRNA expression in sensory and sympathetic neurones following selective denervation. **Int J Devl Neuroscience** 18: 727-34, 2000.

- MISERY, L. Skin, Immunity and nervous system. **Br J Dermatol**, 137: 843-50, 1997.
- MOLLACE, V., MUSCOLI, C., MASINI, E., CUZZOCREA, S., SALVEMINI, D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. **Pharmacol Ver**, 57 (2):217-52, 2005.
- MOLLER, S.; CHRISTENSEN, E.; HENRIKSEN, J.H. Continuous blood pressure monitoring in cirrhosis relates to splanchnic and systemic haemodynamics. **J Hepatol**, 27; 284- 294, 1997.
- MOLLER, S., HENRIKSEN, J.H. The systemic circulation in cirrhosis. **Malden: blackwell**, 307-329, 1999.
- MOLLER, S.; BENDTSEN, F.; HENRIKSEN, J.H. Vasoactive substances in the circulatory dysfunction of cirrhosis. **Scand J Clin Lab Invest**, 61; 421-30, 2001.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**, 43:109-142, 1991.
- MONTMINY, M., BRINDLE, P., ARIAS, J., FERRERI, K., ARMSTRONG, R. Regulation of somatostatin gene transcription by cyclic adenosine monophosphate. **Metabolism**, 45: 4-7, 1996.
- MOORE KW, O'GARRA A, WALL MALEFYT R, et al. Interleukin-10. **Annu Rev Immunol**, 11: 165-90, 1993.
- MOORE, PK, HANDY, RLC. Selective inhibitors of neural nitric oxide synthase – no NOS really good NOS for the nervous system? **TiPs** (18): 204-211, jun, 1997.
- MORALES, B.F., JOHNSON, B.L.; SZABO, S. Endothelin induces vascular and mucosal lesions, enhances the injury by HCl/ethanol, and the antibody exerts gastroprotection. **FASEB J**, 6: 2354-60, 1993.
- MOREAU, R.; LEBREC, D. Endogenous factors involved in the control of arterial tone in cirrhosis. **J Hepatol**, 22; 370-376, 1995.

MORRIS, G.P., BASU, B.K., HOLITZNER, C.A., WILLIAMSON, T.E. Mucosal secretion and cytoprotection of the rat gastric mucosa. **J Clin Gastroenterol**, 17:S5-10, 1993.

MURAD, F. Nitric oxide signaling: would you believe that a simple free radical could be a second messenger, autacoid, paracrine substance, neurotransmitter, and hormone? **Recent Prog Horm Res**, 53: 43-60, 1998.

MURATA, T., USHIKUBI, F., MATSUOKA, T., HIRATA, M., YAMASAKI, A., SUGIMOTO, Y. et al. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. **Nature**, 14;388 (6643):678-82, 1997.

MURCH, S.H., LAMKIN, V.A., SAVAGE, M.O., WALKER-SMITH, J.A., MACDONALD, T.T. Serum concentrations of tumour necrosis factor-alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. **Gut**, 32:913-17, 1991.

MURCH, S.H., BRAEGGER, C.P., WALKER-SMITH, J.S, et al. Localization of tumour necrosis factor-alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. **Gut**, 34: 1705-09, 1993.

NAGHASHPOUR, M., ROSENBLATT, M.I., DICKERSON, I.M., DAHL, G.P. Inhibitory effect of calcitonin gene-related peptide on myometrial contractility is diminished at parturition. **Endocrinology**, 138: 4207-14, 1997.

NAKAHASHI, T., MORIMOTO, S., OGIHARA, T. Angiotensin receptor. **Nippon Rinsho**, Apr 55 (Suppl 2) : 546-8, 1997.

NAKATA, Y., KUSAKA, Y., YAMAJIMA, H., SEGAWA, T. Active uptake of substance P carboxy-terminal heptapeptide (5-11) into rat brain and rabbit cord slice. **J Neurochem**, New York, 37: 1529-34, 1981.

NARITA M, DUN SL, DUN NJ, TSENG LF. Hyperalgesia induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the mouse sal cord. **Eur J Pharmacol** 311: 21-6, 1996.

NAYLOR, WG. Endothelin: isoforms, binding sites and possible implications in pathology. **Trends Pharmacol Sciences**, 11, 96-99, 1990.

NELSON EK. The constitution of capsaicin, the pungent principal of capsicum. **J. Am. Chem. Soc.** 41:1115-21, 1919.

NESS TJ, GEBHART GF. Visceral pain: a re-view of experimental studies. **Pain** 41:167-234, 1990.

NILSSON, J., VON EULER, A.M., DALSGAARD, C.J. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. **Nature** (Lond.), 315: 61-3, 1985.

NILSSON, S.P.E., MAEPEA, O. Comparison of the vasodilatory effects of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and peptide HI (PHI) in the rabbit and the cat. **Acta Physiologica Scand**, 129: 17-26, 1987.

NOBACK, C.R., STROMINGER, N.L., DEMAREST, R. **Neuroanatomia**: estrutura e função do sistema nervoso humano, 5^a ed, Rio de Janeiro, Ed. Premier,., 1999.

NOLAN, J.P. The role of endotoxin in liver injury. **Gastroenterology**, 69: 1346-56, 1975.

NUNEZ, M.O., CLEMENT, R.G., GARCIA, M.C. Role of cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of chronic liver diseases. **Med Clin Nov**, 29; 121 (19):743-8, 2003.

ODUM, L., PETERSEN, L.J., SKOV, P.S., EBSKOV, L.B. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is localized in human dermal neurons and causes histamine release from skin mast cells. **Inflamm Res**, 47: 488-92, 1998.

OGAWA, K., NABE, T., YAMAMURA, H., KOHNO, S. Nanomolar concentrations of neuropeptides induce histamine release from peritoneal mast cells of a substrain of wistar rats. **Eur J Pharmacol**, 374: 285-91, 1999.

OHTA, M., HASHIZUME, M., HIGASHI, H., UENO, K., TOMIKAWA, M., KISHIHARA, F., KAWANAKA, H., TANOUE, K., SUGIMACHI, K. Portal and gastric mucosal hyperdynamics in cirrhotic patients with portal hypertension gastropathy. **Hepatology**, 20: 1432-6, 1994.

OHTA, M., KISHIHARA, F., HASHIZUME, M., KAWANASA, H., ATOMIKAWA, M., HIGASHI, H., TANOUE, K.; SUGIMACHI, K. Increased prostacyclin content in gastric mucosa of cirrhotic patients with portal hypertensive gastropathy. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 53; 41-45, 1995.

OHTA M, TANOUE K, TARNAWSKI AS, PAI R, ITANI RM, SANDER FC, SUGIMACHI K, SARFEH IJ. Overexpressed nitric oxide synthase in portal-hypertensive stomach of rat: a key to increased susceptibility to damage? **Gastroenterology**, 112(6):1920-30, 1997.

OHTA, M., PAI, R., KAWANAKA, H., MA, T., SUGIMACHI, K., SARFEH, I.J., TARNAWSKI, A.S. Expression of endothelin-1, and endothelin A and B receptors in portal hypertensive esophagus of rats. **J Phy Pharmacol**, 51 (1): 57-67, 2000.

OLIVERO, J.J.; GRAHAM, D.Y. Gastric adaption to nonsteroidal anti-inflammatory drugs in man. **Scand J Gastroenterol**, 27:53–58, 1993.

ONKUBO, H.; NAKANISHI, S. Molecular characterization of the three tachykinin receptors. In: **substance P and related peptides: cellular and molecular physiology** (Leeman SE, Krause JE, Lembreck F, eds 53-63. New York: New York Academic of Sciences, 1991.

OSTROW, J.D, TIMMERMAN, R.J., GRAY, S.J. Gastric secretion in human hepatic cirrhosis. **Gastroenterology**, 38: 303-13, 1960.

OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K . Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol Rev**, 73: 229-308, 1993.

OTTESEN, L.H., HARRY, D., FROST, M., DAVIES, S., KHAN, K., HALLIWELL, B., MOORE, K. Increased formation of S-nitrothiols and nitrotyrosine in cirrhotic rats during endotoxemia. **Free Radical Biology e Medicine**, 31(6): 79-798, 2001.

OYEKAN, A.O.; MCGIFF, J.C. Functional response of the rat kidney to inhibition of nitric oxide synthesis: role of cytochrome p450-derived arachidonate metabolites. **Br J Pharmacol**, 125(5):1065-73, 1998.

PAIMELA, H., GODDARD, P.J., SILEN, W. Present views on restitution of gastrointestinal epithelium. **Dig Dis Sci**, 40:2495-96, 1995.

PARENTI, A., AMERINI, S., LEDDA, F., MAGGI, C.A., ZICHE, M. The tachykinin NK1 receptor mediates the migration-promoting effect of substance P on human skin fibroblasts in culture. **Naunin-Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 353: 475-81, 1996.

PATERMANN, H., VOGL, S., SHULZE, E., e DARGEL, R. Chronic liver injury alters basal and stimulated nitric oxide production and 3H-thymidine incorporation in cultured sinusoidal endothelin cells from rats. **J Hepatol**, 31: 284-292, 1999.

PATERNON, D., TAZI, K.A., SOGNI, P., HELLER, J., CHAGNEAU, C., POIREL, O., PHILIPPE, M., MOREAU, R., LEBREC, D. Role of aortic nitric oxide synthase 3 (eNOS) in the systemic vasodilation of portal hypertension. **Gastroenterology**, 119: 196-200, 2000.

PERNET, P., COUDRAY-LUCAS, C., BOUCHER, J., SCHLEGEL, L., GIBOUDEAU, J., CYNOBER, L.; AUSSEL, C. Is the L-arginine-nitric oxide pathway involved in endotoxemia-induced muscular hypercatabolism in rats? **Metabolism**, 48: 190-3, 1999.

PIEPOT, H.A., GROENEVELD, A. B. J., LAMBALGEN VAN A.A., e SIPKEMA, P. The role of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-mediated hyporeactivity to vasoconstrictors differs among isolated rat arteries. **Clinical Science**, 102, 297-305, 2003.

PIQUET, J.M., WHITTLE, B.J., ESPLUGUES, J.V. The vasodilator role of endogenous nitric oxide in rat gastric microcirculation. **Eur J Pharmacol**, 174: 293-296, 1989.

PIQUET, J.M. Portal Hypertensive Gastropathy. **Baillieres Clin. Gastroenterol**, 11, 257 – 70, 1997.

PIQUET, J.M., ESPLUGUES, J.V., WHITTLE, B.J. Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilatation during acid secretion. **Gastroenterology**, 102(1):168-74, 1993.

POMONIS, J.D., ROGERS, S.D., PETERS, C.M., GHILARDI, J.R., MANTYH, P.W. Expression and localization of endothelin receptors: implications for the involvement of peripheral glia in nociception. **J Neurosci**, 1;21(3):999-1006, 2001.

QUARTARA, L.; MAGGI, C.A. The tachykinin NK1 receptor. Part II: distribution and pathophysiological roles. **Neuropeptides**, 32: 1-49, 1998.

RAMESHWAR, P., GANEA, D., GASCON, P. Induction of IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by substance P in bone marrow cells is partially mediated through the release of IL-1 and IL-6. **J Immunol**, 152: 4044-54, 1994.

RAUD, J., LUNDEBERG, T., BRODDA-JANSEN, G., THEODORSSON, E., HEDQVIST, P. Potent anti-inflammatory action of calcitonin gene-related peptide. **Biochem Biophys Res Commun**, 180: 1429-35, 1991.

REGOLI, D., DRAPEU, G., DION, S., D'ORLÉANS-JUST, P.D. Receptors for substance P and related neurokinins. **Pharmacology**, 38: 1-15, 1989.

REMUZZI, G., PERICO, A; BENIGNI, A. New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. **Nature**, 1: 986-1001, 2003.

RIBEIRO, M.O., ANTUNES, E., DE NUCCI G., LOVISOLO, S.M. ZATZ, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension**, 20(3):298-303, 1993.

ROBERT, A., NEZAMIS, J.E., LANCASTER, C., DAVIS, J.P., FIELD, S.O., HANCHAR, A.J. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptive cytoprotection" mediated by prostaglandins. **Am J Physiol**, 245:G113-21, 1983.

SALVEMINI, D., MISKO, T.P., MASFERRER, J.L., SEIBERT, K., CURRIE, M.G., NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1; 90(15):7240-4, 1993.

SANDERS, M.J., AYALON, A, ROLL, M. SOL, A.H. The apical surface of canine chief cell monolayers resist H⁺ Back-infusion. **Nature**, 313: 51-4, 1985.

SANDERS, D.B., LARSON, D.F., JABLONOWSKI, C., OLSEN, L. Differential expression of inducible nitric oxide synthase in septic shock. **J Extra Corpor Technol**, 31(3):118-24, 1999.

SANTUCCI L, FIORUCCI S, GIANSAANTI M, BRUNORI PM, DIMATTEO FN, MORELLI A. Pentoxifylline prevents indomethacin-induced acute mucosal damage in rats: role of tumor necrosis factor-alfa. **Gut**, 35:909-915, 1994.

SARELA, A. J., MIHAIMEED, A., BATTEN, J.J., DAVIDSON, B.R. e MATHIE, R.T. Hepatic and splanchnic nitric oxide activity in patients with cirrhosis. **Gut**, 44; 749-753, 1999.

SARFEH, I.J., TARNAWSKI, A., HADJUCZECK, A., STACHURA, J., BUI, H.X. e KRAUSE, W.J. The portal hypertensive gastric mucosa, histological, ultrastructural and functional analysis after aspirin-induced damage. **Surgery**, 104:79-85, 1988.

SCHOLZEN, T., ARMSTRONG, C., BURNETT, N., LUGER T, OLERUD J, ANSEL, J. Neuropeptides in the skin : interaction between the neuroendocrine and the skin immune systems. **Exp Derm**, 7: 81-96, 1998.

SCHREIBER, S., CAMPIERI, M., COLOMBEL, J.F., VAN DEVENTER, S.J., FEAGAN, B., FEDORAK, R., FORBES, A. ET AL . Use of anti-tumour necrosis factor agents in inflammatory bowel disease: European guidelines for 2001-2003. **Int J Colorectal Dis**, 16:1-11, 2001.

SCHRIER, R.W., NIEDERBERGER, M., WEIGERT, A., GINES, P. Peripheral arterial vasodilatation: determinant of functional spectrum of cirrhosis. **Semin Liver Dis**, 14(1):14-22, 1994.

SCHUTT, C. Fighting infection: the role of lipopolysaccharide binding proteins CD14 and LBP. **Pathobiology** 67(5-6):227-9. Review, 1999.

SCORZA, G., MINETTI, M. One-electron oxidation pathway of thiols by peroxynitrite in biological fluids: bicarbonate and ascorbate promote the formation of albumin disulphide dimers in human blood plasma. **Biochem J**. 329; 405-413, 1998.

SHIMOMURA A, ITOH H, NIKI Y, SUGA T, FUJIOKA H et al. Contractile actions of endothelins in rat gastric body: evidence for receptor subtypes and involvement of prostaglandin E3. **Eur J Pharm**, 2: 252 (1): 81-86, 1994.

SITZMANN, J.V., CAMPBELL, K., WU, Y., e ST. CLAIR, C. Prostacyclin production in acute, chronic, and long-term experimental portal hypertension. **Surgery**, 115; 290-294, 1994.

SKELJO MV, COOK GA, ELLIOTT SL, GIRAUD AS, YEOMANS ND. Gastric mucosal adaptation to diclofenac injury. **Dig Dis Sci**, 41:32-39, 1996.

SLOMIANY, BL, SLOMIANY A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs impair oral mucosal repair by eliciting disturbances in endothelin-converting enzyme 1 and constitutive nitric oxide synthase. **PhysiolPharmacol**. Mar 52(1):81-93., 2001.

SOGNI P, SABRY S, MOREAU R, GADANO A, LEBREC D, DINH-XUAN AT. Hyporeactivity of mesenteric resistance arteries in portal hypertensive rats. **J Hepatol Apr** ;24 (4):487-90, 1996.

SPINELLA F, ROSANO L, DI CASTRO V, NICOTRA MR, NATALI PG, BAGNATO A. Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 expression by targeting the endothelin a receptor in human ovarian carcinoma cells. **Clin Cancer Res**. Jul 15;10(14):4670-9, 2004.

STADLER J, HARBRECHT BG, DI SILVIO M, CURRAN RD, JORDAN ML, SIMMONS RL, BILLIAR TR. Endogenous nitric oxide inhibits the synthesis of cyclooxygenase products and interleukin-6 by rat Kupffer cells. **J Leukoc Biol**. Feb;53(2):165-72, 1993.

STANISZ AM, SCICCHITANO R, BIENNENSTOCH J. The role of vasoactive intestinal polypeptide and other neuropeptides in the regulation of immune responses in vitro and in vivo. **Ann NY Acad Sci** 527: 478-85, 1988.

STEAD RH, DOXON, MF, BRAMWELL NH, et al . Mast cells are closely apposed to nerves in on the human gastrointestinal mucosa. **Gastroenterology** 97:575-85, 1989.

STEINHOFF M, MAcGREGOR GP, RADLEFF-SCHLIMME A, et al. Identification of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP type 1 receptor in human skin: expression of PACAP-38 is increased in patients with psoriasis. **Regul Peptides** 80: 49-55, 1999.

STERNER-KOCK, A, BRAUN RK, VAN DER VLIET, A. et al. Substance P primes the formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in human neutrophils. **J Leukoc Biol** Jun 65 (6): 834-40, 1999.

STOCLET, J.C., MARTINEZ, M.C., OHLMAN, P, CHASSEROT, S., SCHOTT, C., KLESCHYOV, A.L., SCHNEIDER, F., ANDRIANTSITOHAINA, R. INDUCION OF NITRIC OXIDE SYNTHASE and dual effects nitric oxide and cyclooxygenase products in regulation of arterial contraction in human septic shock. **Circulation**, 100,107-12, 1999.

STORDER, P., GOLDMAN M. Interleukin-10 as a regulatory cytokine induced by cellular stress: molecular aspects. **Int Rev Immunol**, 16: 501-522, 1998.

STOYANOVA, I.I. ; GULUBOVA, M.V. Peptidergic nerve fibers in the human liver. **Acta Histochem** 100: 245-256, 1998.

STRICKER, S. Untersuchungen über die Gefäßwurzeln des ischiadicus. **Sitzungsber Kaiserl Akad (Wiss)** 3: 173-185, 1876.

STUEHR, D.J.; MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 82(22):7738-42, 1985.

SUNDLER, F., HAKANSON, R., EKBLAD, E., UDDMAN, R. Neuropeptide Y in peripheral adrenergic and enteric nervous systems. **Int rev Cytol**, 102: 243-69, 1986.

SUNG, C.P., ARLETH, A.J., FEUESTEIN, G.Z. Neuropeptide Y up-regulates the adhesiveness of human endothelial cells for leukocytes. **Circ Res**, 68:314-318, 1991.

SUPPRENANT, A. Control of gastrointestinal tract by enteric neurons. **Ann Rev Physiol** 56:117, 1994.

SVENTEK P, LI JS, GROVE K, DESCHEPPER CF, SCHIFFRIN EL. Vascular structure and expression of endothelin-1 gene in L-NAME-treated spontaneously hypertensive rats. **Hypertension** Jan;27(1):49-55,1996.

SZABO C, SALZMAN AL, ISCHIROPOULOS H. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123 occurs in early stages of endotoxic and hemorrhagic shock and ischemia-reperfusion injury. **FEBS Lett.** Sep 25;372(2-3):229-32, 1995.

SZABO C, WU CC, GROSS SS, THIEMERMANN C, VANE JR. Interleukin-1 contributes to the induction of nitric oxide synthase by endotoxin in vivo. **Eur J Pharmacol.** Nov 30;250(1):157-60, 1993.

SZALLASI, A, BLUMBERG, PM. Minireview. Resiniferatoxin and analogs provide novel insights into the pharmacology of vanilloid (capsaicin) receptor. **Life Sci** 47 (16): 1399-1408, 1990.

SZALLASI, A, BLUMBERG, PM. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol Rev**, Baltimore, v.51, n.2, p.159-212, 1999.

SZALLASI, A, BLUMBERG, PM. Vanilloid receptor. New insights enhance potential as a therapeutic target. **Pain**, Amsterdam, v.68, p.195-208, 1996.

SZOLCSÁNYI, J, HELYES, ZS, OROSZI, G, NEMETH, J, PINTER, E. Release of somatostatin and its role in the mediation of the antiinflammatory effects induced by antidromic stimulation of sensory fibers of sciatic nerve. **Br J Pharmacol**, London, v. 123, n.5, p. 936-942, 1998.

SZOLCSÁNYI, J. A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerves fibres and receptor endings in mediating pain. **J.Physiol.** 73: 251-259, 1977.

TACHÉ Y, VALE W, BROWN M. Thyrotropin-releasing hormone-CNS action to stimulate gastric acid secretion. **Nature** 287:149–51, 1980a.

TACHÉ Y, VALE W, RIVIER J, BROWN M. Brain regulation of gastric secretion: influence of neuropeptides. **Proc Natl Acad Sci USA** 77:5515–9, 1980b.

TAKEUCHI, K, TANAKA, A, OHNO, R, YOKOTA A. Role of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal damage. **J Physiol Pharmacol** 54 (suppl 4): 165-182, 2003.

TAKEONO Y, JOU T, OSHIMA T, SUZUKI H, SENO Y YOKOYAMA Y, ALEXANDER JS e ITOH M. **j L Clin Med**, 143 (1): 52-58, 2004.

TAYLOR AW, STREINLER JW, COUSINS SW. Immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide (VIP) contributes to the immuno-suppressive activity of normal aqueous humor. **J Immunol**, 153: 1080-6, 1994.

TERADA, Y., TOMITA, K., NONOGUCHI, H., YANG, T., MARUMO, F. Expression of endothelin-3 mRNA along rat nephron segments using polymerase chain reaction. **Kidney Int**, 44(6): 1273-80, 1993.

TERES, J., BORDAS, J.M., BRU, C., DIAZ, F., BRUGUERA, M., RODES, J. Upper gastrointestinal bleeding in cirrhosis: clinical and endoscopic correlations. **Gut**, 17(1) :37-40, 1976.

THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock. **Gen Pharmacol**, 29(2):159-66. Review, 1997.

THRESH, L.T. Isolation of capsaicin. **Pharm J**, 6:941, 1846.

THULUVATH, P.J.; YOOD, H.Y. Portal Hypertensive Gastropathy. **A J Gastropathy**, 97 (12); 2973-8, 2003.

TIAN, B., LIU, J., BITTERMAN, P.B., BACHE, R.J. Mechanisms of cytokine induced NO-mediated cardiac fibroblast apoptosis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 283(5):H1958-67, 2002.

TIBONI G.M., CLEMENTINI, E. Teratological consequences of nitric oxide synthesis inhibition. **Curr Pharm Des**, 10(22):2759-67, 2004.

TIEGS, G., BANG, R., NEUHUBER, W.L Requirement of peptidergic sensory innervation for disease activity in murine models of immune hepatitis and protection by β -adrenergic stimulation. **J neuroimmunol**, 96: 131-43, 1999.

TITHERAGE, M.A. Nitric Oxide In Séptic Shock. **Biochemical And Biophysica Acta**, 1411:437-455, 1999.

TITOS, E., CLARIA, J., BATALLER, R, BOSCH-MARCE, M., GINES, P., JIMENEZ, W., ARROYO, V., RIVERA, F., RODES J. Hepatocyte-derived cysteinyl leukotrienes modulate vascular tone in experimental cirrhosis. **Gastroenterology**, 119 (3): 794-805, 2000.

TOMINAGA, M., CATERINA, M.J., MALMBERG, A.B, ROSEN, T.A., GILBERT, H., SKINNER, K. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain producing stimuli. *Neuron*, Cambridge Eng, v. 21 (3): 531-43, 1998.

TOOPER, J.N.; GIMBRONE, M.A. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as modulator of endothelial phenotype. **Mol Med Today**, 5, 40-6, 1999.

TOPPERMAN, B.J.; WHITTLE, B.J. Endogeneous nitric oxide and sensory neuropeptides interact in the modulation of the rat gastric microcirculation. **Br J Pharmacol**, 105: 171-5, 1992.

TORII, H., HOSOI, J., ASAHINA, A., GRANSTEIN, R.D. Calcitonin gene-related peptide and Langerhans cell function. **J Invest Dermatol Symp Proc**, 2 :82-6, 1997a.

TORII, H., HOSOI, J., BEISSERT, S., XU, S., FOX, F.E., ASAHINA, A., TAKASHIMA, A., ROOK, A.H., GRANSTEIN, R.D. Regulation of cytokine expression in macrophages and the Langerhans cell-line XS52 by calcitonin gene-related peptide. **J Leucocyte Biol**, 61: 216-23, 1997b.

TORII, H., YAN, Z., HOSOI, J., GRANSTEIN, R. Expression of neurotrophic factors and neuropeptide receptors by epidermal Langerhans cells and the Langerhans cell-like XS52: further support for a functional relationship between Langerhans cells and epidermal nerves. **J Invest Dermatol**, 109:586-91, 1997c.

TORRILLO, H., TAMAKI, K., GRANSTEIN, R.D. The effect of neuropeptides/hormones on Langerhans cells. **J Dermatol Sci**, 20: 21-8, 1999.

TOWLER, P.K.; BRAIN, S.D. Activity of tachykinin NK1 and bradykinin B2 receptor antagonists, and opioid ligand at different stimulation parameters in neurogenic inflammation in the rat. **Neurosci Lett**, 257: 5-8, 1998.

TOYONAGA, A.; IWAO, T. Portal Hypertensive Gastropathy. **J Gastroenterol Hepatol**, 13 (99): 865 – 77, 1998.

TREVISI, L., BOVA, S., CARGNELLI, G., CELOOTTO, G., LUCIANI, S. Endothelin-1 induced arachidonic acid release by cytosolic phospholipase A2 Activation in rat vascular smooth muscle via extracellular signal-regulated kinases pathway. **Biochem Pharmacol** 64; 425-431, 2003.

TREVISANI, M, SMART, D, GUNTHORPE, MJ, TOGNETTO, M, BARBIERI, M, CAMPI, B ET AL. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. **Nature Neuroscience**, 5 (6), 546-51, 2003.

TSUCHIDA K, SHIGEMOTO R, YOKOTA Y, NAKANISHI S. Tissue distribution and quantitation of the mRNAs for three rat tachykinin receptors. **Eur J Biochem**, 193: 751-7, 1990.

TSUKAMOTO, H., MATSUOKA, M., FRENCH, S.W. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. **Semin Liver Dis**, 10 (1): 56-62, 1990.

TSUTSUMI, S., TOMISATO, W., TAKANO, T., ROKUTAN, K., TSUCHIYA, T., MIZUSHIMA, T. Gastric irritant-induced apoptosis in guinea pig gastric mucosal cells in primary culture. **Biochimica Biophysica Acta**, 1589; 168-80, 2003.

TUNÇTAN, B., ULUDAG, O., ALTUG, S., ABCIOGLU, N. Effects of nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. **Pharmacol Res**, 38:405-11, 1998.

TYAGI SC. Extracellular matrix dynamics in heart failure: a prospect for gene therapy. **J Cell Biochem**, 15;68(4):403-10. Review, 1998.

UCHIDA, Y., NINOMYIA, H., SAOTOME, M., NOMURA, A., OHTSUKA, M., YANAGISAWA, M., GOTO, K., MASAKI, T., HASEGAWA, S. Endothelin a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. **Eur Jour Pharmacol**, 154, 227-8, 1988.

UMEDA Y. Inhibition of immune responses by calcitonin gene-related peptide. **Ann NY Acad Sci**, 657: 552-4, 1993.

URAYAMA, H., SHIBAMOTO, T., WANG, H.G., KOYAMA. S. Thromboxane A2 analogue contracts predominantly the hepatic veins in isolated canine liver. **Prostaglandins**, 52: 483-95, 1996.

VAN DULLEMEN, H.M., VAN DEVENTER, S.J.H., HOMMES, D.W., BIJL, H.A., JANSEN, J., TYTGAT, G.N., WOODY, J. Treatment of Crohn's disease with anti- tumour necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). **Gastroenterology** 109:129-35, 1995.

VANNER, S.; SUPPRENANT, A. Neural reflexes controlling intestinal microcirculation. **Am J Physiol**, 271:G 223, 1996.

VISSERS, Y.L.J., HALLEMEESCH, M.M., SOETERS, P.B., LAMERS, W.H., DEUTZ, N.E.P. NOS2 deficiency increases intestinal metabolism both in nonstimulated and endotoxemic mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 286: G747- G51, 2004.

VON EULER.,U.S., GADDUM, J.H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. **J Physiol London**, 72:74-87, 1931.

VON KNETHEN, A., BROCKHAUS, F., KLEITER, I., BRUNE, B. NO-Evoked macrophage apoptosis is attenuated by cAMP-induced gene expression. **Mol Med**, 5(10):672-84, 1999.

WALDMANN, R., CHAMPIGNY, G., BASSILANA, F., HEURTEAUX, C., LAZDUNSKI, M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. **Nature**, London, 386 (6621):173-7, 1997.

WALLACE, J.L. Mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) induced gastrointestinal damage- potential for development of gastrointestinal tract safe NSAIDs. **Can J Phy Phar**, 72: 1493-98, 1994.

WALLACE, J.L. Selective COX-2 Inhibitors: Is The Water Becoming Muddy? **Trends Pharmacol Sci**, 20: 4-6, 1999.

WALLACE, J.L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **Am J Med**, 110(Suppl 1): S19-S23, 2001.

WALLACE, J.L.; BELL, C.J. Gastromucosal defense. **Corr Opin Gastroenterol**, 12:503-11, 1996.

WALLACE, J.L.; GRANGER DN. The cellular and molecular basics of gastric mucosal defense. **FASEB J** 10:731-40. 1996.

WALLACE, J.L, KEENAN, C.M., MACNAUGHTON, W.K., McKNIGHT, J. Comparison of the effects of endothelin-1 and endothelin-3 on the rat stomach. **Eur J Pharmacol**, 167: 41-7, 1989.

WALLACE, J.L.; MA, L.I. Inflammatory Mediators in Gastrointestinal Defense and Injury. **Exp Bio Med**, 226 (11):1003-15, 2001.

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

WALLENGREN, J.; HAKÁNSON, R. Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory-mediated responses. **Eur J Pharmacol**, 143: 267-73, 1987.

- WALLENGREN, J. Vasoactives peptides in the skin. **J Invest dermatol Symp Proc**, 2:49-55, 1997.
- WANG, F., MILLET, I., BOTTOMLY, K., VIRGNERY, A. Calcitonin gene-related peptide inhibits interleukin-2 production by murine T lymphocytes. **J Biol Chem**, 154: 227-35, 1988.
- WARREN, J.B., COCKROFT, J.R., LARKIN, S.W., KAJEKAR, R., MACRAE, A., GHATEI, M.A., WEBER, K.T.; BRILLA, C.G. Mechanisms of cytokine induced NO-mediated cardiac fibroblast apoptosis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 283 (5):H1958-67, 2003.
- WEIDNER, C., KLEDE, M., RUKWIED, R., LISCHETZKI, G., NEISIUS, U., SKOV, P.S., PETERSEN, L.J., SCHMELZ, M. Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin – a microdialysis study. **J Invest Dermatol**, 115:1015-20, 2000.
- WHERTEIM WA, KUNKEL SL, STANDIFORD, T.J., BURDICK, M.D., BECKER, F.S., WILKE, C.A., GILBERT, A.R., STRIETER, R.M. Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E2, dexamethasone, and IL-4. **J Immunol**, 151:2166-2175, 1993.
- WHITTLE, B.J.R, LOPEZ-BELMONT, J., MONCADA, S. Regulation of gastric mucosal integrity by endogeneous nitric oxide: interations with prostanoids ans sensory neuropeptides in the rat. **Brit J Pharm**, 99: 607-611, 1990.
- WIEDERMANN, C.J., AUER, B., SITTE, B., REINISCH, N., SCHRATZBERGER, P., KAHLER C.M. Induction of endothelial cell defferentiation into capillary-like structures by susbtance P. **Eur J Pharmacol**, 298: 335-3, 1996.
- WILLIAMS, B. Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function. **J Hypertens**, 16; 1921-9, 1998.
- WON-CHOONG, C., CHEOL-KU, P., SUNG-JUN, K., WON-CHANG, S., JIN-HO, L., KWAN-YUP, K. ;TAE-HEE, H.A.N. Gastric pH and acid-suppressive therapy in liver cirrhosis patients. **Journal of Hepatology**, 36 (Suppl1): 200, 2003.

WU, C.X., SHI, Y.J., LIU, C.A., GONG, J.P., LI, S.W. The role of cyclooxygenase 2 and prostaglandin I₂ in the development of portal hypertensive gastropathy. **Zhonghua**, 11 (9): 536-8, 2003.

XIE, W., CHIPMAN, J.G., ROBERTSON, D.L., ERIKSON, R.L., SIMMONS, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88:2692-2696, 1991.

XIE, W., ROBERTSON, D.L., SIMMONS, D.L. Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a new target for nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Drug Dev Res**, 25:249-265, 1993.

XU, X.J., DALSGAARD, C.J., MAGGI, C.A., WIESENFELD-HALLIN, Z. NK-1, but not NK-2, tachykinin receptors mediate plasma extravasation induced by antidromic C-fiber stimulation in rat hindpaw: demonstrated with the NK-1 antagonist CP-96, 345 and the NK-2 antagonist Men 10207. **Neurosci. Lett**, 139 : 249-52, 1993.

XU, H., KORNESZCZUK, K., KARAA, A., LIN, T., CLEMENS, M. G.; ZHANG, J.X. Thromboxane A₂ from Kupffer cells contributes to the hyperresponsiveness of hepatic portal circulation to endothelin-1 in endotoxemic rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 288: G277–G 83, 2005.

YANAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., GOTO, K., MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, 332, 411-415, 1988.

YIN, J., LENG, X., ZHU, J. Plasma prostacyclin (PGI₂) levels in peripheral venous, arterial and portal venous blood in cirrhotic patients with portal hypertension and their clinical implication. **Chung H W K Tsa China**, 33:563-5, 1995.

YOKOYAMA, Y., XU, H., KRESGE, N., KELLER, S., SARMADI, A.H., BAVEJA R., CLEMENS, M.G., ZHANG J.X. Role of thromboxane A₂ in early BDL-induced portal hypertension. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 284:G453–G60, 2003.

YONEDA, M.; WATANOBE, H.; TERANO; A. Central regulation of hepatic function by neuropeptides. **J Gastroenterol**, 36:361–7, 2001.

YOSHIZAWA, T., KIMURA, S., KANAZAWA, I., UCHIYAMA, Y., YANAGISAWA, M. AND MASAKI, T. Endothelin localizes in the dorsal horn and acts on the spinal neurones: possible involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels and substance P release. **Neurosci. Lett**, 102, 179-184, 1989a.

YOUNG, P.A.; YOUNG, P.H. **Bases da neuroanatomia clínica**. Ed. Guanabara. São Paulo, SP, 1998.

ZANCANARO, C., MERIGO, F., CRESCIMANO, C., ORLANDINI, S., OSCULATI, A. Immunohistochemical evidence suggests intrinsic regulatory activity of human eccrine sweat glands. **J Anat**, 194: 433-44, 1999.

ZHANG, X.J., THOMPSON, J.H., MANNICK, E.E., CORREA, P., MILLER, M.J.S. Localization of inducible oxide nitric synthase in inflamed gastrointestinal mucosa by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Nitric Oxide Biol Chem**, 2: 187-192, 1998.

ZHOU QL, STRICHARTZ G, DAVAR G. Endothelin-1 activates ET(A) receptors to increase intracellular calcium in model sensory neurons. **Neuroreport**, 21;12 (18): 4175, 2001.

ZUKOWSKA-GROJEC Z, CULMAN J, KOPIN IJ.: Noradrenergic prazosin resistant splanchnic vasoconstriction during immobilization stress in rat: possible role for neuropeptide Y. **Am J Physiol**, 123:765-71, 1987.

8- OBRAS CONSULTADAS

BEAR, M.F., CONNORS, B.W., PARADISO, M.A – **Neurociências**: desvendando o sistema nervoso. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2003.

BENJAMINI, E., COICO, R., SUNSHINE, G. –**Imunologia**. 4.ed - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 2003.

COTRAN, R.S, KUMAR, V., COLLINS, T. – **Patologia Estrutural e Funcional**. 6.ed - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 2000.

GOMES, M.J.V.M./ REIS, A.M.M. - **Ciências Farmacêuticas** – 1.ed - Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2003.

GOODMAN e GILMAN'S – **Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 .ed - São Paulo: Editora Mcgraw-Hill, 2001.

GUYTON, A.C. – **Tratado de Fisiologia Médica**. 10.ed - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 2003.

MARTIN, J.H. – Neuroanatomia- 2.ed. Porto alegre: Artes Médicas,1998.

MARZZOCO, A., TORRES, B.B. – **Bioquímica Básica**. 2.ed - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MENDES, T.F., TORRES, P.R.R. - **Fígado e as Grandes Síndromes**. São Paulo: fundação BYK, 1995.

MINCIS, M. - **Gastronterologia e Hepatologia**: diagnóstico e tratamento. 3. ed. São Paulo:Lemos Editorial, 2003.

RANG H. P., DALE M.M. – **Farmacologia** – 5.ed - Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2003.

SILVA, P. – **Farmacologia** – 6.ed - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

SIQUEIRA-JÚNIOR, J.F.; DANTAS, C.J.S. - **Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação** - Rio de Janeiro: Médica Científica Ltda, 2000.

9- APÊNDICES

APÊNDICE 1- Produção Científica no Doutorado

1-Trabalhos apresentados em congressos nacionais (Pôster)

Título: Ethanol-Induced Gastric Damage Is Modulated By Primary Sensory Neurons In Cirrhotic Rats

Evento: XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE 2004)

Local: Águas de Lindóia- SP

Data: 17-20 de outubro de 2004

Título: Resistance of the Portal Hypertensive Gastric Mucosa to Ethanol-induced Damage During Chronic NO Inhibition.

Evento: Nitric oxide, cytokines and inflammation 2004

Local: Rio de Janeiro – RJ

Data: 6-9 de junho de 2004

Título: Modulação da Resistência da Mucosa Gástrica Hipertensiva Portal à Lesões Induzidas por Etanol e AINEs.

Evento: XII Congresso Médico Acadêmico da Unicamp (CoMau)

Local: UNICAMP – Campinas - SP

Data: 4- 8 de outubro de 2003

Título: Ethanol-induced Gastric Damage in Portal Hypertension: Role of Liver Dysfunction and Intragastric pH.

Evento: XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE 2003)

Local: Aguas de Lindóia- SP

Data: 24-28 de setembro de 2003

2-Trabalhos apresentados em congressos nacionais (Oral)

Título: Resistência da Mucosa Gástrica Hipertensiva Portal à Lesão Induzida pelo Etanol durante a Inibição Crônica do NO.

Evento: VI Semana Brasileira do Aparelho Digestivo

Local: Recife- PE

Data: 17-21 de outubro de 2004

Título: Lesão Gástrica Induzida pelo Etanol: Papel da Disfunção do Fígado e do pH

Intragástrico

Evento: VI Semana Brasileira do Aparelho Digestivo

Local: Recife- PE

Data: 17-21 de outubro de 2004

Título: Modulação da Resistência da Mucosa Gástrica Hipertensiva Portal às Lesões

Induzidas por Endotoxina e Etanol

Evento: VI Semana Brasileira do Aparelho Digestivo

Local: Recife- PE

Data: 17-21 de outubro de 2004

Título: Neurônios Sensoriais Primários Modulam a Lesão Gástrica Induzida pelo Etanol em Ratos Cirróticos

Evento: VI Semana Brasileira do Aparelho Digestivo

Local: Recife- PE

Data: 17-21 de outubro de 2004

3-Trabalhos apresentados em congressos internacionais (Pôster)

Título: Ethanol-Induced Gastric Damage Is Modulated By Primary Sensory Neurons in

Cirrhotic Rats

Evento: Digestive Disease Week 2005 (DDW 2005)

Local: Chicago, EUA.

Data: 14-19 de Maio de 2005

Título: Resistance of the Portal Hypertensive Gastric Mucosa to Ethanol-induced Damage During Chronic NO Inhibition.

Evento: Meeting of the European Union of Pharmacology (EPHAR) 2004

Local: Porto – Portugal

Data: 14-17 de julho de 2004

4-Trabalhos apresentados em congressos internacionais (oral)

Título: Resistance of the Portal Hypertensive Gastric Mucosa to Ethanol-induced Damage During Chronic NO Inhibition.

Evento: Meeting of the European Union of Pharmacology (EPHAR) 2004

Local: Porto – Portugal

Data: 14-17 de julho de 2004

5-Trabalhos publicados em periódicos internacionais (resumo)

Câmara, PRS, Ferraz, GJN, Franco-Penteado, CF, Antunes, E, Velloso, LA, Ferraz, JGP. Ethanol-Induced Gastric Damage Is Modulated By Primary Sensory Neurons in

Cirrhotic Rats. **Gastroenterology**, 128; 4 (supp 2): A 669, 2005.

6-Trabalhos publicados em periódicos internacionais (completo)

Câmara, PRS, Ferraz, GJN, Franco-Penteado, CF, Antunes, E, Meirelles, L, Sbragia, L, Velloso, LA, Ferraz, JGP. Resistance of portal hypertensive gastric mucosa to ethanol induced gastric damage is modulated by sensory afferent neurons, NO and prostaglandins. **American Journal of Hepathology** (Submitted)

Câmara, PRS, Ferraz, GJN, Teixeira, SA, Muscara, MN, Souza, CT, Velloso, LA, Ferraz, JGP. Effects of sensorial denervation by newborn capsaicin treatment on Ethanol-induced gastric damage in cirrhotic rats: a role for Endothelin and substance P. **American Journal of Physiology** (Submitted).

APÊNDICE 2- Protocolo da Comissão de Ética na Experimentação Animal



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 376 - 1, sobre "MEDIADORES ENDÓGENOS VASOATIVOS E PRÓ-INFLAMATÓRIOS NA DEFESA DA MUCOSA GÁSTRICA HIPERTENSIVA PORTAL"
sob a responsabilidade de PAULA RUBYA DE SOUZA CAMARA E DR. JOSÉ GERALDO PARAISO FERRAZ está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 03 / 05 / 2002.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº, entitled "
is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on 03 / 05 / 2002
(d) (m) (y)

Campinas, 03 de Maio de 2002

Prof. Dra. Alba R. M. Souza Brito
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Prof. Dr. Armando Ferreira Lima
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
CEP - 13 081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 55 19 37887110
FAX 55 19 32893124