



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

LUAN KELVES MIRANDA DE SOUZA

**EFEITO GASTROPROTETOR DO ACETURATO DE DIMINAZENO, UM
ATIVADOR DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA II, EM
ROEDORES: PAPEL DA VIA ANG (1-7) / RECEPTOR MAS.**

**PARNAÍBA – PI
FEVEREIRO - 2016**

LUAN KELVES MIRANDA DE SOUZA

**EFEITO GASTROPROTETOR DO ACETURATO DE DIMINAZENO, UM
ATIVADOR DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSIONINA II, EM
ROEDORES: PAPEL DA VIA ANG (1-7) / RECEPTOR MAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Novas tecnologias e metodologias de diagnóstico e tratamento.

Orientador: Jand Venes Rolim Medeiros

PARNAÍBA – PI
FEVEREIRO – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba

Serviço de Processamento Técnico

S729e Souza, Luan Kelves Miranda de.

Efeito gastroprotetor do aceturato de diminazeno, um ativador da enzima conversora de angiotensina II, em roedores: papel da via ANG (1-7) / receptor MAS [manuscrito] / Luan Kelves Miranda de Souza. – 2016.

62 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros.

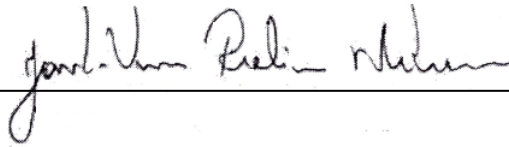
LUAN KELVES MIRANDA DE SOUZA

**EFEITO GASTROPROTETOR DO ACETURATO DE DIMINAZENO, UM
ATIVADOR DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSIONA II, EM
ROEDORES: PAPEL DA VIA ANG (1-7) / RECEPTOR MAS.**

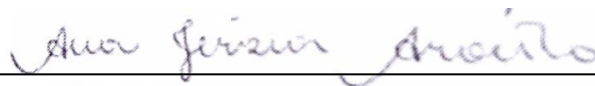
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM 17/02/2016

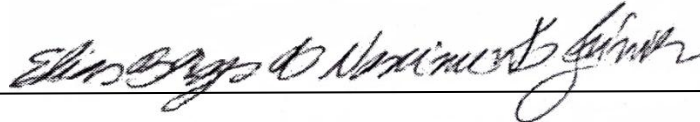
BANCA EXAMINADORA:



Dr. Jand Venes Rolim Medeiros
Professor efetivo da Universidade Federal do Piauí - UFPI
(Orientador)



Dr^a. Ana Jérsia Araújo
Professora efetiva da Universidade Federal do Piauí - UFPI



Dr. Elias Borges do Nascimento Júnior
Professor efetivo da Universidade Federal do Piauí - UFPI

PARNAÍBA – PI
FEVEREIRO – 2016

*Quanto maior for o obstáculo,
Maior será a glória de
Tê-lo superado!*

Jean Molière

*Dedico,
À Deus, por ser o detentor da vida,
por me guiar nessa longa trajetória,
por me dar forças nos momentos de aflições,
e aos meus familiares pelo o apoio incessante.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, detentor da vida e da sabedoria, por me ajudar sempre, por nunca me abandonar nos momentos difíceis e acima de tudo por ter me dado o direito de viver. Pois "... felizes são os que ouvem a palavra de Deus e a guardam...".

À Universidade Federal do Piauí, por nos disponibilizar um mestrado de excelente qualidade.

Ao professor Dr. Jand Venes Rolim Medeiros, pelas as orientações e ensinamentos transmitidos durante essa etapa da minha vida. Sem sombra de dúvidas, não teria chegado até aqui sem o seu apoio, obrigado chefe!

Aos meus familiares, especialmente a minha mãe Lucidalva Angelica de Mirando e ao meu pai Daltro Ribeiro de Souza, pelo o amor, carinho, por me ensinarem que o caminho dos estudos é sempre o caminho mais correto que uma pessoa pode percorrer.

Ao meu irmão Ruan Kelvin de Miranda, que com toda inocência de criança me proporciona momentos de alegrias.

A grande família LAFFEX, no qual tive a honra de trabalhar com pessoas justas, que não medem esforços para ajudar ao próximo. Sem a contribuição de vocês, meus amigos, esse trabalho não seria realizado, muito obrigado por tudo!

Aos integrantes do laboratório LAFICA, que contribuíram para a realização de alguns resultados.

Aos amigos do mestrado, pelos momentos vividos e pelos conhecimentos compartilhados em sala de aula.

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciências Biomédicas, Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto, por estar sempre disponível quando solicitado.

A todos os nossos professores do mestrado, pelo o carinho e os conhecimentos transmitidos.

Aos membros avaliadores da banca, Dr^a. Ana Jérсия e o Dr. Elias Borges, pela a contribuição para o engrandecimento desse trabalho.

Obrigado a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e crescimento como pessoa, sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês. OBRIGADO!!!

RESUMO

A via da Enzima Conversora de Angiotensina II (ECA II) foi relacionada recentemente a vários efeitos benéficos no organismo, dentre eles a gastroproteção. A ECA II é responsável por converter a Angiotensina II em um peptídeo ativo denominado Angiotensina 1-7 (Ang (1-7)) que por sua vez se liga a um receptor acoplado a proteína G, o receptor MAS. Estudos atuais demonstram que o Aceturato de Diminazeno (DIME), um tripanossomicida utilizado em animais, foi descrito como um agente ativador de ECA II. Dessa forma, o referido trabalho objetivou avaliar o efeito gastroprotetor do DIME, pela via Ang (1-7)/Receptor MAS, em lesões gástricas induzidas por etanol e ácido acético em roedores. Para avaliar o efeito gastroprotetor do DIME na lesão aguda por etanol, os animais foram pré-tratados por gavagem e divididos nos seguintes grupos: grupo controle, pré-tratado somente com salina; DIME nas doses de 0,7 mg/Kg, 2 mg/Kg, 7 mg/Kg (melhor dose) e 20 mg/kg; ou omeprazol (10mg/kg). Após uma hora foi administrado etanol 50% (0,5ml/25g), e ao término dessa hora os animais foram eutanasiados e o estômago retirado e imediatamente aberto ao longo da curvatura maior para análise. Foram retiradas amostras de tecido para a análise histológica, a dosagem de glutathiona reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA). Para a análise cicatrizante do DIME na lesão crônica induzida por ácido acético os animais foram anestesiados com Xilazina (5mg/kg) e Cetamina (60mg/kg) e em seguida foi realizada a laparotomia, o estômago foi exposto e o ácido acético 40% (100µL/1min) foi administrado na parte serosa do estômago. Os animais foram tratados a partir do 2º dia até o 7º dia após a lesão. Os grupos foram tratados com: salina; DIME (7mg/kg); A-779 (5mg/Kg, antagonista seletivo do receptor MAS); A-779 + DIME; ou omeprazol (10mg/kg). O grupo controle não recebeu a administração de ácido acético e foi tratado somente com salina. Ao término do sétimo dia, os animais foram eutanasiados, o estômago retirado e imediatamente aberto para a realização das análises. Foram retirados tecidos para a análise histológica, atividade de mieloperoxidase (MPO), teste de colágeno, imunohistoquímica e citocinas (TNF α , IL-6 e IL-10). Além disso, foram realizados experimentos sobre a fisiologia gástrica como muco e secreção gástrica. Assim como foi avaliado os níveis do peptídeo Ang(1-7) em ambos os modelos de lesão gástrica. Os resultados obtidos indicam que o DIME tem capacidade gastroprotetora em modelo agudo e crônico, com capacidade de promover melhora do processo de re-epitelização e cicatrização da mucosa gástrica. Sugere-se que esta ação envolve em parte, o restabelecimento dos mecanismos antioxidantes com elevação dos níveis de GSH e diminuição dos níveis gástricos de MDA, diminuição da atividade de MPO na área da lesão, elevação do muco aderido à mucosa gástrica, diminuição dos níveis de secreção gástrica, além do reestabelecimento da camada de colágeno do Tipo I no grupo tratado com DIME. Os níveis de Ang (1-7) se elevaram em ambos os modelos de lesão gástrica. Esses efeitos gastroprotetores foram abolidos quando administrado o antagonista seletivo para o receptor MAS (A-779). Com isso, conclui-se que, o DIME preveniu e promoveu cicatrização em modelos de lesões gástricas, e que sua proteção se dá, dentre outros fatores, pela

elevação dos níveis de Ang (1-7) se ligando a receptores do tipo MAS. Portanto, o DIME pode, futuramente, se tornar uma nova alternativa farmacológica no tratamento de úlceras gástricas.

PALAVRAS-CHAVE: DIME; Gastroproteção; Antioxidante; Cicatrização; Colágeno; ECA II; Ang (1-7).

ABSTRACT

The Angiotensin II Enzyme Converting Enzyme (ECA II) pathway has recently been linked to several beneficial effects in the body, including gastroprotection. ECA II is responsible for converting Angiotensin II into an active peptide called Angiotensin 1-7 (Ang (1-7) which in turn binds to a G protein-coupled receptor, the MAS receptor. Studies demonstrate that Diminazene Aceturate (DIME), , has been described as an ECA II activating agent. Thus, the objective of this work was to evaluate the gastroprotective effect of DIME, via Ang (1-7) / MAS Receptor, on gastric lesions induced by ethanol and acetic acid in rodents. To evaluate the gastroprotective effect of DIME on acute ethanol injury, the animals were pretreated by gavage and divided into the following groups: control group, pretreated with saline only; DIME at doses of 0.7 mg / kg, 2 mg / kg, 7 mg / kg (best dose) and 20 mg / kg; or omeprazole (10mg / kg). After one hour 50% ethanol (0.5ml / 25g) was administered, and at the end of that time the animals were euthanized and the stomach removed for analysis. Tissue samples were taken for histological analysis, reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA). The animals were anesthetized with Xylazine (5mg / kg) and Ketamine (60mg / kg) for laparotomy, the stomach was exposed and the acetic acid was 40% (100 μ L / 1min) was given to the serous part of the stomach. The groups were treated with: saline; DIME (7mg / kg); A-779 ; A-779 + DIME; or omeprazole (10mg / kg). The control group received no acetic acid and was treated with saline only, in the seventh day, the animals were euthanized, the stomach removed for the analysis. Tissue for histological analysis, myeloperoxidase activity (MPO), collagen test, immunohistochemistry and cytokines (TNF α , IL-6 and IL-10) were collected. In addition, experiments were performed on gastric physiology such as mucus and gastric secretion. As well as evaluating Ang (1-7) peptide levels in both gastric lesion models. It is suggested that this action involves, in part, restoration of antioxidant mechanisms with elevation of GSH levels and decrease of gastric MDA levels, decrease in MPO activity in the lesion area, elevated mucus adhered to the gastric mucosa, decreased levels of gastric secretion, as well as the reestablishment of the Type I collagen layer in the DIME treated group. Ang (1-7) levels were elevated in both models of gastric lesion. These gastroprotective effects were abolished when administered the MAS selective antagonist (A-779). Thus, it is concluded that DIME prevented and promoted healing in models of gastric lesions, and that its protection is given, among other factors, by raising Ang (1-7) levels by

binding to MAS type receptors. Therefore, DIME may, in the future, become a new pharmacological alternative in the treatment of gastric ulcers.

KEYWORDS: DIME; Gastroprotection; Antioxidant; Healing; Collagen; ECA II; Ang (1-7)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
ACh	Acetilcolina
AINEs	Anti-inflamatórios Não-Esteroidais
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang(1-7)	Angiotensina(1-7)
A-779	Antagonista Seletivo para o Receptor MAS
β	Beta
BSA	Albumina Bovina
CAT	Catalase
CBS	Cistationina β-Synthase
CSE	Cistationina γ-Lyase
COX	Ciclooxygenase
DIME	Aceturato de Diminazeno
DTNB	Ácido Ditio-Nitrobenzoico
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA II	Enzima Conversora de Angiotensina II
ECL	Células Enterocromafins
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FSG	Fluxo Sanguíneo Gástrico
GSH	Glutathiona Reduzida
GPx	Glutathiona Peroxidase
HCL	Ácido Clorídrico
H⁺K⁺/ATPase	Bomba de Prótons
HTBA	Hexadecitrimetilamônio
H₂	Receptores Histamínicos
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
H₂S	Sulfeto de Hidrogênio
H₃PO₄	Ácido Fosfórico
IBP	Inibidores da Bomba de Prótons
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina

KCL	Cloreto de Potássio
LPS	Lipopolissacarídeos
I.P.	Intra-Peritoneal
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NEP	Endopeptidase Neutra
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
NOS_e	Óxido Nítrico Sintetase Endotelial
NOS_i	Óxido Nítrico Sintetase Induzida
NOS_n	Óxido Nítrico Sintetase Neuronal
O²	Superóxidos
OH⁻	Radical Hidroxila
OMP	Omeprazol
PBS	Tampão Salina Fosfato
PEP	Prolil-Endopeptidase
PGs	Prostaglandinas
RAS	Sistema Renina-Agiotensina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPM	Rotações por Minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SOD	Superóxido Dismutase
TCA	Acido Tricloroacético
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TOP	Thymet Oligopeptidase
TPU	Unidades De Perfusão Tecidual
UFPI	Universidade Federal do Piauí

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Imagem ilustrativa das partes que compõem a parede gástrica. Notar a presença da camada muscular da mucosa, a submucosa e a serosa. Fonte: SALADIN, 2002 (Adaptada)._____19
- Figura 2:** Representação ilustrativa dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica. Fonte: LAINE et al, 2008 (Adaptada)._____22
- Figura 3:** Mecanismos de proteção versus agentes lesivos, quando se tem um desequilíbrio desses fatores, têm-se a produção úlceras gástricas. Fonte: ROBBINS; COTRAN, 2005 (adaptada)._____28
- Figura 4:** Efeitos deletérios provocados pelo o etanol na mucosa gástrica. Fonte: SIEGMUND et al, 2002 (adaptada)._____30
- Figura 5:** Formação do Ang 1-7. Notar que ele pode ser produzido de forma direta a partir da Ang I, ou então pode ser formada pelas conversões de Ang I e Ang II, sendo que essa última sofre ação da ECA II, para que se possa formar o peptídeo ativo Ang 1-7. Fonte: www.medlgrap.com (adaptada)._____33
- Figura 6:** Molécula estrutural do Aceturato de Diminazeno. Fonte: PEREGRINE; MAMMAN, 1993 (adaptada)._____35
- Figura 7:** Demonstração ilustrativa da metodologia utilizada para a indução da lesão gástrica por ácido acético. A seta azul está identificando a área que foi induzida a úlcera gástrica com a administração do ácido acético 40%._____43
- Figura 8:** Aceturato de Diminazeno reduz as lesões gástricas induzidas por etanol._____49
- Figura 9:** Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos swiss (ampliação, 100x e 400x, primeira e segunda linha respectivamente) e resultados quantitativos (scores) da análise microscópica._____50
- Figura 10:** Aceturato de Diminazeno reduz as lesões gástricas induzidas por etanol pela via ECA II/ Ang (1-7)/MAS._____52
- Figura 11:** Efeito do DIME em níveis de glutathiona reduzida (GSH) em camundongos swiss com lesão gástrica induzida por etanol._____53
- Figura 12:** Efeito do DIME em níveis de malondialdeído (MDA) em camundongos swiss com lesão gástrica induzida por etanol._____54

- Figura 13:** Efeito do DIME em lesões gástricas induzidas por ácido acético em camundongos *swiss*, papel da via ECA II/Ang(1-7)/MAS. _____55
- Figura 14:** Análise histopatológica das lesões induzidas por ácido acético. _____57
- Figura 15:** O DIME elevou os níveis de colágeno Tipo I em lesões gástricas induzidas por ácido acético. _____58
- Figura 16:** Efeito do DIME no ensaio de atividade de Mieloperoxidase (MPO) em lesões gástricas induzidas por ácido acético em camundongos *swiss*. _____59
- Figura 17:** Avaliação dos níveis do peptídeo Ang(1-7) em modelos de lesão gástrica em camundongos *swiss*. _____61
- Figura 18:** Imunohistoquímica para o Receptor MAS na mucosa gástrica de camundongos *swiss*. _____62
- Figura 19:** Efeito do pré-tratamento com DIME na gastroproteção por avaliação dos níveis de muco nas lesões gástricas induzidas por etanol 50%. _____63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise Histopatológica das lesões gástricas induzidas por ácido acético_____57

Tabela 2: Dosagens de citocinas inflamatórias_____60

Tabela 3: Avaliação da secreção gástrica em camundongos *swiss*._____64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Anatomia e Fisiologia Gástrica.....	18
2.2 Regulação Fisiológica da Secreção Ácida Gástrica.....	20
2.3 Mecanismos de Proteção da Mucosa Gástrica.....	22
2.3.1 Barreira Composta por Muco, Bicarbonato e Fosfolipídio.....	23
2.3.2 Prostaglandinas (PGs).....	24
2.3.3 Óxido Nítrico (NO).....	24
2.3.4 Sulfeto de Hidrogênio (H ₂ S).....	25
2.3.5 Fluxo Sanguíneo.....	25
2.3.6 Sistema Antioxidante.....	26
2.4 Úlcera Gástrica.....	27
2.4.1 Etanol: Agente Ulcerogênico Gástrico.....	29
2.5 Farmacoterapêutica da Úlcera Gástrica.....	30
2.6 Enzima Conversora de Angiotensina II (ECA II)/ANG 1-7/Receptor MAS: uma nova via de proteção gástrica.....	32
2.7 Dimenazeno Aceturato (DIME).....	34
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Animais.....	37
4.2 Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais.....	37
4.3 Drogas Utilizadas.....	38
4.4 Corantes.....	38
4.5 Soluções.....	38
4.6 Efeito Gastroprotetor do DIME na Lesão Gástrica Induzida por Etanol: Curva Dose-Resposta.....	40
4.7 Avaliação da Via ECA II/ANG (1-7)/MAS no Efeito Gastroprotetor de DIME.	41
4.8 Análise Histopatológica da Mucosa Gástrica de Camundongos.....	41
4.9 Análise da Concentração de Glutathiona.....	41

4.10 Avaliação das Concentrações de Malondialdeído (MDA).....	42
4.11 Efeito Gastroprotetor do DIME na Lesão Gástrica Induzida por Ácido Acético.....	42
4.12 Atividade de Mieloperoxidase (MPO).....	44
4.13 Imunohistoquímica para o Receptor MAS.....	44
4.14 Concentrações de Ang 1-7 na mucosa gástrica.....	45
4.15 Determinação de Muco	45
4.16 Avaliação da Secreção Gástrica.....	46
4.17 Determinação dos Níveis de Colágeno com Picrosirius Red.....	46
4.18 Dosagens de Citocinas (TNF- α , IL-6, IL-10).....	46
4.19 Análise Estatística.....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1 Efeito do DIME em lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos swiss.....	48
5.2 Papel da via ECA II/ Ang (1-7)/ Receptor MAS sobre o efeito gastroprotetor do DIME em lesões induzidas por etanol.....	51
5.3 Avaliação Antioxidante.....	52
5.4 Efeito do DIME em lesões gástricas induzidas por ácido acético em camundongos swiss.....	54
5.5 Análise da Área de Regeneração e Reepitelização nas Lesões Gástricas Induzidas por Ácido Acético em Camundongos <i>swiss</i>	56
5.6 Determinação dos níveis de Colágeno.....	58
5.7 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO).....	59
5.8 Dosagens de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-10).....	60
5.9 Avaliação dos níveis do peptídeo Ang(1-7) em modelos de lesão gástrica em camundongos <i>swiss</i>	61
6. Imunohistoquímica para o Receptor MAS na mucosa gástrica de camundongos <i>swiss</i>	62
6.1 Avaliação dos Níveis de Muco Gástrico.....	63
6.2 Avaliação da Secreção Gástrica.....	64
7. DISCUSSÃO.....	65
8. CONCLUSÃO.....	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

A úlcera péptica constitui uma desordem do trato gastrointestinal que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, e, tem sido descrita como uma das principais causas de morbidade e mortalidade na população adulta. Existem ainda relatos que essa doença está presente na humanidade desde o século IV antes de Cristo (DONATINI et al, 2009).

A úlcera péptica caracteriza-se pela perda circunscrita de tecido que ultrapassa os limites da camada muscular da mucosa e ocorre nas porções expostas à secreção ácida. Dessa forma, a úlcera pode desenvolver-se na porção inferior do esôfago, no estômago e no duodeno (DONATINI et al, 2009). A úlcera péptica gastroduodenal é uma doença heterogênea, com múltiplos fatores envolvidos na sua gênese, afetando aproximadamente 5 a 10% da população (MEDEIROS, 2009).

Apesar dos grandes avanços no conhecimento da doença ulcerosa péptica a sua etiologia não está totalmente elucidada. O que se pode mencionar é que ocorre um desequilíbrio entre agentes lesivos, como a secreção de ácido clorídrico e pepsina, com os fatores citoprotetores da mucosa gástrica, como por exemplo, a secreção de bicarbonato, de muco e produção de prostaglandinas (BORRELLI; IZZO, 2000). Outros fatores estão associados à produção de úlceras gástrica, como a infecção por *Helicobacter pylori*, o largo uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), o tabagismo e o alcoolismo (YUAN; PADOL; HUNT, 2006).

Nesse contexto, o consumo excessivo de álcool pela população possui grande importância no desenvolvimento de úlceras gástricas, no qual podem produzir lesões gástricas agudas de caráter hemorrágico. A ingestão excessiva pode resultar em gastrite caracterizada por edema, hemorragia sub-epitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias na mucosa gástrica. Além disso, em modelos experimentais o etanol tem efeito ulcerogênico e necrotizante que resulta em dano direto da mucosa (JAHOVIC et al, 2007; MATSUHASHI et al, 2007).

O etanol também induz a liberação de endotelinas (peptídeos vasoconstrictores), degranulação de mastócitos, inibição da síntese de prostaglandinas (PGs), redução na produção de muco, além de provocar dano no endotélio vascular da mucosa gástrica, desordem da microcirculação e isquemia, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (PAN et al; 2008).

Os fármacos corriqueiramente utilizados no tratamento de úlceras gástricas são os antiácidos, os anticolinérgicos, os inibidores da bomba de prótons e os

antagonistas de receptor histamínico (H₂). Porém, estes fármacos podem ocasionar reações adversas graves, como trombocitopenia, nefrite intersticial aguda, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, reações anafiláticas, ginecomastia e disfunção erétil (RANG et al, 2004).

Com isso, muitos são os estudos que procuram evidenciar novas formas terapêuticas que possam minimizar os agravos advindos dessa doença. Recentemente, foi descrito na literatura que a ativação da via da Enzima Conversora de Angiotensina II (ECA II), está associada a vários efeitos benéficos no organismo, dentre eles a gastroproteção. A ECA II foi identificada como uma enzima que regula negativamente o sistema renina-angiotensina (RAS), convertendo a angiotensina II (Ang II) em um peptídeo ativo denominado Ang 1-7.

Nesse contexto, têm-se elevado a busca de novos compostos que possam atuar na via da ECA II promovendo gastroproteção. Em estudos atuais o Aceturato de Diminazeno (DIME), fármaco tripanossomicida utilizado em animais, foi descrito como um possível ativador da ECA II. Além disso, a literatura demonstra várias influências do DIME em outras condições fisiológicas do organismo, cita-se, por exemplo, a regulação da pressão arterial, proteção contra acidente vascular cerebral isquêmico, glaucoma, além de promover redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12 e TNF) (KURIAKOSE; UZONNA, 2014).

Com isso, mediante a problemática apresentada anteriormente, têm-se a justificativa para a realização do referido estudo. Uma vez que, a úlcera gástrica é um problema mundial que acomete milhares de pessoas, sendo responsável por elevados números de mortalidade, principalmente na população adulta. Além disso, no Brasil, o tratamento de úlceras gástricas é bastante oneroso, não sendo acessível a grande parte da população. Dessa forma, o tratamento das úlceras gástricas constitui ainda um grande desafio e torna-se necessário o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos mais eficazes, menos tóxicos e de custos mais baixos. Infere-se ainda, que os estudos sobre a ação dos metabólitos oriundos da angiotensina são relativamente escassos no trato gastrointestinal, principalmente no estômago. Portanto, foi avaliado no presente estudo o papel do Aceturato de Diminazeno, um ativador de ECA II, como um novo agente gastroprotetor.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anatomia e Fisiologia Gástrica

O sistema digestório é constituído por um tubo muscular com epitélio especializado que compreende a cavidade bucal, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, e cólon. Além disso, é composto por alguns órgãos anexos, tais como: glândulas salivares, fígado e pâncreas, os quais secretam substâncias que auxiliam no processo digestivo dos alimentos. O trato gastrointestinal (TGI), juntamente com os órgãos anexos, tem a função de receber, digerir, absorver e eliminar substâncias ingeridas, e todos esses processos são controlados pelo sistema nervoso e pelo sistema hormonal (POTRICH, 2009; MERCHANT, 2007).

Dessa forma, o TGI torna-se de fundamental importância para o indivíduo, uma vez que, possui a função de prover água, eletrólitos e nutrientes para o organismo (MEDEIROS, 2009). As suas funções dependem de propriedades inerentes à musculatura lisa intestinal, reflexos de neurônios intrínsecos no intestino e do sistema nervoso central (SNC), além de efeitos parácrinos de mediadores químicos e hormônios gastrointestinais (GUYTON; HALL, 2006). No entanto, as principais funções que o estômago exerce são as autônomas, predominantemente controladas pelo o Sistema Nervoso Entérico (SNE) (HOOGERWEF; PASRICHA, 2009).

O TGI possui um sistema nervoso próprio (SNE), que contém aproximadamente 100 milhões de neurônios, iniciando a partir do esôfago e estende-se até as porções do ânus, controlando os movimentos e as secreções gastrintestinais. É composto também pelo plexo mioentérico ou plexo de Auerbach, plexo externo situado entre as camadas musculares longitudinais e circulares, e pelo plexo de Meissner ou submucoso, plexo interno localizado na submucosa, constituindo a inervação intrínseca do órgão (PASRICHA, 2006).

O plexo mioentérico é responsável pela parte motora (peristaltismo) e o plexo submucoso é responsável pela regulação da liberação de secreções, do transporte de líquidos e pelo fluxo sanguíneo. Células nervosas de ambos os plexos recebem estímulos do parassimpático (inervação extrínseca), e de outros neurônios entéricos. Tal comunicação neuronal permite a realização das funções motoras e secretoras desse trato (POTRICH, 2009; GUYTON; HALL, 1997).

O estômago, órgão de estudo do referido trabalho, é dividido anatomicamente em três porções, são elas: fundo; corpo; e antro. O fundo está situado na região superior e tangencia a junção esofagogástrica; o corpo corresponde à maior parte do órgão; e o antro está situado na região proximal ao canal pilórico (DANGELO; FATTINI, 2007).

A parede gástrica apresenta algumas camadas teciduais, compreendendo a serosa, a camada muscular longitudinal, a camada muscular circular, a submucosa e a mucosa (Figura 1). A serosa, que será utilizada como alvo para a indução de úlceras crônicas promovidas pela a utilização de ácido acético no presente trabalho, é a camada tecidual que reveste a maior parte do órgão, exceto em uma pequena porção da parte posterior do estômago (região do cárdia); a submucosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo e contém uma rica rede vascular e um plexo submucoso; e a mucosa é a camada da parte interna do estômago que abriga numerosas glândulas gástricas (MEDEIROS, 2009).

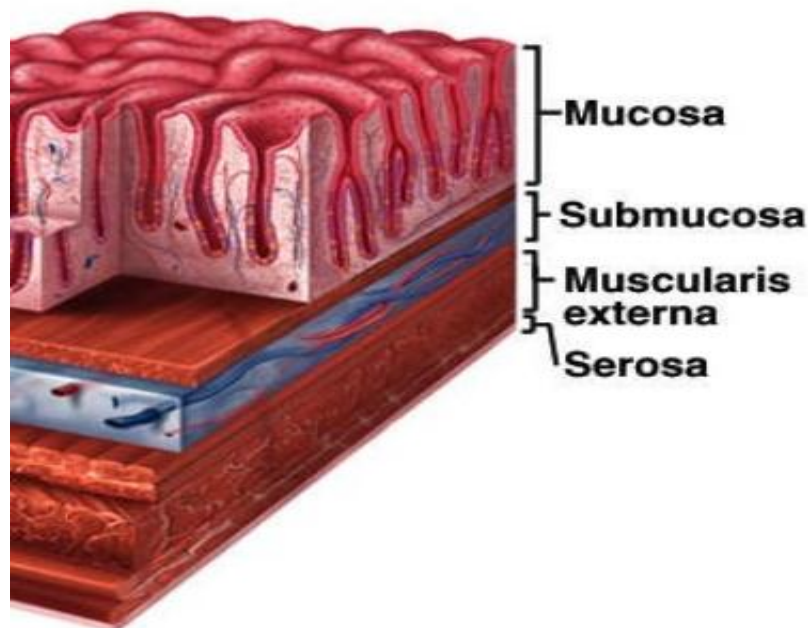


Figura 1: Imagem ilustrativa das partes que compõem a parede gástrica. Notar a presença da camada muscular da mucosa, a submucosa e a serosa. Fonte: SALADIN, 2002 (Adaptada).

Nesse contexto, pode-se inferir a presença de determinadas glândulas gástricas, cita-se, por exemplo, as glândulas oxínticas e as glândulas pilóricas, que secretam substâncias responsáveis pelos processos digestivos e homeostáticos do estômago. As glândulas oxínticas estão localizadas na superfície interna do corpo e

fundo do estômago, e são compostas por várias células, são elas: células mucosas, que promovem a secreção de muco; células pépticas, responsáveis pela secreção de pepsinogênio, que em contato com o ácido clorídrico é convertido em pepsina; células parietais, que possuem como função a liberação de ácido clorídrico; as células D, que secretam somatostatina; além das células enterocromoafins (ECL) que secretam histamina. Já as glândulas pilóricas são compostas por: células G, que quando estimuladas liberam o hormônio gastrina importante na secreção ácida gástrica; e células mucosas (SCHUBERT; PEURA, 2008).

A superfície do estômago ainda é recoberta por células mucosas superficiais (células epiteliais) que são especializadas em secretar elevadas quantidades de um muco extremamente viscoso e alcalino. Tal muco é responsável por recobrir toda a parede gástrica, podendo ter mais de um milímetro de espessura, proporcionando uma barreira física de proteção contra as secreções ácidas que são produzidas pelas células parietais, além de contribuir para a lubrificação do transporte do alimento (POTRICH, 2009).

As estruturas gástricas são então responsáveis por desempenhar funções específicas que garantirão a manutenção da homeostasia do órgão, como por exemplo, a secreção de ácido clorídrico, pepsinogênio, muco, bicarbonato e prostaglandinas (PGs). No entanto, outras substâncias como o óxido nítrico (NO) (SILVA et al, 2011), sulfeto de hidrogênio (H₂S) (MEDEIROS, 2009) e enzimas antioxidantes (superóxido dismutase - SOD, catalase – CAT e glutathione peroxidase - GPx) e glutathione reduzida (GSH) também estão relacionadas com a manutenção da integridade gástrica (DAMASCENO et al, 2012).

2.2 Regulação Fisiológica da Secreção Ácida Gástrica

O estômago possui como uma das suas principais funções a produção de ácido gástrico. Esse ácido é responsável por facilitar a digestão de proteínas, e de favorecer a absorção de ferro, cálcio e vitamina B12. Além disso, é responsável por minimizar a entrada e proliferação de bactérias no organismo. No entanto, quando os mecanismos homeostáticos do indivíduo estão prejudicados, o volume e acidez gástrica podem elevar-se desproporcionalmente, superando as barreiras protetoras da mucosa, promovendo a formação de úlceras gástricas ou duodenais, além de propiciar o surgimento da doença do refluxo gastro-esofágico.

Como mencionado na seção anterior, às células parietais são umas das principais células secretoras de ácido na mucosa gástrica. Tal mecanismo é regulado por meio de neurônios e hormônios, agindo em níveis centrais e periféricos, os quais convergem para a etapa final da secreção que é a atividade de H^+K^+ -adenosina trifosfatase (H^+K^+ /ATPase - bomba de prótons) (SCHUBERT; PEURA, 2008).

A H^+K^+ /ATPase é dividida em duas subunidades, a subunidade α , que contém o sítio catalítico da enzima, responsável pela troca iônica do H^+ intracelular pelo K^+ luminal, e a subunidade β , responsável pela estabilidade estrutural e funcional da enzima, protegendo a enzima de possível degradação. A troca iônica (H^+K^+) promovida pela bomba de prótons é acompanhada pela saída de íons cloro, da célula parietal, via canais de cloro localizados na membrana apical da célula parietal. Os íons de H^+ e Cl^- ligam-se formando o ácido clorídrico, que atingirá o lúmen gástrico (POTRICH, 2009).

Em estado não-excitatório, a célula parietal apresenta vesículas tubulares intracelulares que estocam a H^+K^+ /ATPase. Quando ocorre o estímulo, por meio da elevação da concentração de cálcio intracelular, AMPc, ou ambos, uma cascata de eventos intracelulares desencadeia a fusão das vesículas tubulares na membrana apical da célula parietal, promovendo ativação da bomba de prótons, iniciando assim, o processo de secreção do ácido gástrico. Quando o estímulo é cessado, as bombas são recicladas e retornam ao compartimento vesicular intracelular (MEDEIROS, 2009; POTRICH, 2009; SCHUBERT, 2005).

Na via neuronal, o SNC modula a atividade do SNE através da acetilcolina (ACh), estimulando a liberação de ácido gástrico em resposta à antecipação ao alimento, o que caracteriza a “fase cefálica” da secreção ácida gástrica. As fibras eferentes que se originam nos núcleos motores dorsais, descem até o estômago pelo nervo vago e fazem sinapse com células ganglionares do SNE (POTRICH, 2009). A ACh é então liberada pelos neurônios pós-ganglionares do nervo vago e estimula diretamente a secreção do ácido por atuar em receptores muscarínicos M3 localizados na membrana basolateral da célula parietal. Além disso, existe um estímulo indireto à liberação de histamina, bem como à liberação de gastrina pelas células G na região do antro (SCHUBERT, 2005).

2.3 Mecanismos de Proteção da Mucosa Gástrica

Em condições de homeostase, existe no estômago um equilíbrio entre os agentes lesivos, como HCL, pepsina, bile e enzimas pancreáticas, com os mecanismos gastroprotetores, como muco-bicarbonato, prostaglandinas e glutathiona (Figura 2). Com isso, são necessários processos dinâmicos e eficazes que evitem que esses agentes causem danos à mucosa. Tais mecanismos podem ser classificados pelo seu local de ação, em mecanismos de proteção pré-epitelial, epitelial ou subepitelial (LAINE et al, 2008).

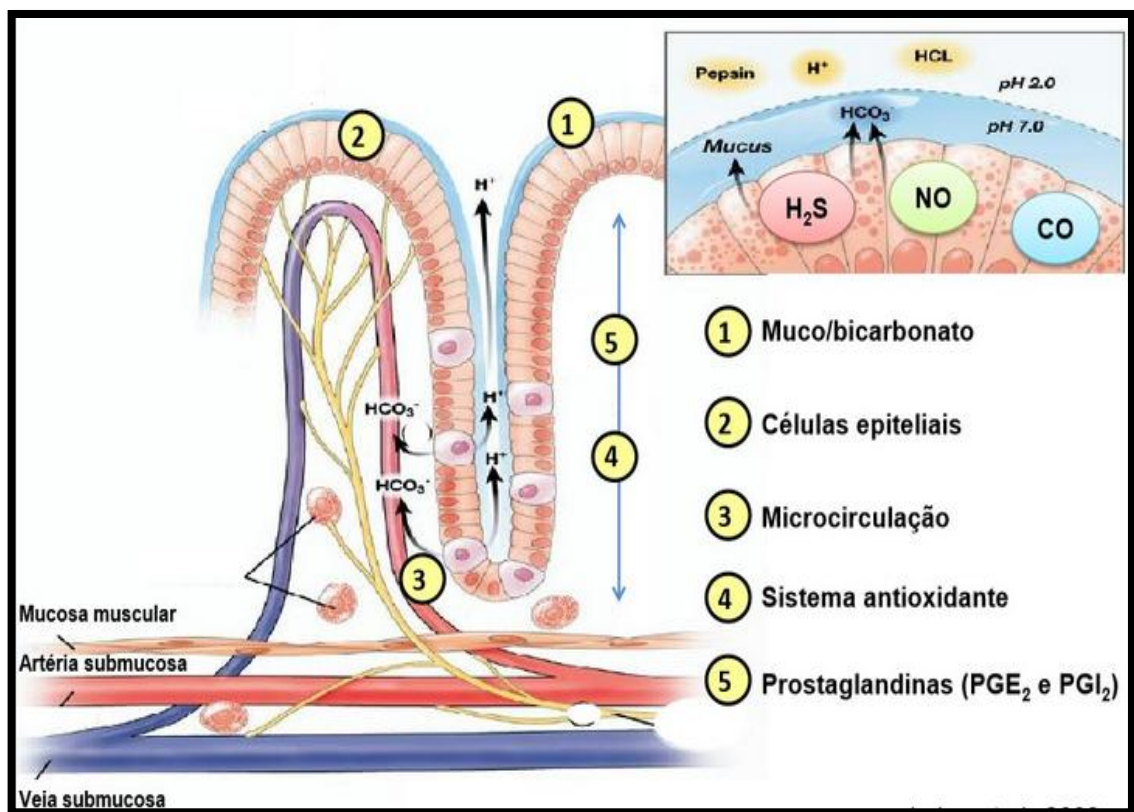


Figura 2: Representação ilustrativa dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica. Fonte: LAINE et al, 2008 (Adaptada).

A proteção pré-epitelial é realizada pela barreira muco-bicarbonato, que cria um gradiente de pH necessário para manter neutra a superfície das células epiteliais contra a acidez do ácido gástrico. Já a proteção epitelial é promovida pelos surfactantes, fosfolípidos anfóteros, que elevam a hidrofobicidade das membranas biológicas, tornando-as resistentes aos agentes hidrofílicos lesivos. A proteção subepitelial é promovida pelo o fluxo sanguíneo que fornece nutrientes e oxigênio

para as células gástricas, e, ainda realiza a remoção de íons H^+ e outros agentes nocivos (MATSUI et al, 2011; MEDEIROS, 2006).

2.3.1 Barreira Composta por Muco, Bicarbonato e Fosfolipídio

A primeira camada de defesa da mucosa gástrica é formada por muco, bicarbonato e fosfolipídios de membrana, que desempenham um importante papel estrutural na proteção do trato gastrointestinal. Tal barreira possui um aspecto viscoso e alcalino, no qual é formada por um gel de muco, bicarbonato e fosfolipídios surfactantes que se depositam sob a superfície mucosa (ALLEN; FLEMSTRO, 2005).

A secreção de muco ocorre em todo o trato gastrointestinal desde o estômago até o cólon, formando um gel aderente entre a mucosa e o lúmen, protegendo assim a mucosa contra agentes nocivos. É secretado pelas células epiteliais da mucosa e contém 95% de água e 5% de mucina (glicoproteína). A secreção de muco é estimulada por hormônios gastrointestinais, como gastrina e secretina, bem como por prostaglandina E_2 (PGE_2) e agentes colinérgicos. Substâncias ulcerogênicas, como AINEs, sais biliares, e etanol causam dissipação do gel mucoso e da camada de fosfolipídios, causando lesões na mucosa (LAINE et al, 2008).

O muco apresenta elevada estabilidade e aderência, sendo então capaz de reter íons bicarbonatos secretados pelas células mucosas superficiais, formando uma zona de pH neutro sob as células gástricas. Dessa forma, o muco age inibindo a penetração do ácido clorídrico, da pepsina e na digestão de enzimas proteolíticas na superfície epitelial (SCHUBERT; PEURA, 2008).

No momento que se tem a liberação da secreção ácida gástrica, uma camada de ácido se forma acima da barreira de muco-bicarbonato e ambas não se misturam devido à sua diferença de polaridade. É bem conhecido que esse caráter hidrofóbico seja o principal fator responsável por evitar a difusão contrária de ácido, impedindo a agressão à mucosa gástrica (SILVA, 2014).

No entanto, a barreira muco-bicarbonato é apenas uma barreira pré-epitelial entre o lúmen e o epitélio. Quando essa barreira é rompida, a próxima etapa do mecanismo protetor inclui a neutralização do ácido intracelular, reparação epitelial rápida, bem como manutenção e distribuição do fluxo sanguíneo da mucosa. Um importante agente nesta etapa são as PGs, que desempenham uma série de eventos que promovem a proteção da mucosa gástrica (POTRICH, 2009).

2.3.2 Prostaglandinas (PGs)

As PGs são oriundas dos ácidos graxos de 20-carbonos e são encontradas em boa parte dos tecidos e órgãos, desempenhando uma ampla variedade de funções fisiológicas e patológicas. Elas são sintetizadas a partir de diferentes precursores, sendo um deles, o ácido araquidônico (AA), que é convertido a endoperóxidos instáveis, PGG₂ e PGH₂ pela ação da ciclooxigenase (COX).

Até o presente momento, foram descritas três isoformas de COX, são elas: a COX-1 expressa constitutivamente; COX-2 induzível (SMITH et al, 1996); e COX-3, uma variante da COX-1 (CHANDRASEKHARAN et al, 2002). As PGs derivadas do AA são denominadas PGs da série-2, incluindo a PGE₂ e a prostaciclina (PGI₂), que são extremamente importantes no trato gastrointestinal (CALDER, 2001).

A geração sucessiva de PGE₂ e PGI₂ é fundamental para a manutenção da integridade da mucosa, além de garantir proteção contra agentes ulcerogênicos e necrotizantes. Insere-se ainda, que as PGs promovem a inibição da secreção de ácido; estimulam a secreção de muco, bicarbonato e fosfolípidios; aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa; e aceleram a restituição epitelial e cicatrização da mucosa. E, são responsáveis por inibir a ativação de mastócitos e leucócitos, além da aderência plaquetária (POTRICH, 2009; LAINE et al, 2008).

2.3.3 Óxido Nítrico (NO)

O óxido é um mediador gasoso de elevada importância para a manutenção da integridade da mucosa gástrica. Caracteriza-se por ser uma molécula extremamente volátil que se difunde rapidamente, promovendo a sinalização de vários processos fisiológicos no organismo. Com isso, o NO pode agir como um agente oxidante ou redutor dependendo do meio, e por sua vez, é rapidamente destruído pelo oxigênio, no qual sua oxidação produz nitrito e nitrato (SILVA, 2014).

O NO é sintetizado a partir da oxidação de um aminoácido denominado L-arginina, na presença do oxigênio molecular, cuja reação é catalisada por enzimas óxido nítrico sintetases (NOS), produzindo ainda a L-citrulina por meio dessa reação (MEDEIROS, 2006).

Atualmente, são descritas três diferentes isoformas de NO, no qual duas delas são expressas de forma constitutiva por mecanismos dependentes de Ca²⁺/calmodulina, são elas: a NOS endotelial (NOSe) e NOS neuronal (NOSn), que

são ativadas quando existe o influxo de cálcio para o interior da célula, sendo então estimuladas por neurotransmissores como a acetilcolina e glutamato. Já a terceira isoforma de NO é denominada de NOS induzida (NOSi), que atua independente de cálcio, no qual é induzida por exposições a citocinas e constituintes bacterianos como os lipopolissacarídeos (LPS) (SILVA, 2014).

Nesse contexto, o NO garante proteção gástrica por vários fatores, dentre eles, cita-se a produção da barreira de muco-bicarbonato, diminuição da secreção gástrica, na prevenção da ativação de aderência de neutrófilos, na elevação do fluxo sanguíneo, e, auxilia na cicatrização de úlceras crônicas (MUSCARA; WALLACE, 1999).

2.3.4 Sulfeto de Hidrogênio (H₂S)

O sulfeto de hidrogênio é um gás incolor, que possui odor característico, e que vem sendo amplamente estudado. Pesquisas atuais demonstram que, assim como o NO, o sulfeto de hidrogênio possui inúmeras funções biológicas no organismo, no qual nos mamíferos essa molécula é produzida em vários tipos de tecidos (MEDEIROS, 2009).

Nesse contexto, a literatura demonstra que o H₂S está implicado em respostas imunes e inflamatórias, percepção e mediação nociceptiva, bem como o controle da integridade da mucosa gástrica, do tônus vascular e o controle da motilidade gastrointestinal (FIORUCCI, 2006).

Dessa forma, o sulfeto de hidrogênio contribui para a defesa da mucosa gástrica. É importante salientar que no estômago são expressas duas enzimas fundamentais para a produção de H₂S, a cistationina γ -lyase (CSE) e a cistationina β -synthase (CBS) (MOORE et al, 2003), no qual a CSE é a principal responsável pela a síntese de sulfeto na mucosa gástrica. O H₂S possui um papel de grande importância na regulação do fluxo sanguíneo e está envolvido na reparação da integridade da mucosa gástrica em roedores tratados com etanol e AINEs (MEDEIROS, 2009).

2.3.5 Fluxo Sanguíneo

O fluxo sanguíneo constitui um importante mecanismo de defesa do estômago, uma vez que, possui o papel de suprir oxigênio, nutrientes e hormônios para a mucosa gástrica. Além disso, participa da regulação da produção de muco,

secreção de bicarbonato e remoção dos produtos incluindo a retrodifusão de íons hidrogênio e substâncias potencialmente tóxicas. Com isso, o fluxo sanguíneo contribui de forma significativa para manutenção fisiológica da integridade da mucosa (SILVA, 2014).

Além disso, a literatura enfatiza o papel do fluxo sanguíneo e, em particular a microcirculação na fisiopatologia de diversos modelos experimentais de lesão na mucosa, como as causadas por AINES (CARVALHO et al, 2015) e etanol (MEDEIROS et al, 2008). Porém, quando se tem a produção excessiva e anormal de ácido gástrico, as defesas da mucosa não suportam e acabam sendo consumidas, e, conseqüentemente podem ocorrer lesões.

2.3.6 Sistema Antioxidante

Sabe-se que os aspectos anatômicos são importantíssimos para a gastroproteção, no entanto os mecanismos bioquímicos são fundamentais para a proteção e manutenção da homeostase celular gástrica. O metabolismo celular normal envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante os vários processos fisiológicos no organismo, cita-se, por exemplo, a cadeia transportadora de elétrons (fosforilação mitocondrial), o metabolismo de xenobióticos e a resposta inflamatória (SILVA, 2014; ZHU; KAUNITZ, 2008).

No entanto, a produção excessiva de ROS pode prejudicar o funcionamento celular, além de promover inflamação e morte de células, através das vias de transdução do sinal; visto que, afetam as enzimas redox-sensíveis e fatores de transcrição, facilitando a ação de proteases, estimulando a expressão de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão.

As espécies reativas de oxigênio são originadas como consequência da respiração aeróbica e da oxidação de substratos, que causam danos oxidativos aos tecidos. As ROS incluem radicais livres como os radicais hidroxilas (OH^\cdot), ou superóxidos (O_2^\cdot), além de espécies de radicais não livres, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O papel das ROS na patogênese das lesões gástricas experimentais induzidas por estresse (OLIVEIRA et al, 2010), etanol (SILVA et al 2011; MEDEIROS et al, 2008) e AINES (CARVALHO et al, 2015; NICOLAU et al, 2013) são bem descritas na literatura.

As ROS causam peroxidação lipídica nas membranas, por atacar ácidos graxos insaturados, um dos produtos oriundo da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA), responsável por produzir efeitos lesivos na mucosa gástrica. Além disso, quando conseguem “agredir” o DNA, podem promover a formação de câncer como consequência de uma mutação (BAYIR et al, 2006).

Com isso, os organismos aeróbicos precisam possuir um sistema de defesa endógeno que combate essas ROS. O sistema de defesa antioxidante inclui agentes enzimáticos e não enzimáticos que visam combater os efeitos tóxicos oriundos das ROS. Um importante antioxidante encontrado em todo o TGI é a glutathiona reduzida (GSH), que é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína. A GSH é responsável por várias ações essenciais para as células como, o transporte de aminoácidos, catálise enzimática e proteção contra os efeitos deletérios de radicais livres endógenos e metabólitos tóxicos (CARVALHO et al, 2015).

Dessa forma, a glutathiona atua como um removedor de radicais livres e substâncias tóxicas ingeridas na alimentação, produzidas diretamente no TGI e/ou consumida em excesso. Contudo, manter os níveis de GSH é de fundamental importância para a manutenção da integridade da mucosa gástrica e para o bom funcionamento dos demais órgãos do indivíduo.

2.4 Úlcera Gástrica

A úlcera gástrica pode ser definida como solução de continuidade na mucosa do trato digestivo, que se estende desde a mucosa até a submucosa, passando pela muscular ou ainda mais profundamente. Histologicamente caracteriza-se por duas grandes estruturas: a margem da úlcera (formada por tecido adjacente não-necrosado da mucosa, denominado componente epitelial) e o tecido de granulação na base da úlcera (denominado componente tecidual conectivo), formado por fibroblastos e macrófagos, sendo esse, o local em que ocorre a proliferação de células endoteliais e formação de microvasos (TARNAWSKI, 2005).

Apesar dos grandes avanços no conhecimento da doença ulcerosa gástrica, a sua etiopatogenia não é totalmente conhecida. É uma doença comum do TGI e sua patogênese pode ser considerada como multifatorial, incluindo infecções por *Helicobacter pylori*, aumento da concentração de ácido gástrico sob a mucosa, de pepsina, alterações na motilidade gastroduodenal, hábitos de vida como o tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas (MEDEIROS, 2008) (Figura 3).

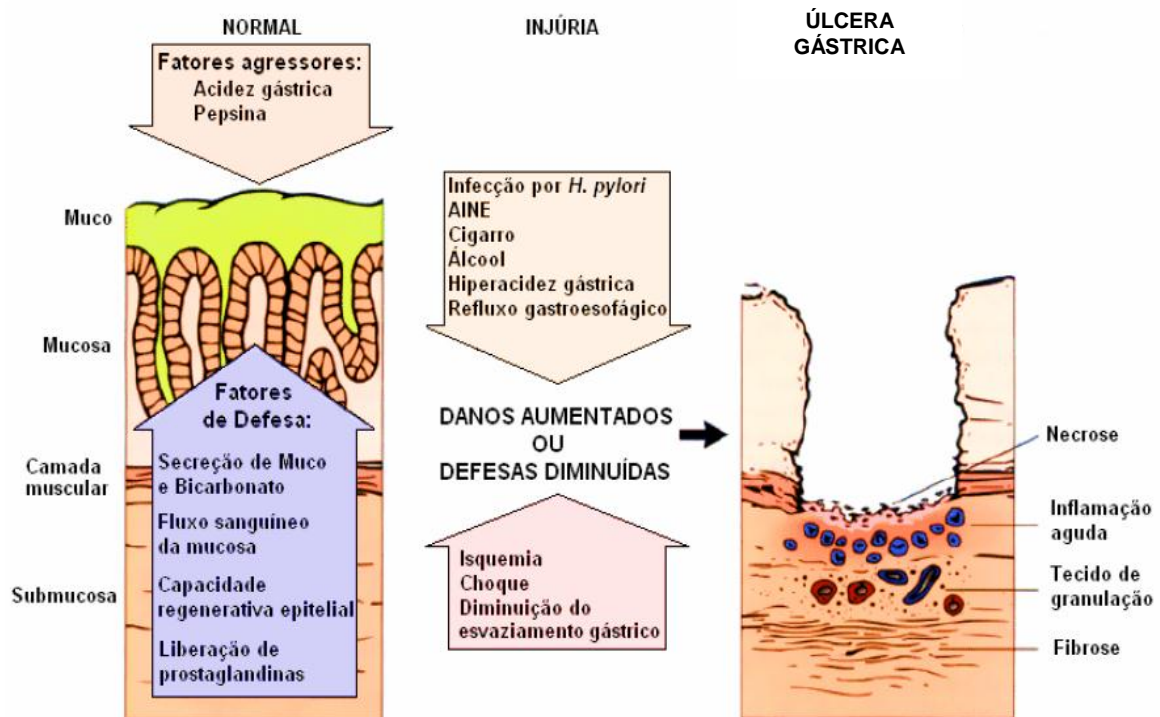


Figura 3: Mecanismos de proteção versus agentes lesivos, quando se tem um desequilíbrio entre esses fatores, têm-se a produção de úlceras gástricas. Fonte: ROBBINS; COTRAN, 2005 (adaptada).

Alguns relatos são descritos que a humanidade tem convivido com a úlcera gástrica desde meados do século IV antes de Cristo. Para o tratamento desse agravo a saúde era recomendada, há mais de doze séculos, a neutralização ácida. Desde esse tempo até os dias contemporâneos existiram grandes avanços na terapêutica e no entendimento sobre a sua patogênese. Com isso, o conhecimento a respeito dos inibidores da bomba de prótons e do *H. pylori* elevaram-se (HOOGERWERF; PASRICHA, 2001).

No estômago, as ulcerações se localizam corriqueiramente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo, na pequena curvatura (25%). Na úlcera gástrica, as lesões ocorrem pela ação do ácido clorídrico (HCL) sobre a mucosa, resultando em um desequilíbrio entre os fatores agressores e os mecanismos de defesa da mucosa gástrica. Tais lesões podem surgir e serem agravadas pelo o estresse, consumo excessivo de álcool, tabagismo, uso de AINES e pela presença de *H. pylori* no TGI (WALLACE; GRANGER, 1996).

2.4.1 Etanol: Agente Ulcerogênico Gástrico

Indivíduos que possuem patologias relacionadas ao álcool possuem um importante papel na medicina clínica, no qual aproximadamente 29% dos homens e 9% das mulheres são hospitalizados devido a doenças relacionadas ao álcool, afetando vários órgãos internos, dentre eles o estômago. No Brasil, evidenciou-se que o alcoolismo é o terceiro motivo de absenteísmo no trabalho e oitava causa de concessão de auxílio-doença pela Previdência Social (MEDEIROS, 2009).

O álcool é uma substância de efeitos complexos, tornando-se a causa mais comumente associada a casos de úlceras gástricas em homens. É conhecido como uma substância necrosante que causa injúria na mucosa gástrica, suas lesões caracterizam-se pela presença de ulcerações hemorrágicas. Dessa forma, o consumo excessivo de álcool pode resultar em quadros de gastrite, que se caracterizam pela presença de edema na mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias.

No estômago, o etanol promove rapidamente a formação de úlceras (lesão aguda), que é devido essencialmente a uma reação inflamatória. Essa lesão é provocada, inicialmente, pela liberação de mediadores inflamatórios que induzem vasoconstrição, isquemia e morte de células (OLIVEIRA et al, 2010).

Além disso, o álcool ainda interfere na secreção de ácido gástrico, um efeito possivelmente mediado por secreção de histamina e gastrina. Sabe-se que a barreira da mucosa é a principal proteção do estômago contra o ácido gástrico, no entanto, o etanol em elevadas concentrações aumenta a permeabilidade epitelial como consequência de mudanças no potencial celular, causando redifusão de íons H^+ . Outro fator que caracteriza o etanol como agente lesivo ao estômago é sua capacidade de promover a depleção de grupos sulfidrilas, que são fundamentais para a estabilização das membranas celulares, bem como na eliminação de ROS.

O etanol ainda pode influenciar a atividade da musculatura e diminuir o fluxo sanguíneo no estômago. Dessa forma, provoca estase gástrica e congestão capilar, elevando os riscos de hemorragias e ulcerações, associados às injúrias macroscópicas e histológicas na mucosa (SANTOS; RAO, 2001) (Figura 4).

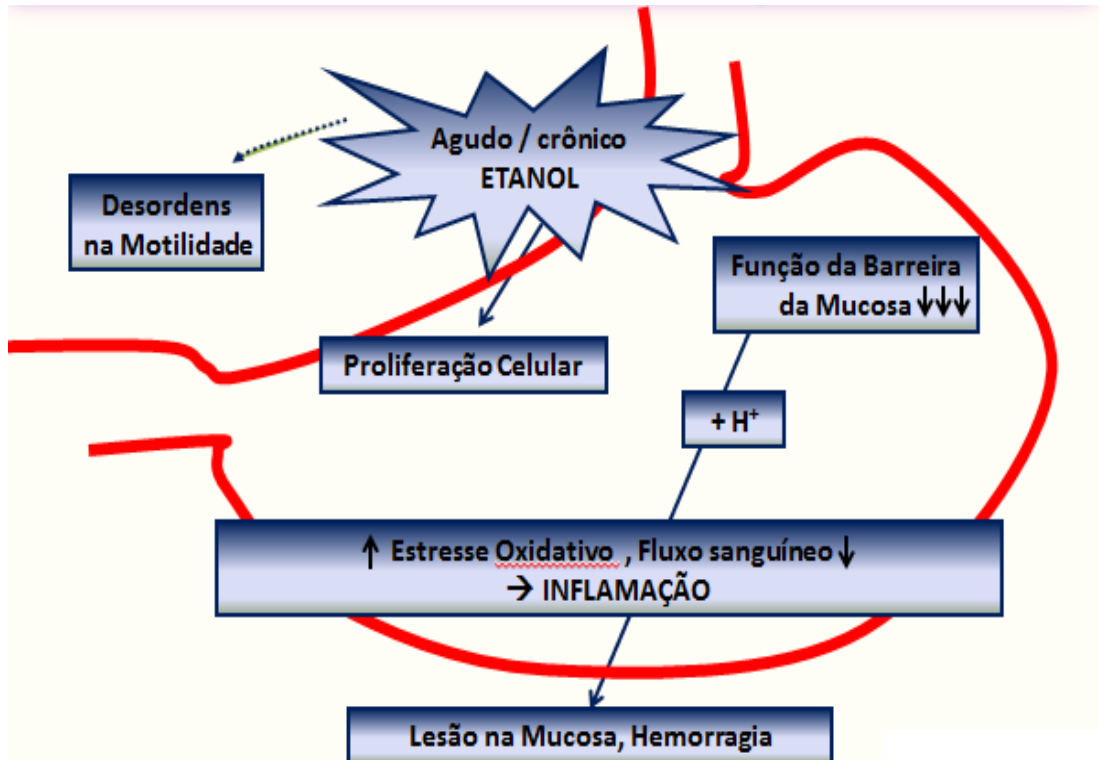


Figura 4: Efeitos deletérios provocados pelo o etanol na mucosa gástrica. Fonte: SIEGMUND et al, 2002 (adaptada).

O etanol ainda é responsável pela depleção de muco, possivelmente por mobilizar os mucopolissacarídeos da mucosa para o lúmen, reduzindo a capacidade secretória de muco do estômago, contribuindo assim, para formação de úlceras. A liberação de muco em resposta a aplicação de agentes irritantes possui um papel importante no reparo do epitélio e no processo de restituição (MEDEIROS, 2009).

2.5 Farmacoterapêutica da Úlcera Gástrica

Por vários anos as úlceras gástricas eram controladas cirurgicamente, resultando em elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Como estratégia de tratamento, o entendimento sobre a fisiopatologia dessas lesões é focado nas anormalidades da secreção de ácido gástrico e de pepsina, bem como na supressão dessa atividade secretória ácida. Na década de 1970, a supressão farmacológica da secreção ácida gástrica foi efetivada com a introdução dos antagonistas de receptores H_2 histaminérgicos (cimetidina e ranitidina) e, até 1990, foram os fármacos mais prescritos no mundo inteiro (POTRICH, 2009).

Nos dias atuais, existem quatro antagonistas H_2 utilizados na clínica: cimetidina, ranitidina, famotidina e nizatidina, os quais promovem a redução da secreção do ácido ao competir reversivelmente com a histamina pela sua ligação aos receptores H_2 nas células parietais, diminuindo os níveis de AMPc.

Com o passar dos anos, com o desenvolvimento dos inibidores da bomba de prótons $H^+/K^+ATPase$ (IBP), houve uma acentuada redução no uso dos antagonistas de receptores H_2 histaminérgicos. Os IBP como, omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e esomeprazol são medicamentos extremamente eficazes na inibição da secreção do ácido gástrico, resultando em melhoras significativas nas taxas de cicatrização de úlceras gástricas e duodenais (YUAN et al, 2006).

No entanto, tanto os fármacos antagonistas de receptores H_2 quanto os IBPs, podem apresentar alguns efeitos adversos quando utilizados cronicamente devido à supressão do ácido gástrico. Dentre esses efeitos, pode-se destacar o desenvolvimento da hipergastrinemia, resultante da menor liberação de somatostatina a partir das células D, que ocorre subsequentemente à supressão da secreção ácida, e o aumento do risco de infecção bacteriana, principalmente por *H. pylori*, ressaltando-se que esses dois problemas podem levar à formação de neoplasia gástrica (BRUNTON et al, 2006).

Além disso, no Brasil, o tratamento de úlceras gástricas, quando se é necessário à intervenção cirúrgica, torna-se bastante oneroso, não sendo acessível a grande parte da população. Dessa forma, o tratamento das úlceras pépticas constitui ainda um grande desafio e torna-se necessário o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos mais eficazes, menos tóxicos e de custo mais baixo para minimizar ou solucionar esses problemas (LIMA et al, 2006).

Com isso, diante dos efeitos colaterais provocados pela utilização crônica dos fármacos atualmente utilizados, e pelo o alto preço das intervenções cirúrgicas, se faz necessário investigar novas alternativas que agreguem efeitos farmacológicos capazes de promover a prevenção e a cicatrização de úlceras, com ausência ou redução de efeitos colaterais.

2.6 Enzima Conversora de Angiotensina II (ECA II)/Ang 1-7/ Receptor MAS: Uma Nova via de Proteção Gástrica

O sistema renina angiotensina (RAS) regula várias funções do corpo em um nível sistêmico ou local em vários órgãos. O RAS sistêmico ou circulatório está envolvido na regulação da pressão sanguínea, bem como na homeostase líquida e eletrolítica. Já o RAS local ou tecidual regula as funções de vários órgãos tais como coração, rim, e pulmão (PERLOT; PENNINGER, 2013).

Dentro dos RAS, a regulação é realizada através de uma cascata de proteases que geram vários peptídeos bioativos. O angiotensinogênio, glicoproteína produzida e secretada principalmente pelo fígado, é clivada pela renina, que é originada pelo aparelho justaglomerular do rim, resultando em um decapeptídeo, a angiotensina I (Ang I). A Ang I, subsequentemente, pode ser clivada em um octapeptídeo, a angiotensina II (Ang II), pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). ECA é expresso em células endoteliais da vasculatura e também localmente numa variedade de tecidos, tais como rim, coração, pulmão, cérebro (KUBA et al, 2010).

A Ang II representa o principal componente bioativo dentro do sistema RAS, promovendo suas ações e transduções de sinais através de receptores acoplados a proteína G, são eles os receptores de Ang II do tipo 1 (AT₁) e do tipo 2 (AT₂). A sinalização através AT₁ é uma rota bem estabelecida para mediar efeitos vasoconstritores, ao passo que a ativação do receptor AT₂ tem efeitos através da ativação de uma cascata vasodilatadora, ou seja, possui efeitos opostos ao receptor AT₁ (CAREY; PADIA, 2008).

Ang II pode ainda ser processado pela enzima conversora de angiotensina II (ECA II) para formar o heptapeptídeo Ang 1-7, removendo assim o principal peptídeo de ativação do sistema renina-angiotensina. Ang 1-7, por sua vez, se liga ao receptor Mas para inativar a atividade de Ang II em receptores AT₁. Por isso, a via ECA II/ Ang 1-7/ MAS é considerado um regulador negativo do RAS, opondo-se a atividade da via ECA/ Ang II/ AT₁ (SANTOS et al, 2013).

Além da sinalização através do receptor Mas, o peptídeo Ang 1-7 também pode atuar como um antagonista seletivo do receptor AT₁, conseguindo então, inativar ainda mais a via ECA/ Ang II/ AT₁. Em vias alternativas, a Ang I pode ser clivada por quimases para formar Ang II através de outras peptidases, como prolil-

endopeptidase (PEP), endopeptidase neutra (NEP), e thymet oligopeptidase (TOP), para gerar diretamente Ang 1-7, como demonstrado na Figura 5 (SILVA; BRAGA; SANTOS, 2010).

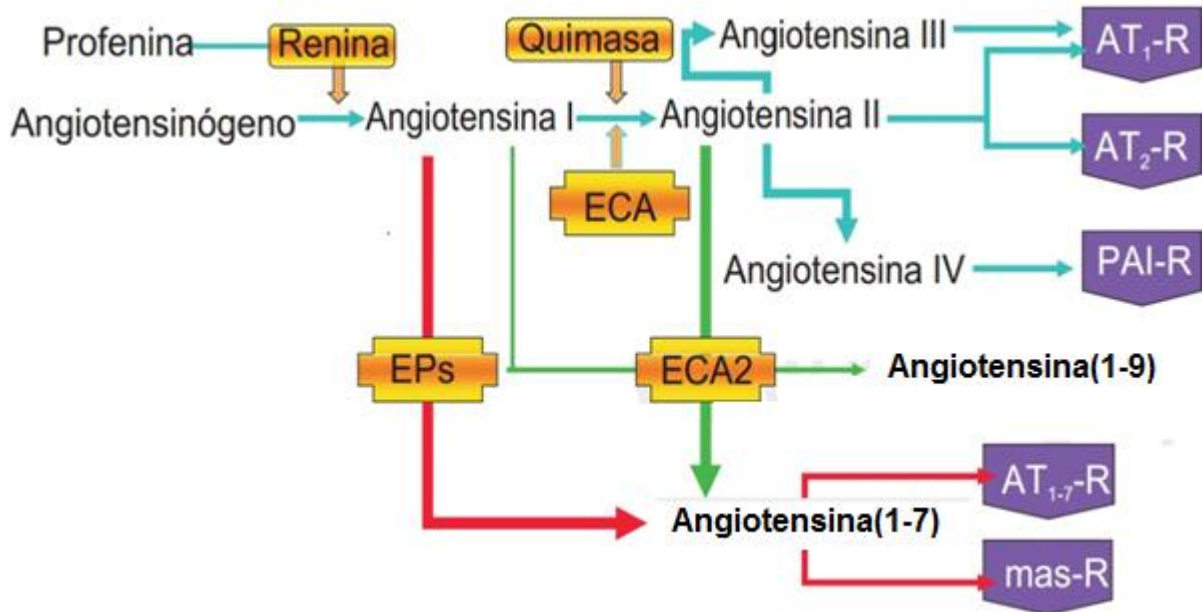


Figura 5: Formação do Ang 1-7. Notar que ele pode ser produzido de forma direta a partir da Ang I, ou então pode ser formada pelas conversões de Ang I e Ang II, sendo que essa última sofre ação da ECA II, para que se possa formar o peptídeo ativo Ang 1-7. Fonte: www.medlgrap.com (adaptada).

O sistema RAS desempenha um papel importante na patogênese de lesões na mucosa gástrica induzidas por estresse e por indometacina (BREGONZIO et al, 2004; JEZOVA et al, 1998). Antagonistas dos receptores AT₁ garantiram uma proteção gástrica contra as ações deletérias promovidas por esse sistema.

A literatura demonstra que a partir da descoberta da ECA II, que por sua vez é responsável pela conversão de Ang II em Ang 1-7 que se liga ao receptor MAS, os estudos sobre os seus efeitos benéficos dessa via começaram a surgir. Curiosamente, embora o receptor MAS tenha sido identificado inicialmente em 1986 através do proto-oncogene MAS, apenas em 2007 é que a via ECA II/ Ang 1-7/MAS foi elucidada. Tornando-se inicialmente um importante alvo para o controle da pressão arterial (CHAPPEL, 2007).

Recentemente, os metabolitos essenciais Ang I e Ang II foram identificados ao longo do TGI de roedores, incluindo estômago, cólon, ilhas pancreáticas e fígado.

Evidências recentes indicam que o receptor Mas quando ativado por Ang 1-7, inibe aos efeitos produzidos pela Ang II/ AT₁ na mucosa gástrica, em modelos experimentais (BRZOZOWSKI, 2014). No entanto quando se utilizou o antagonista específico para o receptor MAS, o A-779, notou-se que esses efeitos benéficos eram revertidos. Dessa forma, demonstra que a via ECA II/ Ang 1-7/MAS é realmente importante para a proteção da mucosa gástrica (BRZOZOWSKI, 2014; OLSZANECKI et al , 2009).

Além disso, estudos relatam que Ang 1-7 diminuiu consideravelmente a expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias como, IL-1 β e TNF- α , que são responsáveis por produzir danos na mucosa do estômago. Com isso, sugere-se que as propriedades anti-inflamatórias de Ang 1-7 podem contribuir para sua atividade protetora na mucosa gástrica (BRZOZOWSKI, 2014; McGRATH et al, 2009).

A partir disso, muitos estudos têm sido realizados a procura de compostos que possam atuar na via ECA II/ Ang 1-7/ MAS, visando novos alvos farmacológicos que garantam gastroproteção. Recentemente o Aceturato de Diminazeno, foi descrito como um possível ativador dessa via.

2.7 Aceturato de Diminazeno (DIME)

Há mais de 60 anos, o Aceturato de Diminazeno (DIME) é utilizado como tratamento da tripanossomíase animal. A droga foi introduzida pela primeira vez no mercado como um tripanossomicida e babesicida para o gado. Por causa do seu índice terapêutico elevado e baixa incidência de resistência em comparação com outros compostos, tornou-se o agente terapêutico mais comumente utilizado para a tripanossomíase no gado. Sua composição química é formada basicamente por uma diamidina aromática com duas porções aminofenil ligados por uma ponte de triazeno (PEREGRINE; MAMMAN, 1993) (Figura 6).

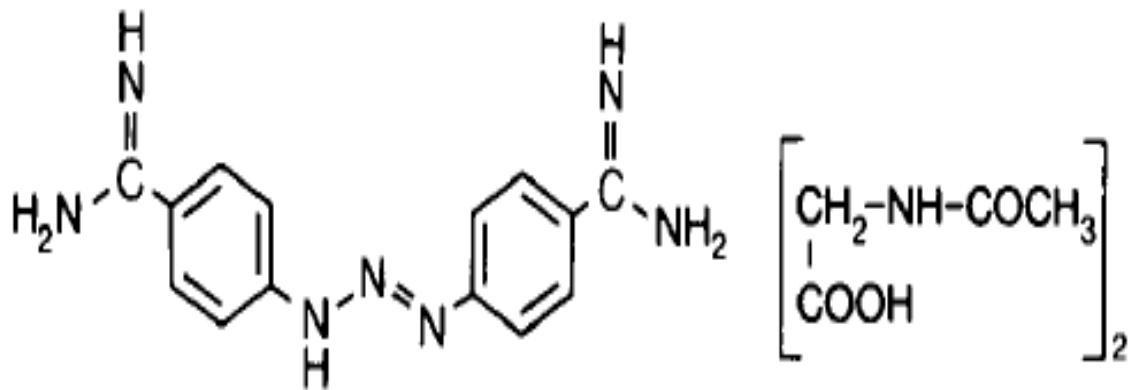


Figura 6: Molécula estrutural do Aceturato de Diminazeno. Fonte: PEREGRINE; MAMMAN, 1993 (adaptada).

Recentemente, vários estudos têm demonstrado que o Diminazeno é responsável por interferir em vários processos fisiológicas no organismo de roedores. O DIME tem sido demonstrado que pode ser um possível ativador da enzima conversora da angiotensina II. Como já mencionado no estudo em questão, a ECA II metaboliza a Ang II em Ang 1-7 regulando assim, alguns efeitos deletérios da via Ang II/ AT₁. Estes estudos sugerem um possível papel de DIME no tratamento de condições causadas por ativação dessa via de Ang-II. De fato, um estudo atual demonstrou que a administração de Diminazeno previne crises crônicas de hipertensão pulmonar em modelos experimentais (SHENOY et al, 2013). Além disso, o DIME também demonstrou possuir efeitos protetores em diferentes condições fisiológicas, incluindo acidente vascular cerebral isquêmico e glaucoma (KURIAKOSE; UZONNA, 2014).

Outros estudos demonstram que o DIME reduz significativamente os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6, IL-12 e TNF (KURIAKOSE et al, 2012), e ainda pode agir sobre lipopolissacarídeos bacterianos (LPS). Dessa forma, mostra que esse composto pode ser importante para solucionar ou ao menos minimizar os efeitos produzidos por algumas outras doenças (KURIAKOSE; UZONNA, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito gastroprotetor do Aceturato de Diminazeno, um ativador da Enzima Conversora de Angiotensina II, em roedores, bem como estudar o possível papel da via Ang (1-7)/Receptor MAS neste efeito.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito gastroprotetor do Diminazeno na lesão gástrica macroscópica e microscópica induzidas por etanol e ácido acético em camundongos;
- Investigar os efeitos do DIME sobre o estresse oxidativo induzido por etanol, através das dosagens de glutathiona (GSH) e de malondialdeído (MDA);
- Determinar a ação do DIME sobre a formação da camada de muco em lesões gástricas induzidas por etanol;
- Avaliar o efeito do DIME sobre a secreção gástrica em lesões gástricas induzidas por etanol;
- Quantificar a expressão do peptídeo Ang 1-7 por ELISA em lesões gástricas induzidas por etanol e ácido acético;
- Estudar o efeito cicatrizante do Diminazeno nas lesões crônicas induzidas por ácido acético, por meio da dosagem de colágeno;
- Testar os efeitos anti-inflamatórios do DIME na lesão gástrica induzida por ácido acético, através da dosagem de mieloperoxidase (MPO) e citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10).
- Determinar por imunohistoquímica a expressão do receptor MAS na lesão gástrica induzida por ácido acético;
- Avaliar o efeito do DIME sobre o fluxo sanguíneo gástrico;
- Investigar a angiogênese promovida pelo o DIME em lesões gástricas induzidas por ácido acético.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados no referido estudo, camundongos Swiss, pesando entre 25 e 30 gramas. Os animais foram colocados em caixas, num ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ num ciclo de 12h luz/12 h escuro. Os animais foram privados de alimentos por 20-24 horas antes dos experimentos, mas tiveram livre acesso a água. Os grupos experimentais consistiram de 5-8 animais por grupo. Os camundongos foram fornecidos pelo Biotério Central e do Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Piauí – UFPI. Os protocolos experimentais estão de acordo com os padrões de uso de animais experimentais e o projeto foi aprovado pelo o Comitê de Ética em pesquisa animal da Universidade Federal do Piauí – UFPI (Nº068/14).

4.2 Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais

- ❖ Agitador de tubos tipo Vortex
- ❖ Balança Analítica Ohaus AS2600
- ❖ Banho-Maria (Aquecedor com temperatura controlada)
- ❖ Béqueres (vidro e plástico)
- ❖ Câmara de Neubauer espelhada
- ❖ Cânula para gavagem (Administração v.o.)
- ❖ Contador manual de células sanguíneas (*Digitimer*)
- ❖ ELISA
- ❖ Fios para sutura
- ❖ Homogeneizador
- ❖ Lâmina para microscopia 26x76 mm
- ❖ Lamínula 24x32 mm
- ❖ Luvas (Super Max)
- ❖ Máquina fotográfica Nikon
- ❖ Medidor de pH
- ❖ Micropipetas
- ❖ Microscópio Óptico

- ❖ Micrótomo Olympus
- ❖ Ponteiras para pipetas automáticas Sigma
- ❖ Seringas (B-D *Plastipak*)
- ❖ Tubos de Ensaio

4.3 Drogas Utilizadas

- ❖ Aceturato de Diminazeno (*Sigma-Aldrich*, Número CAS: 908-54-3);
- ❖ Ácido Acético (Dinâmica);
- ❖ Anti-Angiotensina (1-7) Receptor MAS (Alomone *labs*);
- ❖ A-779 (Alomone *labs*);
- ❖ Etanol Absoluto (*Sigma-Aldrich*, Número CAS: 64-17-5);
- ❖ Kit ELISA para Ang (1-7) (*R & amp; D Systems Ins.; Mn, EUA*);
- ❖ Omeprazol (*Sigma-Aldrich*, Número CAS: 73590-58-6);

4.4 Corantes

- ❖ Eosina (Merck);
- ❖ Hematoxilina (Reagen);

4.5 Soluções

❖ **Salina**

Cloreto de Sódio a 0,9% estéril;

❖ **Formol 10%**

Formol Absoluto-----10ml

Água Destilada-----90ml

❖ **Ácido Tricloroacético (TCA) 50%**

TCA-----50g

Água destilada-----100ml

❖ **Alcian Blue 0,1%**

Alcian Blue-----0,10g

Água destilada-----1L

❖ **Tampão Tris**

Hidroximetil aminometano (Tris)-----	6,1g
Água destilada-----	500ml

* O pH do tampão foi ajustado para 8,0

❖ **EDTA 0,02M**

EDTA-----	10ml
Água Destilada-----	90ml

❖ **EDTA 0,2M**

EDTA-----	1,737g
Água Destilada-----	23,3ml

❖ **TRIS 0,4M pH 8,9**

Tris-----	4,84g
EDTA 0,2M-----	10,0ml
Água Destilada-----	90,0ml

❖ **DTNB 0,01M**

DTNB-----	13,2mg
Metanol-----	3,3ml

❖ **Solução de KCL 1,15%**

KCL-----	1,15g
Água Destilada-----	100ml

❖ **H₃PO₄ 1%**

H ₃ PO ₄ -----	1g
Água Destilada-----	100ml

❖ **Solução de Ácido Tiobarbitúrico 0,02M 0,6%**

Ácido Tiobarbitúrico-----	2,882g
---------------------------	--------

Água Destilada-----1L

❖ **Fenolftaleína 2%**

Fenolftaleína-----2g

Etanol 50%-----100ml

❖ **NaOH 0,01N**

NaOH-----4g

Água Destilada-----1L

4.6 Efeito Gastroprotetor do DIME na Lesão Gástrica Induzida por Etanol: Curva Dose-Resposta

Para avaliar o efeito gastroprotetor do DIME na lesão aguda por etanol seguiu-se o modelo descrito por MEDEIROS (2009) com algumas modificações. Os camundongos foram pré-tratados por gavagem e divididos nos seguintes grupos: Grupo controle, pré-tratado somente com salina; DIME nas doses de 0,7, 2, 7 (melhor dose) e 20 mg/kg; e Omeprazol (10 mg/kg). Após uma hora foi administrado etanol 50% (0,5ml/25g), ao término dessa hora os animais foram sacrificados e o estômago retirado e imediatamente aberto ao longo da curvatura maior, para análise. Os estômagos foram então estirados e fotografados com uma câmera digital para posterior análise e medições das alterações macroscópicas com o auxílio de um programa de planimetria computadorizada (*Image J*®). Uma amostra da região do corpo de cada estômago foi fixado, imediatamente após a retirada, em formol 10%, e após 24 horas foram transferidas para álcool 70% para subseqüentes análises histopatológicas. Outras amostras gástricas foram retiradas, pesadas e congeladas a -80°C para posterior dosagem de glutathiona (SEDLAK, LINDSAY, 1968) e ensaio de malondialdeído (MIHARA; UCHIYAMA, 1978).

4.7 Avaliação da Via ECA II/ANG (1-7)/MAS no Efeito Gastroprotetor de DIME

Para avaliar o papel da via ECA II/Ang (1-7)/MAS foi utilizado o antagonista seletivo para o receptor MAS, A-779 (5 mg/kg), dessa forma, os animais foram pré-tratados e divididos nos seguintes grupos: A-779 (5 mg/kg) + salina; e A-779 + DIME (7 mg/kg, melhor dose). O antagonista foi administrado via intraperitoneal (*i.p.*), 30 minutos antes dos pré-tratamentos, e os demais passos foram semelhantes ao descrito no tópico anterior, com administração de etanol 50% (0,5 ml/25g), sacrifício e posterior análise.

4.8 Análise Histopatológica da Mucosa Gástrica de Camundongos

Para avaliação histológica, as amostras de estômago foram fixadas em solução de formol a 10% por 24 h. Após a fixação, as amostras foram transferidas para uma solução de álcool 70%. O material foi, em seguida, embebido em parafina e seccionado; Seções de 4 mm de espessura foram desparafinizadas, coradas com hematoxilina e eosina (H & E) e, em seguida, analisadas sob um microscópio óptico. As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios de Laine e Weinstein (1988), sendo avaliada a perda de células epiteliais (escores de 0-3), edema na superfície da mucosa (escores de 0-4), hemorragia (escores de 0-4) e infiltração de células inflamatórias (escores de 0-3), sendo o escore máximo de 14. Toda a avaliação histopatológica foi realizada através de um estudo cego.

4.9 Análise da Concentração de Glutathiona

A concentração de glutathiona (GSH) em amostras de tecidos do estômago foi realizada de acordo com o método descrito por SEDLAK; LINDSAY (1968). Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos, uma amostra de 50 a 100 mg da mucosa gástrica dos animais foi homogeneizada em 1ml de EDTA 0,02M para cada 100mg de tecido. Alíquotas de 400µL do homogeneizado foram misturadas a 320µL de água destilada e a 80µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C. Um total de 400µL do sobrenadante foi adicionado a 800µL de tampão Tris 0,4M (pH 8,9) e 20µL de ácido ditio-nitrobenzoico DTNB (reagente de Ellman) 0,01M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância foi lida a 412nm

em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em $\mu\text{g/g}$ de tecido.

4.10 Avaliação das Concentrações de Malondialdeído (MDA)

Os níveis de malondialdeído foram determinados pelo método de MIHARA; UCHIYAMA (1978) baseado na reação com o ácido tiobarbitúrico. Fragmentos de estômago foram homogeneizados com cloreto de potássio (KCl) gelado 1.15% para preparar 10% de homogenato. Meio mililitro (0,5ml) desse homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrifuga de 10 ml, 3 ml de ácido fosfórico (H_3PO_4) (1%) e 1ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0.6%) foram acrescentados. Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em um banho de água fervendo e a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 4ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 1 minuto com o auxílio de um agitador "vortex", centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos e a absorbância da camada orgânica foi mensurada em 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em mmol/g de tecido.

4.11 Efeito Gastroprotetor do DIME na Lesão Gástrica Induzida por Ácido Acético

Para a análise cicatrizante do DIME na lesão crônica induzida por ácido acético, seguiu-se o modelo de Wallace (2001) com algumas modificações (Figura 7). Os animais foram anestesiados e em seguida foi realizada a laparotomia, o estômago foi exposto e o ácido acético 40% ($100\mu\text{L}/1\text{min}$) foi administrado na parte serosa do estômago, utilizou-se um suporte de 4 mm para depositar o ácido acético, garantindo assim que todos os animais foram expostos ao mesmo trauma. Os animais foram tratados a partir do 2º dia até o 7º dia após a lesão. Os grupos foram tratados com: Salina; DIME; A-779; A-779+DIME; e OMP. O grupo controle não recebeu a administração de ácido acético e foi tratado somente com salina. Ao término do sétimo dia, os animais foram eutanasiados, o estômago retirado e imediatamente aberto para a realização das análises macroscópicas. Além disso, foram retirados tecidos para a análise histológica, atividade de MPO, colágeno e imunohistoquímica.

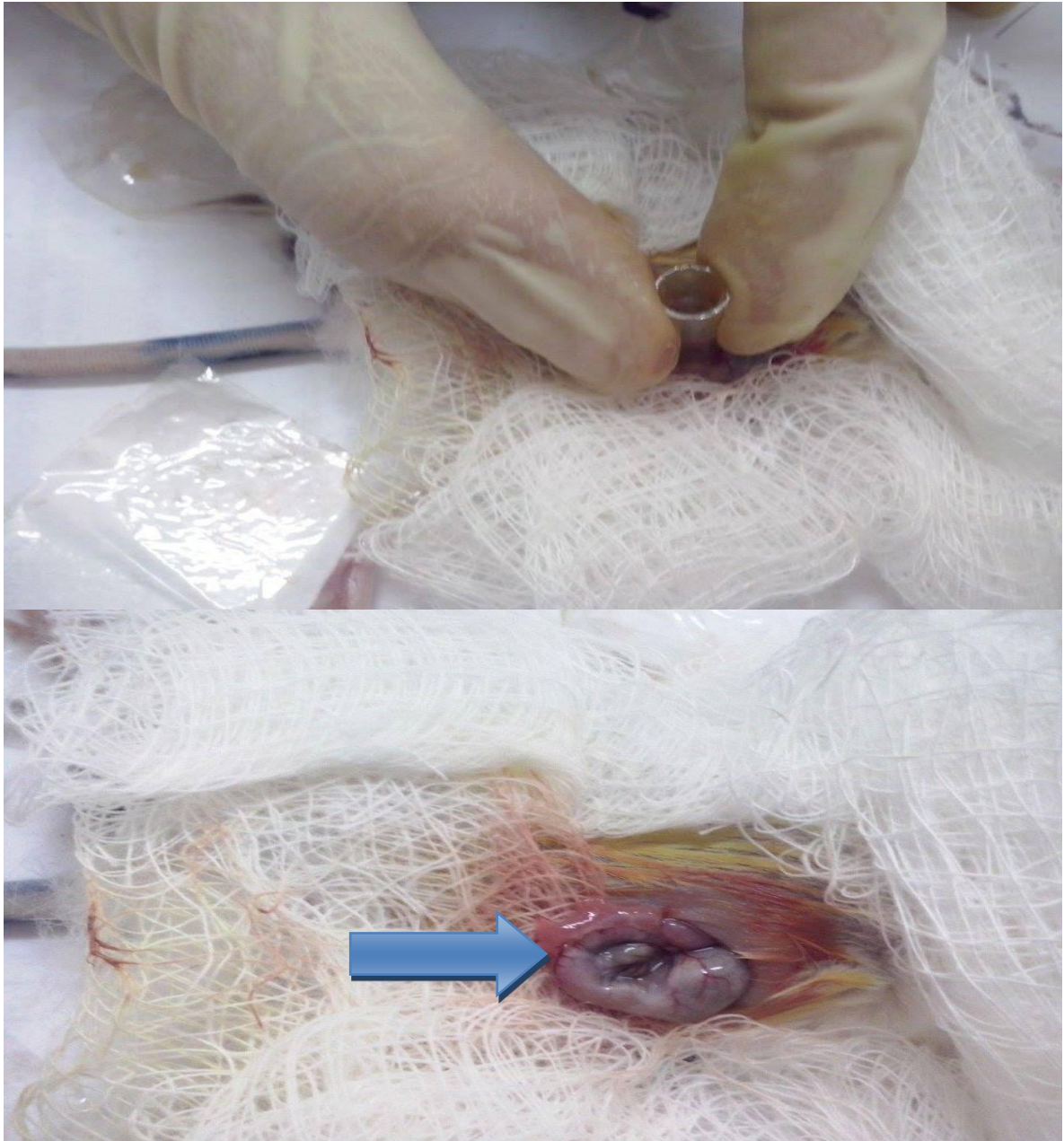


Figura 7: Demonstração ilustrativa da metodologia utilizada para a indução da lesão gástrica por ácido acético. A seta azul está identificando a área que foi induzida a úlcera gástrica com a administração do ácido acético 40%.

4.12 Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da MPO foi determinada pelo método de BRADLEY e cols. (1982). Resumidamente, 50-100 mg de tecido foi homogeneizada em 1 ml de tampão de potássio com 0,5% de hexadecitrimetilamônio (HTAB) a cada 50 mg de tecido, em seguida, centrifugado a 4.000 rpm durante 7 minutos a 4°C. A atividade de MPO no sedimento ressuspenso foi analisada através da medição da alteração na absorbância a 450 nm utilizando dicloridrato de o-dianisidina e 1% de peróxido de hidrogênio. Os resultados foram registrados como unidades de MPO por mg de tecido.

4.13 Imunohistoquímica para o Receptor MAS

As amostras da mucosa gástrica foram retiradas e posteriormente fixadas em formol tamponado a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70% e em seguida parafinizados. Após essa etapa, foram realizados cortes histológicos de 3 a 4 micras de espessura e as lâminas foram colocadas em estufa a 60° C por 15 minutos. Após a retirada da parafina do tecido, seguida de hidratação, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 3% diluída em metanol. Posteriormente, foi realizada a lavagem das lâminas com PBS (Tampão Salina Fosfato) 0,01M (5min), seguido por glicina 0,1M em PBS (5 min) e PBS 0,01M (5 min). As lâminas foram então mergulhadas numa solução de PBS com albumina bovina (BSA) a 1% durante 30 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário para o receptor MAS (anti-Angiotensina 1-7, de coelho, 1:100) diluído em PBS-BSA 1%, em temperatura de 4°C, durante uma noite (*overnight*). Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS-BSA 1% e incubadas com o anticorpo secundário marcado com biotina (anticorpo anti-IgG de camundongo), na diluição de 1:100, por uma hora, à temperatura ambiente. Após a remoção do excesso de anticorpo, o material foi incubado com o complexo streptoavidina –biotina – peroxidases diluído em PBS, por 35 min, à temperatura ambiente. Após a lavagem com PBS, a reação foi revelada utilizando diamino – benzidina – peróxido de hidrogênio em PBS, à temperatura ambiente, por 5 min, no escuro. Após controle da intensidade, a reação foi interrompida pela lavagem com água corrente por 5 min. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Mayer, por 45 segundos, sendo o excesso retirado com água corrente.

Posteriormente, as lâminas foram colocadas em hidróxido de amônia a 0,5% por 10 segundos e lavadas novamente em água destilada. Finalmente, as mesmas foram submetidas à desidratação com álcool 95%, álcool absoluto, xilol e montadas com lamínulas em Entellan (MEDEIROS, 2009; RIBEIRO et al, 2002).

4.14 Concentrações de Ang 1-7 na mucosa gástrica

As concentrações de Ang 1-7 no tecido gástrico foram mensuradas usando kits de ELISA (*R & amp; D Systems Inc., MN, EUA*) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. A concentração de Ang 1-7 foi medida na placa teste através de um ensaio imunoenzimático (ELISA), sendo então ligado a uma enzima comercial. Em resumo, a placa foi homogeneizada mecanicamente e as amostras foram mantidas sob refrigeração. As amostras homogeneizadas foram então centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min em uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi então retirado e o nível de Ang 1-7 foi mensurado por um equipamento de ELISA. Foram selecionadas amostras de ambos os tipos de lesão gástrica.

4.15 Determinação de Muco

O muco aderido à parede gástrica no modelo de lesão gástrica induzida por etanol foi determinado de acordo com o método de CONE e colaboradores (1974). Segmentos na porção glandular dos estômagos foram coletados e pesados. Cada segmento foi transferido para uma solução de *Alcian blue* 0,1%. O excesso do corante foi removido pela submersão das amostras em solução de sacarose 0,25 M. Após essa etapa, o complexo muco-corante foi extraído pela imersão em $MgCl_2$ 0,5M por 2 horas. O extrato foi misturado com éter dietílico, centrifugado a 1400 g por 10 minutos, e a absorbância do sobrenadante foi medida a 598 nm. A quantidade do *Alcian blue* extraído (mg/g de tecido) foi calculada usando a curva padrão de *Alcian blue*.

4.16 Avaliação da Secreção Gástrica

Primeiramente, o piloro foi ligado e o procedimento ocorreu sob efeito anestésico (cetamina associada à xilazina). Então o DIME (7 mg/kg) foi administrados via intraduodenal. Em outro grupo, foi administrada histamina (5 mg/kg), e outro grupo foi administrado Omeprazol (10 mg/kg) Após 4 horas, os

animais foram eutanasiados por anestesia profunda por inalação, seus estômagos foram abertos e o conteúdo gástrico foi coletado. O volume final e pH foram diretamente determinados depois da lavagem da mucosa dos estômagos com 2 mL de água destilada. A acidez total do suco gástrico foi titulada com NaOH 0,01 N, usando 2% de fenolftaleína como indicador (SHAY et al., 1945).

4.17 Determinação dos Níveis de Colágeno com *Picrosirius Red*

Amostras de tecido gástrico de até cinco micrómetros de espessura foram colocadas sobre lâminas e incubadas durante 1 hora a 80°C, para aderência adequada da secção de corte. As secções foram depois desparafinizadas em xileno e hidratadas em água. Estas amostras foram incubadas em 0,1% de corante *Picrosirius Red* durante 1 hora à temperatura ambiente. Sendo então seguida de lavagem com água destilada, e posteriormente coradas com Hematoxilina. Por fim, as secções foram examinadas utilizando microscópio de luz polarizada (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

4.18 DOSAGENS DE CITOCINAS (TNF- α , IL-6, IL-10)

A produção de citocinas foi determinada através do conteúdo dessas citocinas na mucosa gástrica. Logo após os animais serem eutanasiados, secções dos estômagos foram removidos e estocados a -70° C para posterior homogeneização e coleta do sobrenadante para dosagem de TNF- α , IL-6, IL-10, segundo descrito por Garabedian e colaboradores (1995). A detecção das concentrações dessas citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA), conforme protocolo de Cunha e colaboradores (1993), o qual seguiu as etapas; (1) incubação com 2 μ g/ml de anticorpo anti-TNF, anti-IL-6 e anti-IL-10 diluídos em tampão de bicarbonato (pH 8,2) – 100 μ L/poço (placa de 96 poços) por 16-24 horas a 4° C; (2) lavagem da placa (3x) com PBS-tween 20; (3) bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 μ L/poço por duas horas à temperatura ambiente; (4) lavagem da placa (3x); (5) incubação com curva padrão de TNF- α , IL-6 e IL-10 diluída em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100 μ L/poço por 116 a 24 horas a 4° C); (6) lavagem da placa (3x); (7) incubação com anticorpo biotilado diluído 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por uma hora à temperatura ambiente, (8) lavagem da placa (3x); (9) incubação com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1: 5000 em tampão de lavagem, 100 μ L/poço por 15

minutos à temperatura ambiente; (10) lavagem da placa (3x); (11) incubação com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100µL/poço, cobriu-se a laca e deixou-se no escuro por 5-20 minutos à temperatura ambiente; (12) a reação foi paralisada com 150µL/poço de H₂SO₄ 1M; (13) leitura em espectrofotômetro a 490 nm.

4.19 Análise Estatística

Os dados foram descritos como médias ± SEM, conforme apropriado. A análise estatística foi determinada através do teste de análise de variância (ANOVA). Quando houve diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Os resultados foram expressos como média ± SEM ou pelo valor individual de cada animal, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando o $p < 0,05$. Utilizará o programa *GraphPad Prism 5.0* para a realização da análise estatística.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito do DIME em lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos *swiss*

O resultado obtido na curva dose resposta demonstrou que o DIME nas doses de 0,7 mg/kg (19.88 ± 4.44), 2 mg/kg (10.24 ± 6.34), 7 mg/kg (1.78 ± 0.74) e 20 mg/kg (2.87 ± 1.53) foram capazes de reverter os danos na mucosa gástrica na lesão induzida por etanol em camundongos na análise macroscópica (Figura 8 de A-G) e microscópica (Figura 9 de A-J). A análise microscópica revelou que o etanol aumentou edema, perda de células epiteliais, infiltração de células inflamatórias e causou severos danos hemorrágico. Por outro lado, o pré-tratamento com DIME diminuiu significativamente a infiltração de células inflamatórias, a formação de edema, a perda de células epiteliais e a formação de úlceras hemorrágicas induzidas pelo o etanol (Figura 9 de A-J). Assim, a análise de ambas as descobertas macroscópica e microscópica revelou uma excelente correlação, o que confirma a eficácia do composto. Insere-se que a dose de 7 mg/kg proporcionou uma melhor proteção contra as lesões gástricas induzidas por etanol (porcentual de inibição de 94%), dessa forma, esta dose foi escolhida para o estudo dos possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos gastroprotetores mediados pelo o DIME.

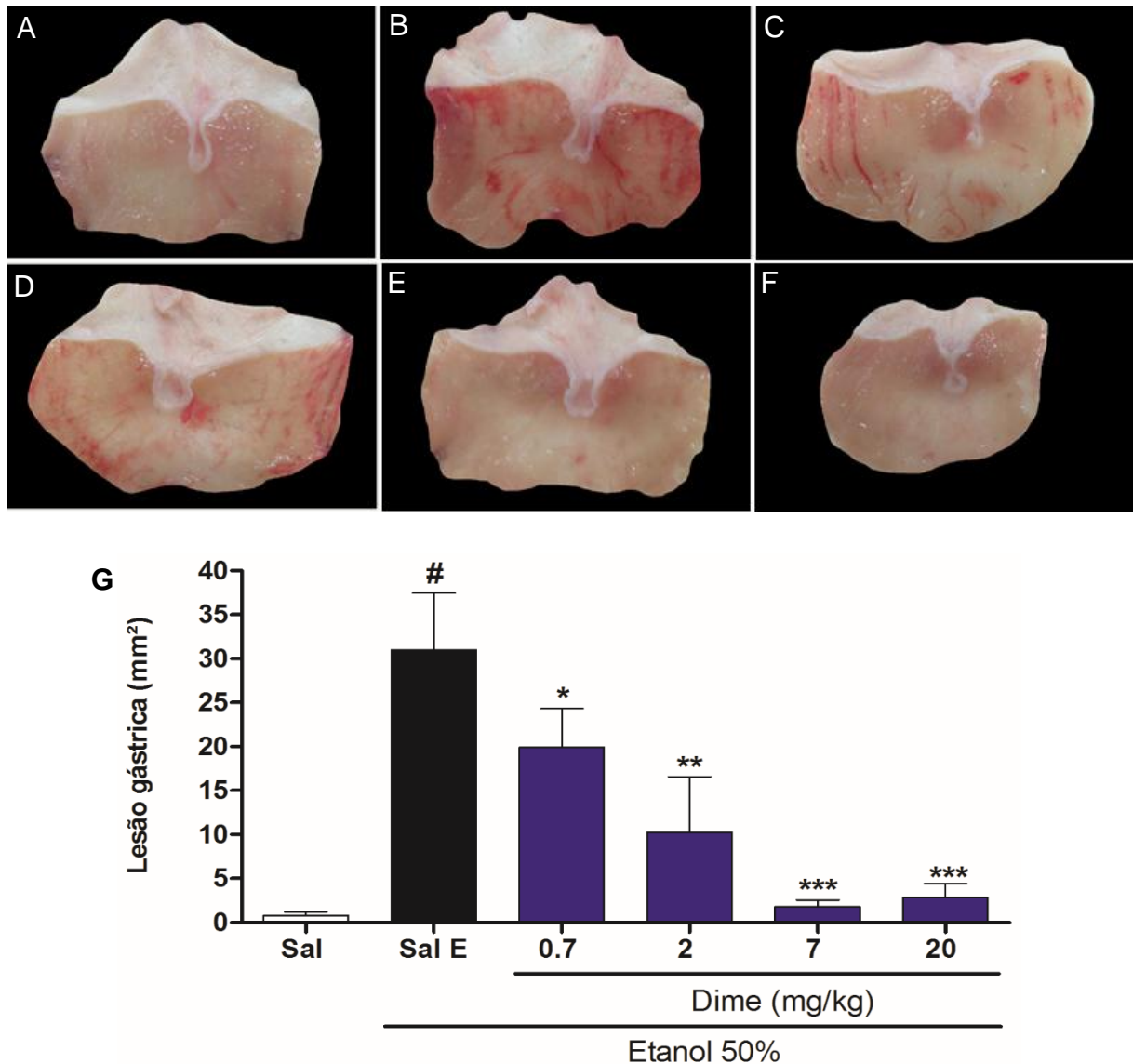


Figura 8: Aceturato de Diminazendo reduz as lesões gástricas induzidas por etanol. Os camundongos foram pré-tratados, via oral, com doses de DIME e após 30 minutos foi administrado etanol 50% (0,5ml/25g). Em A, controle negativo (salina); Em B, controle positivo (etanol); Em C, dose de 0,7 mg/kg (19.88 ± 4.44 , 36% de inibição); Em D, dose de 2 mg/kg (10.24 ± 6.34 , 67% de inibição); Em E, dose de 7 mg/kg (1.78 ± 0.74 , 94 % de inibição); Em F, dose de 20 mg/kg (2.87 ± 1.53 , 90% de inibição); Em G, representação gráfica dos valores obtidos na análise macroscópica das lesões gástricas induzidas por etanol. Todas as doses de DIME reverteram os danos provocados pelo o etanol na mucosa gástrica quando comparado ao grupo controle positivo, no entanto a dose de 7 mg/kg foi considerada a melhor dose. Os dados são apresentados como média \pm SEM com n = 5-7 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Newman-Keuls, Diferenças significativas: * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$ quando comparado ao grupo lesivo (etanol); # $P < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle.

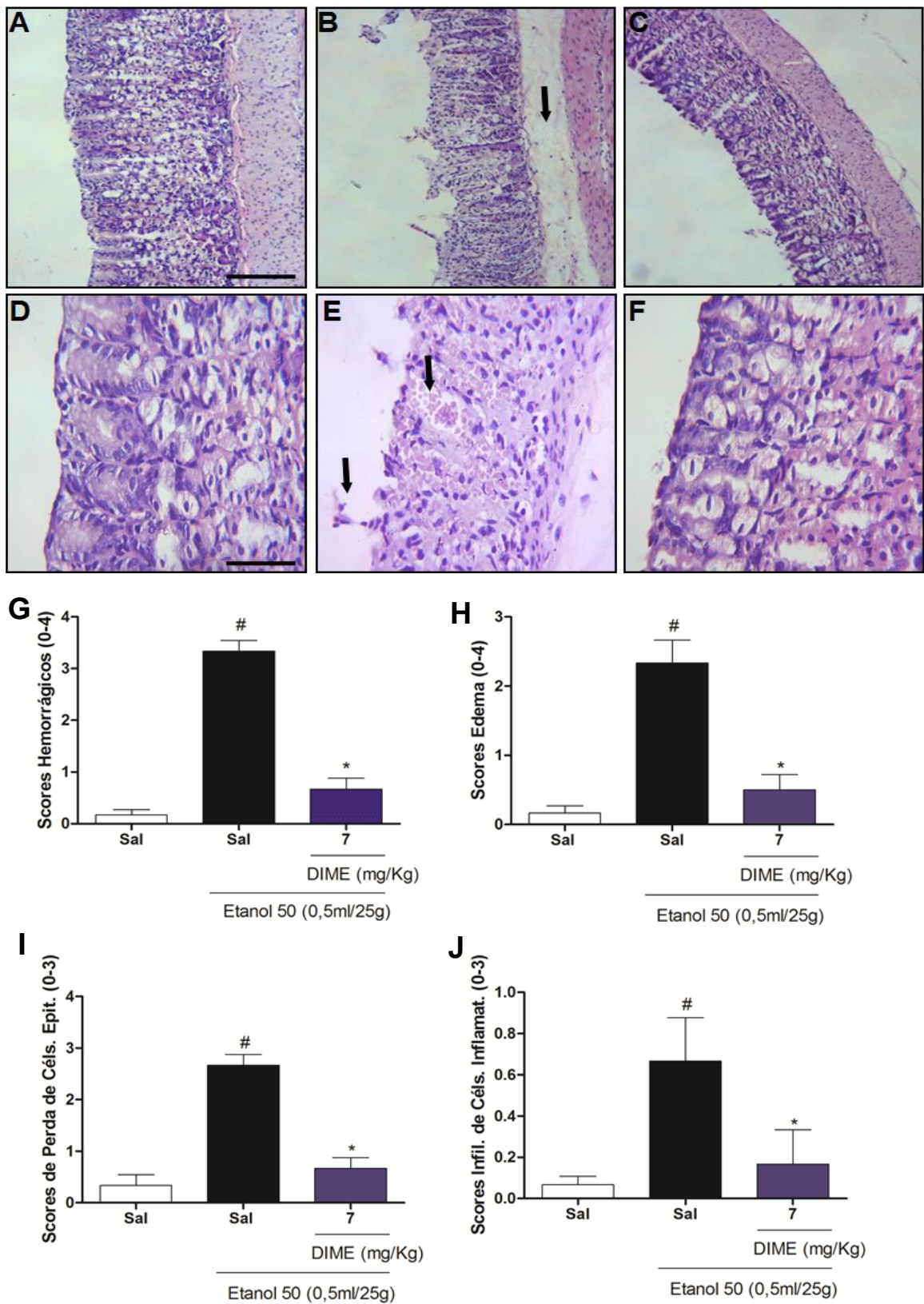


Figura 9: Fotomicrografias da mucosa gástrica de camundongos swiss (ampliação, 100x e 400x, primeira e segunda linha respectivamente) e resultados quantitativos (scores) da análise microscópica. Em A e D, grupo controle (salina); Em B e E, grupo de animais que foi administrado

etanol 50% (0,5ml/25g), notar a formação acentuada de edema, juntamente com uma grande perda de células epiteliais e uma intensa hemorragia (setas); Em C e F, animais pré-tratados com DIME (7mg/kg), notar o efeito protetor na mucosa gástrica com preservação das células epiteliais e praticamente ausência de hemorragia. Os painéis G, H, I e J, representam os resultados quantitativos (scores) da análise microscópica nas lesões induzidas pelo o etanol. Os dados apresentados são medianas com pontuação mínima e máxima indicadas entre parênteses. Em G, o etanol causou elevada hemorragia na mucosa, sendo então revertida de forma significativa quando os animais foram pré-tratados com DIME. Em H, o etanol proporcionou o aumento do edema na mucosa gástrica, no entanto quando os animais foram pré-tratados com DIME o edema diminuiu de forma significativa. Em I, o etanol provocou uma elevada perda de células epiteliais, porém quando os animais foram pré-tratados com DIME essa perda celular diminuiu de forma significativa. Em J, o etanol aumentou o infiltrado de células inflamatórias, entretanto quando aos animais receberam o pré-tratamento com DIME, essa infiltração de células pró-inflamatórias reduziu de forma significativa. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para as comparações múltiplas da avaliação histológica. # P<0,05 quando comparado com o grupo controle (salina), * P<0,05 quando comparado com o grupo do lesivo (etanol).

5.2 Papel da via ECA II/ Ang (1-7)/ Receptor MAS sobre o efeito gastroprotetor do DIME em lesões induzidas por etanol

Para a avaliação do papel da via ECA II/Ang (1-7)/MAS na proteção gástrica em lesões induzidas por etanol, foi utilizado o antagonista seletivo para o receptor MAS, o A-779. O grupo que foi administrado somente etanol apresentou elevados danos à mucosa gástrica (19.71 ± 3.08); o grupo que foi pré-tratado com DIME (7mg/kg) reverteu de forma significativa às lesões gástricas induzidas pelo o etanol (1.05 ± 0.34); no entanto o grupo que foi pré-tratado com o A-779 e depois administrado DIME, reverteu o efeito gastroprotetor do DIME (12.26 ± 2.84); não houve diferença estatística quando comparado o grupo que recebeu somente A-779 com o grupo pré-tratado somente com o DIME (8.78 ± 2.18); O grupo que foi pré-tratado com omeprazol reverteu às lesões induzidas pelo o etanol (2.48 ± 0.83).

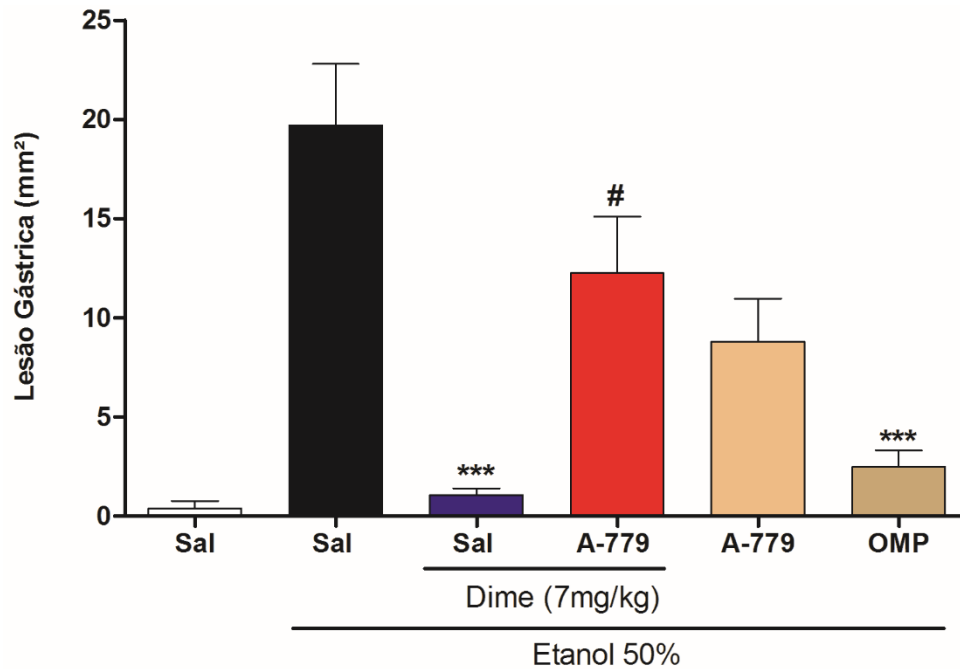


Figura 10: DIME reduz as lesões gástricas induzidas por etanol pela via ECA II/ Ang (1-7)/MAS. Os grupos de animais que receberam a administração do antagonista seletivo do receptor MAS, o A-779, revertem o efeito gastroprotetor do DIME. O grupo que recebeu omeprazol (droga padrão) reverteu às lesões induzidas pelo o etanol. Os dados são apresentados como média \pm SEM com $n = 5-7$ animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Newman-Keuls, Diferenças significativas: *** $P < 0,0005$ quando comparado ao grupo lesivo (etanol); # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo que foi pré-tratado com DIME (Sem o antagonista).

5.3 Avaliação Antioxidante

A determinação dos grupos sulfidrílicos não protéicos na mucosa gástrica de camundongos mostrou que a administração de etanol diminuiu de forma significativa o nível gástrico de glutathiona reduzida (GSH) quando comparado com o grupo controle negativo (salina) ($P < 0,0005$). Porém, o pré-tratamento dos animais com DIME, manteve os níveis de GSH semelhantes aos normais quando comparado ao grupo controle negativo (salina). No entanto, quando foi administrado o antagonista seletivo para o receptor MAS (A-779), os níveis de GSH diminuíram de forma significativa ($P < 0,005$). Quando foi administrado omeprazol, droga padrão, os níveis de GSH se mantiveram próximo aos níveis normais ($P < 0,0005$) (Figura 11).

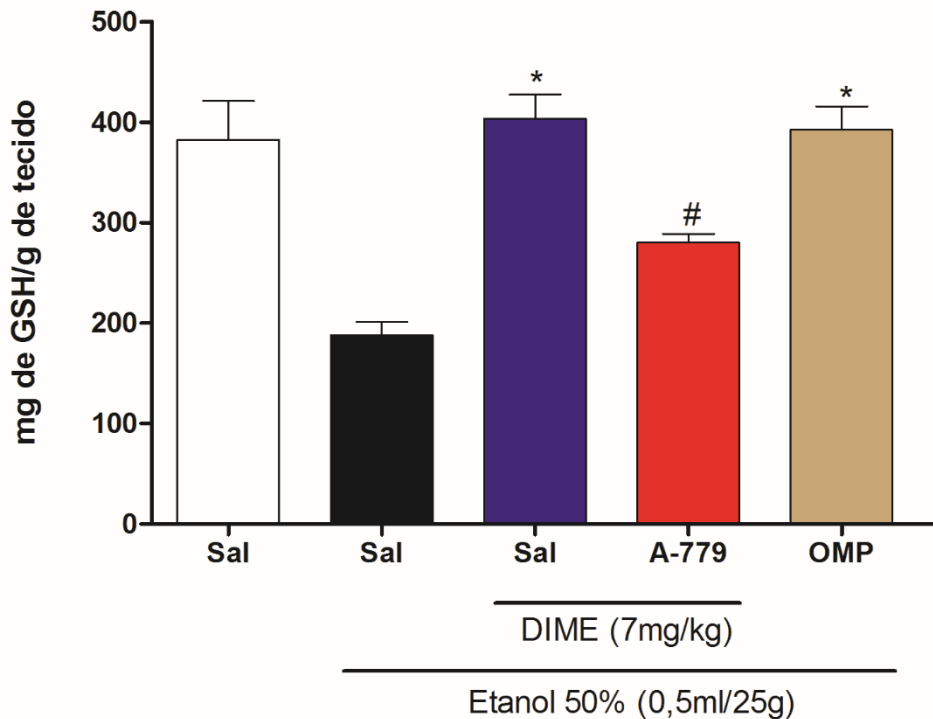


Figura 11: Efeito do DIME em níveis de glutathiona reduzida (GSH) em camundongos *swiss* com lesão gástrica induzida por etanol. Os animais foram pré-tratados por via oral com salina (controle), com DIME (7mg/kg), ou com A-779 (5mg/kg) que foi administrado via i.p, meia hora antes do pré-tratamento com DIME. Após 1 h, foi administrado por via oral etanol 50% (0,5ml/25g). Os resultados são expressos como a média \pm SEM de 5-7 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Newman-Keuls. Diferenças significativas: * $P < 0,0005$ quando comparado ao grupo controle positivo (etanol); # $P < 0,005$ quando comparado ao grupo pré-tratado somente com DIME.

Na figura 12 pode-se observar que a administração de etanol 50% provocou um aumento nos níveis de MDA na mucosa gástrica quando comparado ao grupo controle negativo (salina), indicando que ocorreu peroxidação de lipídios por espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas pelo o etanol ($P < 0,005$). Porém, quando os animais foram pré-tratados com DIME (7mg/kg) ocorreu uma redução significativa dos níveis de MDA quando comparado ao grupo que recebeu somente etanol 50% ($P < 0,005$). Por outro lado, quando foi administrado A-779 (5mg/kg), os níveis de MDA se elevaram quando comparado ao grupo que só foi pré-tratado somente com DIME ($P < 0,0005$), comprovando um aumento significativo da peroxidação lipídica. Quando utilizou omeprazol como pré-tratamento dos animais, os níveis de MDA ficaram semelhantes aos níveis do grupo lesivo (etanol).

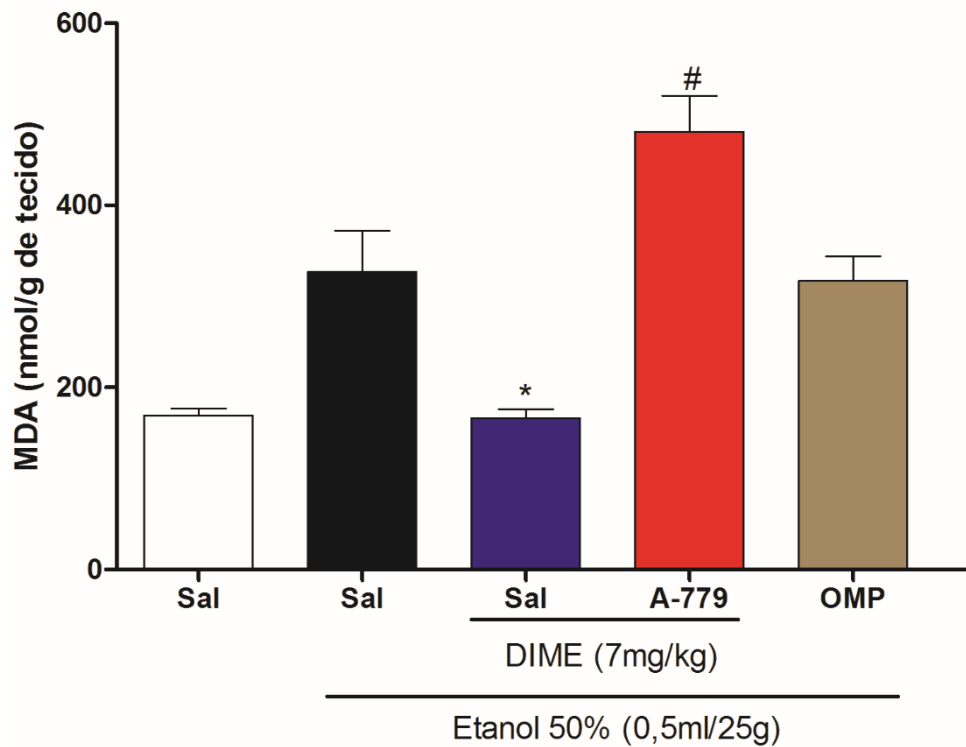


Figura 12: Efeito do DIME em níveis de malondialdeído (MDA) em camundongos *swiss* com lesão gástrica induzida por etanol. Os animais foram pré-tratados por via oral com salina (controle), com DIME (7mg/kg), ou com A-779 (5mg/kg) que foi administrado via i.p, meia hora antes do pré-tratamento com DIME. Após 1 h, foi administrado por via oral etanol 50% (0,5ml/25g). Os resultados são expressos como a média \pm SEM de 5-7 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Newman-Keuls. Diferenças significativas: * $P < 0,005$ quando comparado ao grupo controle positivo (etanol); # $P < 0,0005$ quando comparado ao grupo pré-tratado somente com DIME.

5.4 Efeito do DIME em lesões gástricas induzidas por ácido acético em camundongos *swiss*

Nas lesões induzidas por ácido acético 40%, os resultados foram: O grupo que não foi administrado ácido acético (grupo controle) não apresentou ulcerações; No entanto, o grupo que foi administrado ácido acético e não teve tratamento, a área de ulceração foi bem evidente ($31,94 \pm 4,95$) com pouca ou ausente área de cicatrização; O grupo que foi tratado com DIME (7mg/Kg) a área de cicatrização da úlcera gástrica foi bem mais acentuada quando comparado ao grupo lesivo (ácido acético) ($11,54 \pm 1,96$). Porém quando foi administrado o A-779 nos animais esse efeito cicatrizante do DIME foi revertido ($89,51 \pm 2,27$). O grupo que foi tratado somente com A-779 também apresentou uma área de cicatrização mínima ($41,93 \pm 14,17$). O grupo que foi tratado com omeprazol obteve uma área de cicatrização bem significativa quando comparado ao grupo lesivo ($16,16 \pm 2,86$). Esses resultados

demonstram a eficácia do DIME como agente cicatrizante em lesões crônicas induzidas por ácido acético (Figura 13 de A-G).

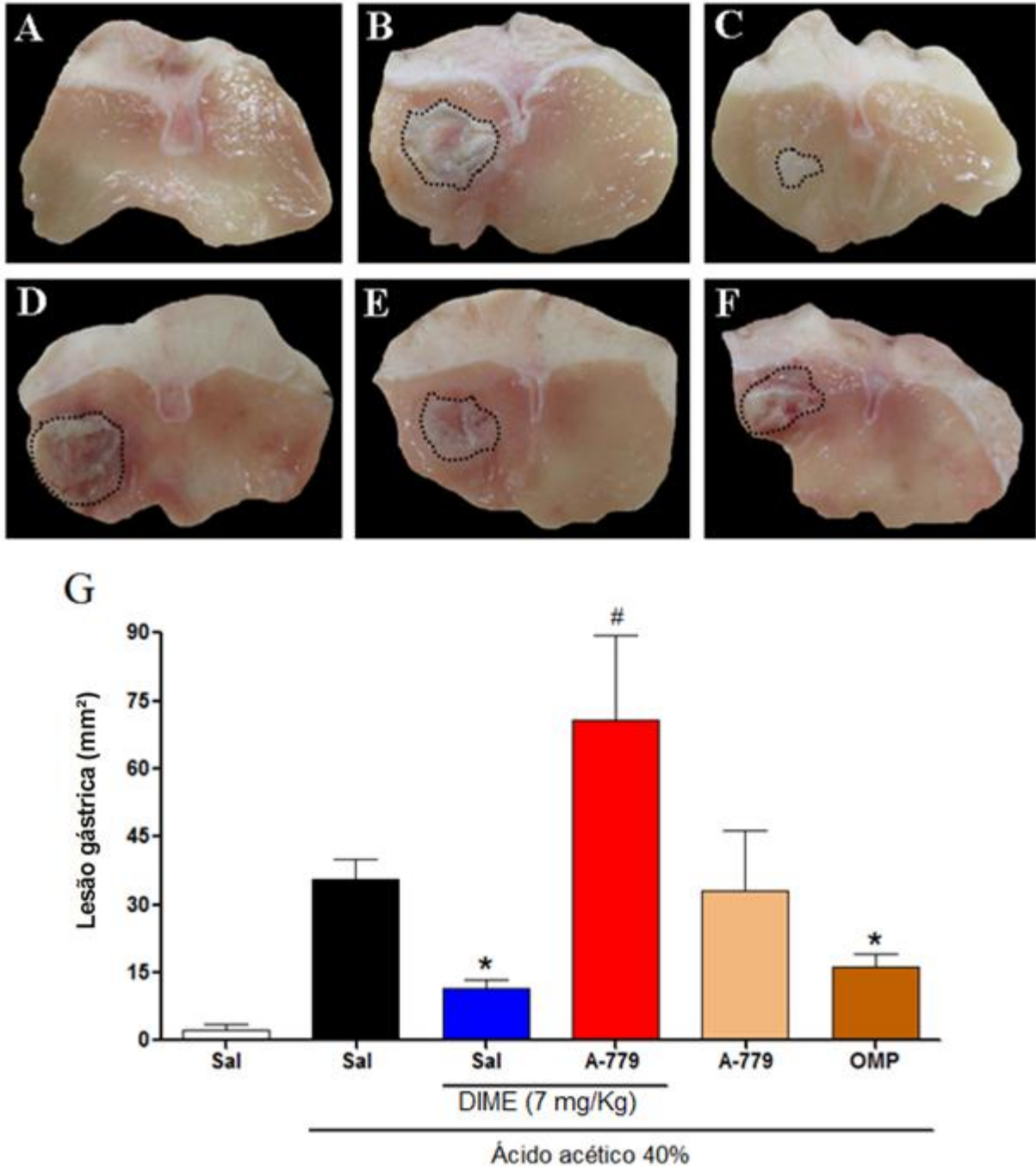


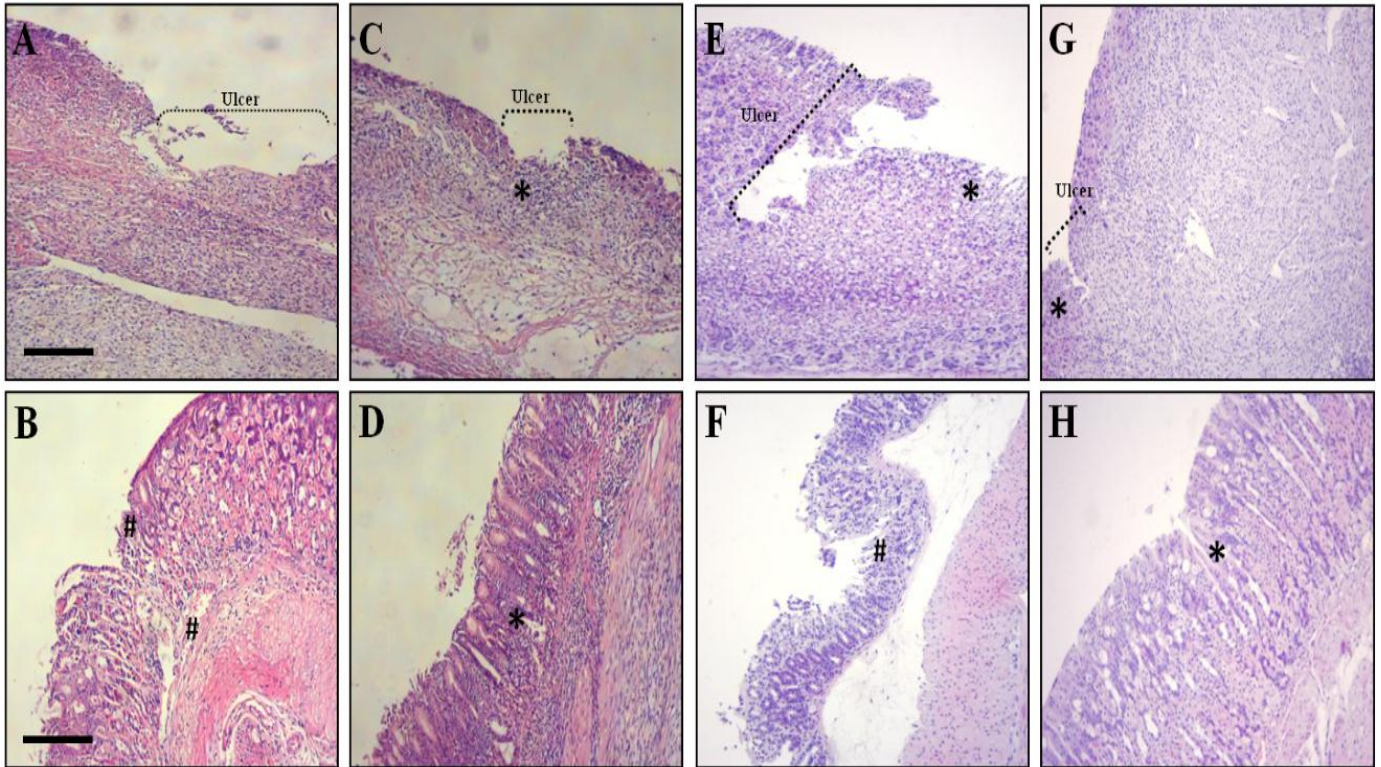
Figura 13: Efeito do DIME em lesões gástricas induzidas por ácido acético em camundongos swiss, papel da via ECA II/Ang(1-7)/MAS. No painel A, tem-se o grupo controle (salina) que não recebeu a administração de ácido acético. No painel B, tem-se o controle positivo (ácido acético), no qual apresentou uma úlcera severa, com pouca presença de regeneração e cicatrização tecidual. No painel C, tem-se o grupo que foi tratado com DIME, no qual teve uma evidente regeneração e cicatrização da área lesada pelo o ácido acético. No painel D, tem-se o grupo com o antagonista seletivo para o receptor MAS (A-779), no qual reverteu o efeito gastroprotetor do DIME, apresentando uma úlcera gástrica acentuada. No painel E, tem-se o grupo que foi administrado somente o A-779, no qual apresentou pouca de cicatrização da úlcera gástrica. No painel F, tem-se o grupo que foi

tratado com a droga padrão (omeprazol), no qual apresentou efeitos cicatrizantes quando comparado o grupo lesivo (ácido acético). O grupo de animais que recebeu a administração do antagonista A-779 reverteu o efeito gastroprotetor do DIME. Os dados são apresentados como média \pm SEM, com $n = 5-7$ animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Newman-Keuls, Diferenças significativas: * $P < 0,0005$ quando comparado ao grupo lesivo (ácido acético); # $P < 0,0005$ quando comparado ao grupo que foi tratado com DIME (Sem o antagonista).

5.5 Análise da Área de Regeneração e Reepitelização nas Lesões Gástricas Induzidas por Ácido Acético em Camundongos *swiss*

Quando se analisou a área de regeneração e reepitelização do DIME nas lesões gástricas induzidas por ácido acético 40%, pode-se observar que o grupo que recebeu somente o ácido acético apresentou, na análise histológica, uma pequena área de regeneração e reepitelização (78.93 ± 16.65), ou seja, obteve um efeito cicatrizante mínimo. Isto foi comprovado tanto na análise da área da serosa, como a parte da mucosa. No entanto, quando os animais foram tratados com DIME, a área da lesão diminuiu de forma significativa, o efeito cicatrizante foi elevado quando comparado ao grupo lesivo (156.08 ± 25.32), apresentando um raio de cura de aproximadamente 98%. Além disso, é possível observar que tanto na área da serosa como na parte da mucosa que o DIME promoveu uma significativa regeneração e cicatrização. Quando os animais foram tratados com o antagonista seletivo do receptor MAS, esse efeito cicatrizante do DIME foi revertido (65.24 ± 10.73). Os animais tratados com omeprazol tiveram uma elevada área de regeneração (142.16 ± 10.23), com um raio de cura de aproximadamente 80% (Figura 14, Tabela 1).

Lado da Serosa



Lado da Mucosa

Figura 14: Análise histopatológica das lesões induzidas por ácido acético.

* Área de reorganização e reepitelização na borda da lesão (100x). Barra de escala = 50 μ m.

Área de desorganização glandular, com úlcera na superfície da mucosa e infiltrado neutrofílico (100x).

Tabela 1: Análise Histopatológica das lesões gástricas induzidas por ácido acético.

Tratamentos	Análise Histológica	
	Área de Regeneração (μ m)	Raio de Cicatrização (%)
Ácido Acético (AA)	78.93 \pm 16.65	—
AA + DIME	156.08 \pm 25.32*	97.74
AA + A-779 +DIME	65.24 \pm 10.73 [#]	—
AA + Omeprazol	142.16 \pm 10.23*	80.10

O DIME apresentou significativa área de regeneração e raio de cicatrização na lesão induzida pelo o ácido acético quando comparado ao grupo lesivo. No entanto, o grupo que foi administrado o A-779, esse efeito gastropotetor foi revertido, quando comparado ao grupo que foi tratado somente com o DIME. No grupo que foi tratado com omeprazol a área de regeneração e o raio de cura foram significativamente expressivos quando comparado ao grupo lesivo. Os dados são apresentados como média \pm SEM, com n = 5-7 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Dunnett. Diferenças significativas: * P<0,0005 quando comparado ao grupo lesivo (ácido acético); [#] P<0,0005 quando comparado ao grupo que foi tratado com DIME (Sem o antagonista).

5.6 Determinação dos níveis de Colágeno

Os resultados obtidos para a determinação de Colágeno em lesões gástricas por ácido acético demonstraram que: o grupo controle negativo apresenta, logo abaixo da lâmina basal, uma vasta camada de colágeno Tipo I (caracterizado pela coloração avermelhada); no entanto, quando foi administrado somente ácido acético nos animais, a determinação dos níveis de colágeno reduziu de forma significativa. Nos grupos que foram tratados com DIME os níveis de colágeno Tipo I se elevaram quando comparado ao grupo lesivo (ácido acético); os animais que foram tratados com o antagonista A-779 diminuíram de forma significativa os níveis de colágeno Tipo I, quando comparado ao grupo tratado com DIME, e, além disso, apresentaram uma elevação dos níveis de colágeno Tipo III (caracterizado pela a cor verde), um tipo de colágeno imaturo que possui fibras menos rígidas que as do colágeno Tipo I (Figura 15).

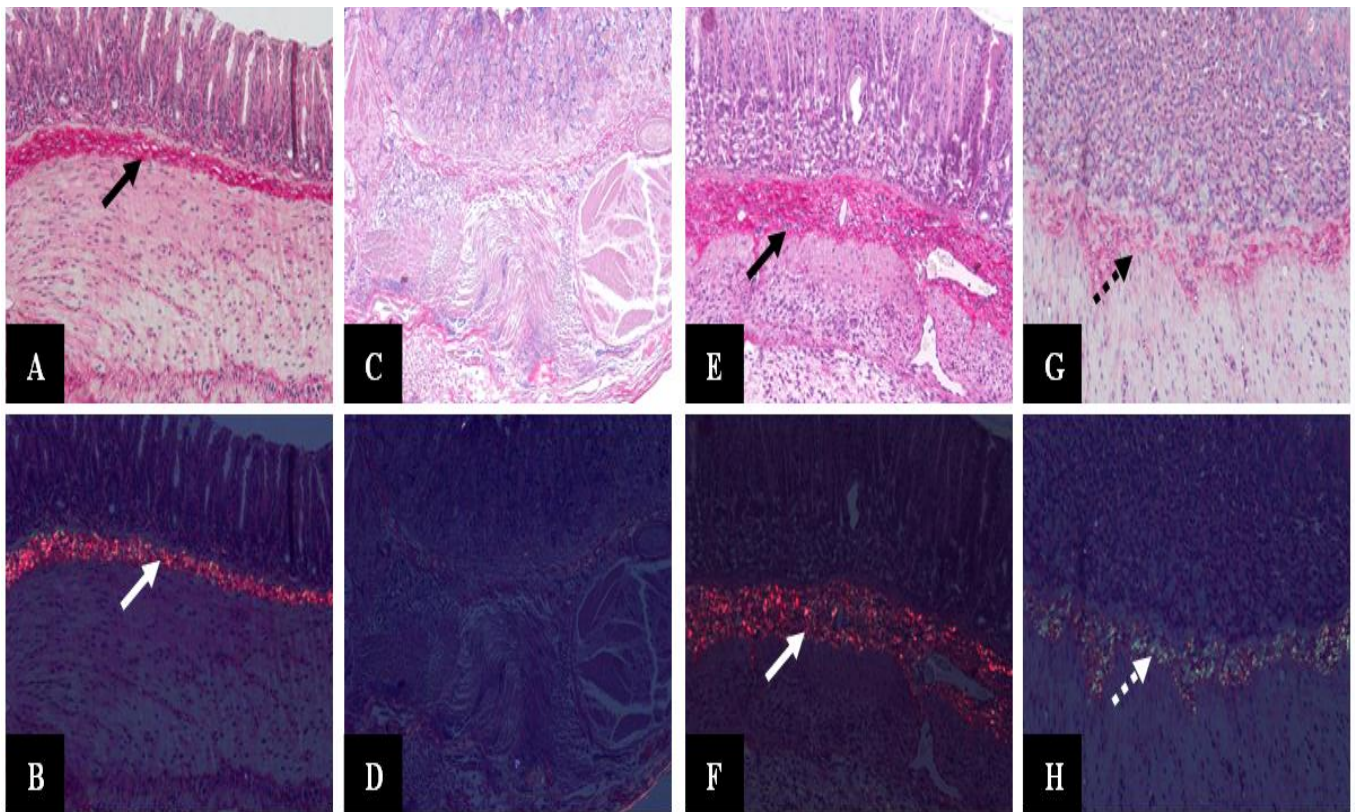


Figura 15: O DIME elevou os níveis de colágeno Tipo I em lesões gástricas induzidas por ácido acético. Na primeira linha têm-se as amostras visualizadas em luz natural e a segunda linha têm-se as amostras analisadas em luz polarizada. O grupo salina (controle negativo) está representado nos painéis A e B, notar a presença de uma vasta camada de colágeno Tipo I (seta inteira); O grupo lesivo (controle positivo) está representando nos painéis C e D; em E e F os animais que foram tratado com DIME, notar a reposição dos níveis de colágeno Tipo I (seta corrida); em G e F têm-se o grupo que foi administrado o antagonista A-779, notar uma menor determinação dos níveis de colágeno Tipo I e uma elevada presença de colágeno do Tipo III (seta pontilhada).

5.7 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

Os resultados obtidos na atividade de mieloperoxidase (MPO) foram: O grupo lesivo (ácido acético) aumentou a infiltração neutrofílica, e, por consequência disso, os níveis de MPO foram mais elevados quando comparado ao grupo controle negativo ($30,92 \pm 4,84$); No entanto, quando os animais foram tratados com DIME os níveis de MPO reduziram de forma significativa ($2,33 \pm 1,72$); os animais que foram tratados com o antagonista A-779, esse efeito do DIME foi revertido, e os níveis de MPO se apresentaram de forma elevada ($12,82 \pm 2,96$); assim como o grupo que foi tratado somente com o A-779 ($14,91 \pm 2,50$). O grupo que foi tratado com omeprazol reduziram de forma significativa os níveis de MPO quando comparado ao grupo lesivo ($1,87 \pm 0,65$) (Figura 16).

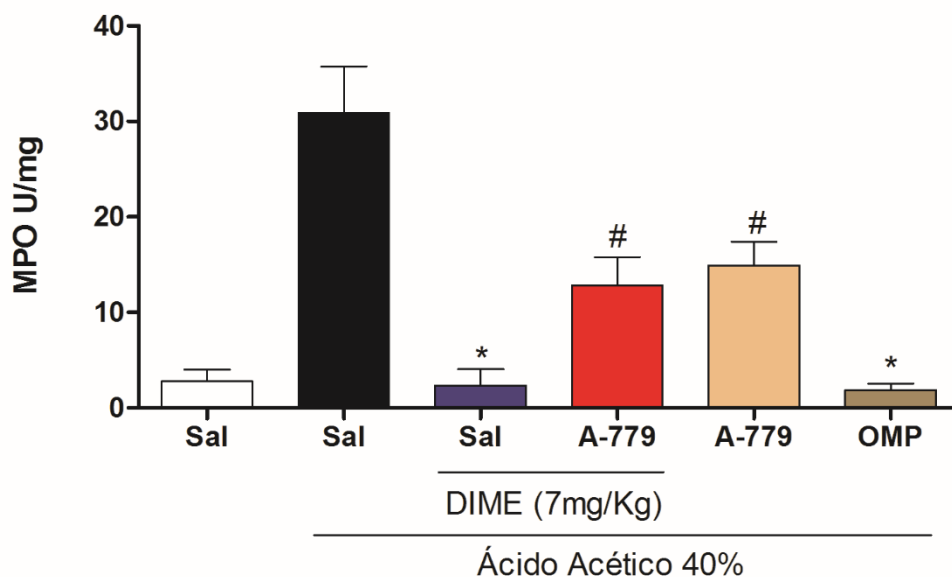


Figura 16: Efeito do DIME no ensaio de atividade de Mieloperoxidase (MPO) em lesões gástricas induzidas por ácido acético em camundongos *swiss*. Os animais foram tratados a partir do 2º dia até o 7º dia após a lesão. Os grupos foram tratados com: Salina; DIME (7mg/Kg), A-779 (5mg/Kg) + DIME (7mg/Kg); A-779 (5mg/Kg); e OMP (10mg/Kg). O antagonista A-779 foi administrado (via *i.p.*) 30 minutos antes dos tratamentos. O grupo controle não recebeu a administração de ácido acético e foi tratado somente com salina. Os resultados são expressos como a média ± SEM de 5-7 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Newman-Keuls. Diferenças significativas: * P < 0,0005 quando comparado ao grupo controle positivo (etanol); # P < 0,05 quando comparado ao grupo tratado somente com DIME.

5.8 Dosagens de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-10)

Os resultados obtidos nas dosagens de citocinas inflamatórias demonstraram que o grupo que foi induzido à lesão gástrica com ácido acético apresentaram níveis significativamente elevados de citocinas pró-inflamatórias, tanto TNF- α (1911.0 ± 314.4) como a IL- 6 (14.8 ± 3.1), quando comparados ao grupo salina (851.4 ± 68.02 ; 6.3 ± 1.6 , respectivamente); no entanto, os níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, diminuíram de forma significativa no grupo controle positivo (94.5 ± 19.3), quando comparado ao grupo salina (226.8 ± 33.6). Os animais que foram tratados com DIME apresentaram uma diminuição significativa nas citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 (971.5 ± 47.97 ; 7.2 ± 0.5 , respectivamente), quando comparado ao grupo lesivo; O DIME não apresentou diferença estatística nos níveis de IL-10 quando comparado ao grupo controle positivo (94.5 ± 19.3). No grupo que foi tratado com omeprazol os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 também reduziram de forma significativa (869.4 ± 84.94 ; 6.1 ± 2.1 , respectivamente), quando comparados ao grupo lesivo; no entanto, os níveis de IL-10 não apresentaram diferença estatística do grupo controle positivo (114.7 ± 36.4) (Tabela 2).

Tabela 2: Dosagens de citocinas inflamatórias

Tratamentos	Análise de citocinas inflamatórias		
	TNF- α	IL-6	IL-10
Salina	851.4 ± 68.02	6.3 ± 1.6	226.8 ± 33.6
Ácido Acético (AA)	$1911.0 \pm 314.4^*$	$14.8 \pm 3.1^*$	$94.5 \pm 19.3^*$
DIME + AA	$971.5 \pm 47.97^\#$	$7.2 \pm 0.5^\#$	95.8 ± 9.2
OMP + AA	$869.4 \pm 84.94^\#$	$6.1 \pm 2.1^\#$	114.7 ± 36.4

Resultados expressos com média \pm SEM. Diferenças estatísticas: * quando comparado ao grupo salina; # quando comparado ao grupo controle positivo (ácido acético). Utilizou-se ANOVA seguida do teste Newman-Keuls.

5.9 Avaliação dos níveis do peptídeo Ang(1-7) em modelos de lesão gástrica em camundongos *swiss*

Foram analisados os níveis do peptídeo ativo Ang(1-7) nas lesões induzidas tanto pelo etanol (lesão aguda) como nas lesões induzidas pelo o ácido acético (lesão crônica). Os resultados estão expressos na figura 17 (A e B). Na figura 16 (A) os resultados demonstraram que o etanol elevou os níveis de Ang(1-7) quando comparado ao grupo controle (salina) ($P < 0,05$). No entanto, quando os animais foram pré-tratados com DIME (7mg/Kg), os níveis de Ang(1-7) se elevaram ainda mais quando comparado ao grupo lesivo (etanol) ($P < 0,0005$). Na figura 16 (B) os resultados demonstram que os níveis de Ang(1-7) não tiveram diferença estatística do grupo salina. Porém no tratamento com o DIME os níveis se elevaram de forma considerável quando comparado ao grupo lesivo (ácido acético) ($P < 0,0005$).

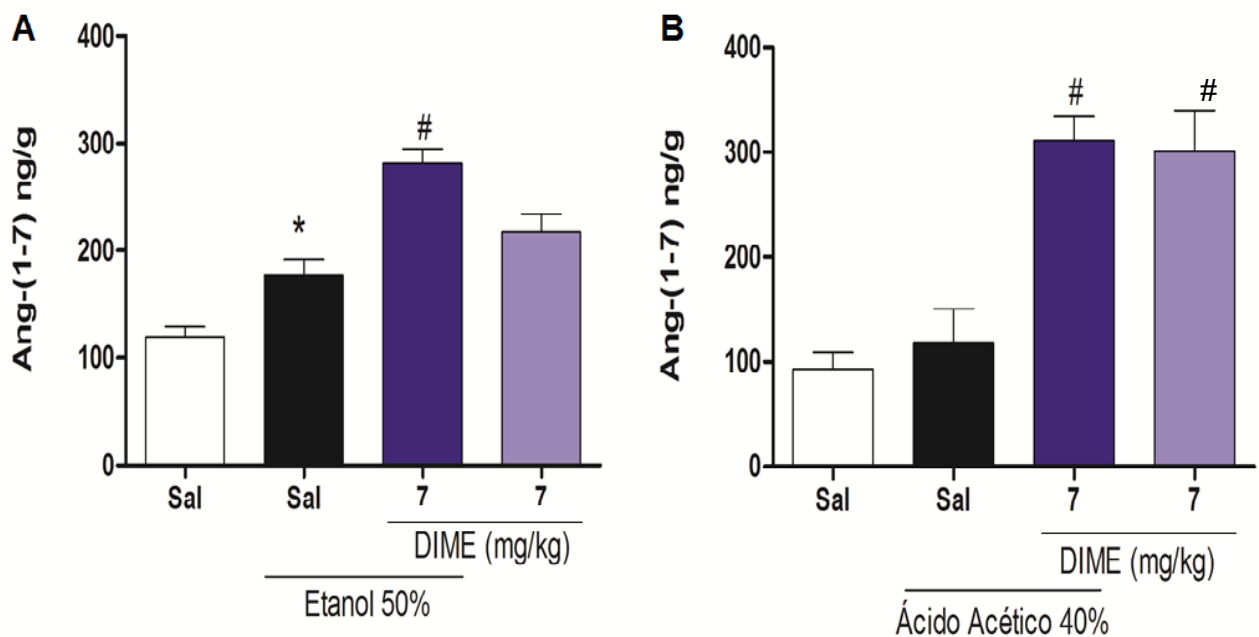


Figura 17: Avaliação dos níveis do peptídeo Ang(1-7) em modelos de lesão gástrica em camundongos *swiss*. No painel A, os animais foram pré-tratados com salina, ou com DIME (7mg/Kg). Uma hora depois foi administrado etanol 50% (0,5ml/25g). O grupo controle recebeu somente salina. O grupo lesivo (etanol) elevou os níveis de Ang(1-7) quando comparado ao grupo salina. No entanto, o grupo que foi pré-tratado com DIME elevaram de forma significativa os níveis de Ang(1-7) quando comparado ao grupo etanol. No painel B, os animais foram submetidos a lesão gástrica pela administração de ácido acético 40% (100µL/1min), os tratamentos foram realizados a partir do 2º ao 7º dia após a indução da lesão. Os animais foram tratados com salina, ou com DIME. O grupo controle recebeu somente salina. O grupo lesivo (ácido acético) não elevou os níveis de Ang(1-7) não apresentando significância estatística quando comparado ao grupo salina. No entanto, os grupos tratados com DIME elevaram de forma significativa os níveis de Ang(1-7). Os resultados são expressos como a média \pm SEM de 5-7 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Newman-Keuls. Diferenças significativas: * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo (salina); # $P < 0,0005$ quando comparado ao grupo lesivo (etanol ou ácido acético).

6. Imunohistoquímica para o Receptor MAS na mucosa gástrica de camundongos *swiss*

Na figura 18 pode-se observar que nos animais que foram tratados somente com salina houve imunomarcção para o receptor MAS na parte da mucosa, especialmente nas células epiteliais (seta, painel A). No entanto, quando os animais foram tratados com ácido acético 40%, a marcação para o Receptor MAS foi bem menor quando comparado ao grupo salina (painel B). Diferentemente dos animais que foram tratados com DIME, que apresentaram imunomarcção para o Receptor MAS na mucosa gástrica (seta, painel C).

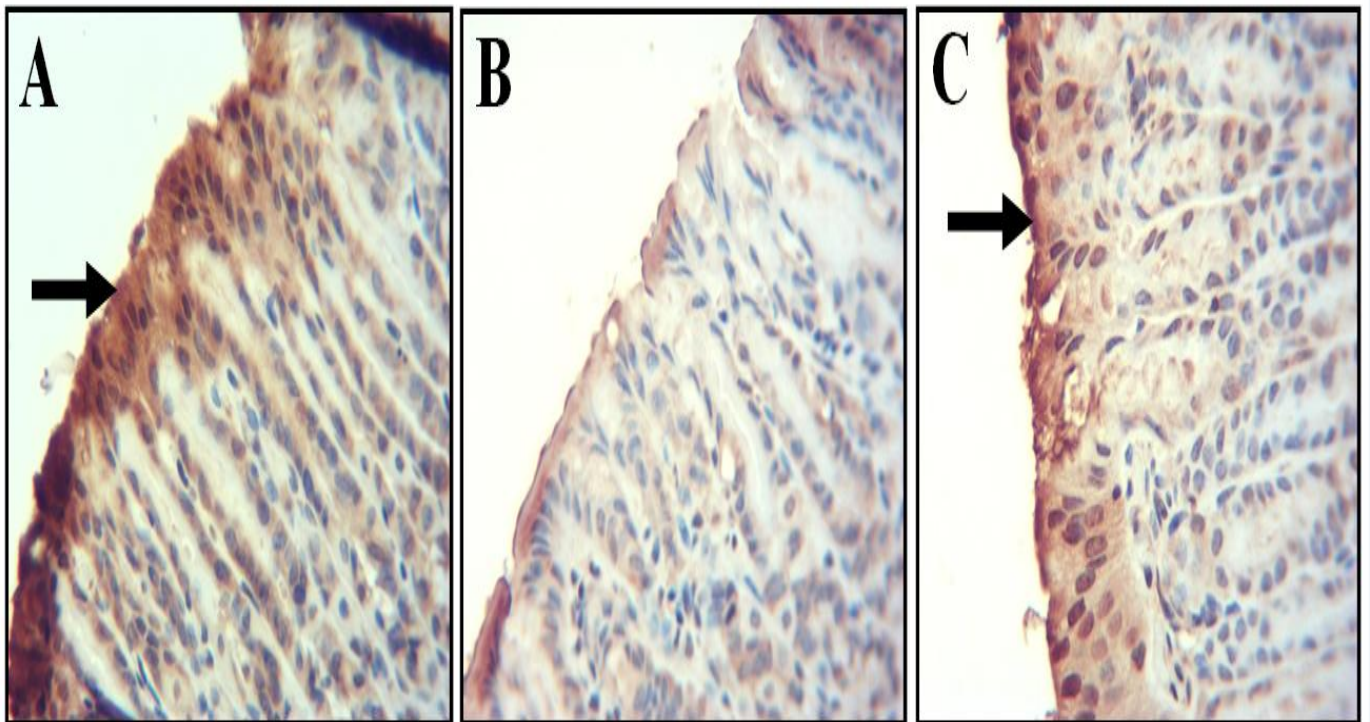


Figura 18: Imunohistoquímica para o Receptor MAS na mucosa gástrica de camundongos *swiss*. Imunomarcção para o Receptor MAS no estômago dos animais tratados somente com salina (painel A); ou tratado com ácido acético 40% (painel B); ou tratado com DIME (painel C). As setas estão indicando marcação na parte da mucosa gástrica. (Aumento de 400x).

6.1 Avaliação dos Níveis de Muco Gástrico

Os níveis de muco gástrico também foram avaliados no referido trabalho (Figura 19). Os resultados observados foram: o grupo lesivo (etanol) diminuiu de forma significativa os níveis de muco quando comparado ao grupo controle (salina) ($27,96 \pm 4,17$); No entanto, quando os animais foram tratados com DIME (7mg/Kg), os níveis de muco se elevaram de forma significativa quando comparado ao grupo lesivo ($58,97 \pm 3,35$); Porém quando os animais foram tratados com o antagonista A-779, os níveis de muco diminuíram de forma significativa quando comparado ao grupo que foi tratado somente com o DIME ($40,04 \pm 4,19$).

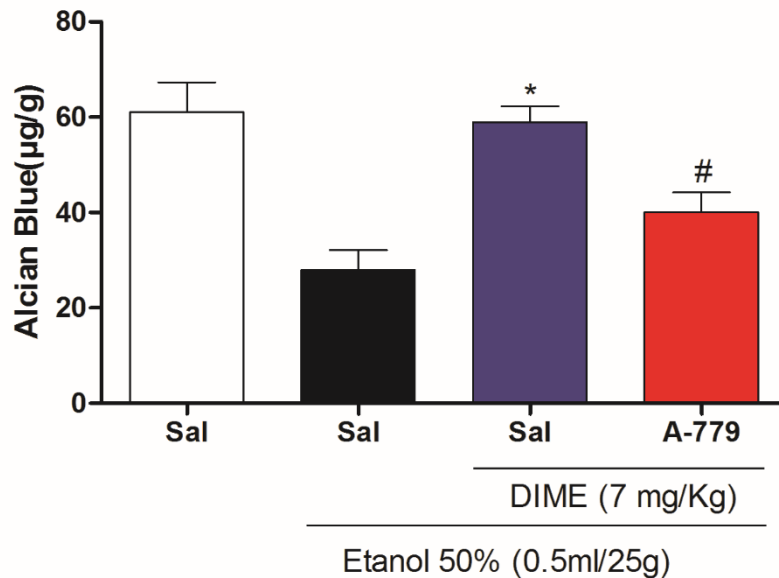


Figura 19: Efeito do pré-tratamento com DIME na gastroproteção por avaliação dos níveis de muco nas lesões gástricas induzidas por etanol 50%. Os animais foram pré-tratados por via oral com salina ou DIME (7 mg/Kg), depois de uma hora foi administrado etanol. Para a avaliação do papel da via ECA II/Ang(1-7)/MAS, foi administrado via *i.p.* o antagonista A-779 (5mg/Kg) no grupo A-779 + DIME. O grupo controle foi administrado apenas solução salina. Os resultados são expressos como a média \pm SEM com 5-7 animais por grupo. Diferenças estatísticas: * $P < 0,005$ quando comparado com o grupo lesivo (ácido acético); # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo que foi tratado somente com o DIME. Foi utilizado os testes de ANOVA seguido de Newman-Keuls.

6.2 Avaliação da Secreção Gástrica

Na tabela 3 observa-se o tratamento com DIME (7mg/Kg) em camundongos após 4 horas de ligadura do piloro. O pH gástrico, o volume gástrico e a acidez total não alteraram quando comparados ao grupo controle negativo (salina) Quando os animais foram pré-tratados com omeprazol, o pH gástrico, o volume gástrico e a acidez total também não apresentaram diferença estatística quando comparado ao grupo controle negativo.

Tabela 3: Avaliação da secreção gástrica em camundongos *swiss*.

Grupo Experimental (N=6)	pH	Volume (μ L)	Total de acidez (mEq[H ⁺]/1/4h)
Salina	5.60 \pm 0.24	0.01 \pm 0.003	145.0 \pm 22.17
DIME	5.33 \pm 0.33*	0.01 \pm 0.001*	118.0 \pm 14.28
OMP	5.66 \pm 0.21*	0.01 \pm 0.001*	160.0 \pm 14.14

Tabela 3: Resultados expressos com média \pm SEM. Utilizou-se ANOVA seguida do teste Newman-Keuls.

7. DISCUSSÃO

O Aceturato de Diminazeno ($C_{14}H_{15}N_{7.2}C_4H_7NO_3$) é uma diamidina aromática que foi desenvolvida há mais de seis décadas e tem sido comercializada até hoje para o controle da tripanossomíase. Nos últimos anos, no entanto, este composto tripanossomicida tem sido extensivamente estudado no que diz respeito ao seu potencial terapêutico e, conseqüentemente, tem atraído muito interesse para o desenvolvimento de novas pesquisas (OLIVEIRA; FREITAS, 2015). Dessa forma, despertou-se o interesse em trabalhar com tal composto em modelos de lesões gástricas, tanto na forma de pré-tratamento, como na forma de tratamento promovendo reepitelização e regeneração tecidual. O presente estudo é pioneiro na utilização do Aceturato de Diminazeno na proteção gástrica.

Para a avaliação de uma possível gastroproteção por DIME, utilizou-se primeiramente um modelo experimental que utiliza etanol 50% para promover úlceras gástricas. O modelo de lesão gástrica induzida por etanol é um dos principais modelos de lesão gástrica em pesquisas. Tal modelo pode provocar lesões por solubilização do muco protetor e desta forma a mucosa acaba perdendo uma das suas principais barreiras de defesa contra agentes lesivos, ficando por consequência indefesa à ação hidrolítica e proteolítica do ácido clorídrico e da pepsina, respectivamente. Além disso, o contato direto do etanol na mucosa gástrica leva ao aumento da secreção ácida, bem com a alteração do fluxo sanguíneo gástrico, modificando a rede vascular local com rompimento de vasos sanguíneos que irrigam essa mucosa (lesão hemorrágica, característica desse modelo) (OATES; HAKKINEN, 1988). O etanol pode promover a depleção de grupos sulfidrilas, além de promover a peroxidação lipídica com elevação excessiva dos níveis de malondialdeído (JORDÃO JÚNIOR et al, 2009).

Os resultados obtidos no referido estudo, confirmam que a administração de etanol 50% induz uma severa lesão gástrica hemorrágica. É bem explanado na literatura que a administração de etanol em elevadas concentrações causam extensas lesões na mucosa gástrica, envolvendo, principalmente, hemorragias e destruição tecidual (BHANDARE et al, 1990). Além disso, o etanol é capaz de induzir distúrbios na microcirculação, isquemia, liberação de endotelina, degranulação de mastócitos, inibição de prostaglandinas e diminuição da camada de

muco gástrico (SAMONINA et al, 2004). Fisiopatologicamente, as úlceras gástricas oriundas da administração do etanol são mediadas ou moduladas por diversos fatores tais como: a cicloxigenase; lipoxigenase; citocinas; tromboxanos; e espécies reativas de oxigênio (MEDEIROS, 2009; TARNAWISKI, 1998).

Na análise macroscópica, nosso trabalho demonstrou que o etanol 50% promoveu ulcerações. No entanto, os grupos que foram administrados DIME, por via oral, reverteram de forma significativa às lesões gástricas. Tal feito foi observado em todas as doses, porém a dose de 7mg/kg foi escolhida como melhor dose por ter apresentado melhores resultados em uma menor concentração (Figura 7).

Na análise microscópica (Figura 8), o presente trabalho demonstrou que o etanol 50% provocou hemorragia, edema e perda de células epiteliais. Esses resultados corroboram com os descritos por outros autores que mostram que o etanol provoca, histologicamente, hemorragias subepiteliais na mucosa gástrica e que esses efeitos são geralmente atribuídos diretamente a sua ação tóxica ou indiretamente causados por mediadores como COX, citocinas, ROS e outras moléculas de sinalização provocando inflamação, morte celular ou redução considerável do fluxo sanguíneo gástrico (LEE et al, 2005). Outros fatores são associados aos danos provocados pelo o etanol na mucosa gástrica como a ativação de NF-kB que são eventos críticos responsáveis pela hemorragia e edema nas células musculares lisas e endoteliais (MEDEIROS, 2009; ALTURA GEBREWOLD, 2002; JONSSON; PALMBLAD, 2001). Diferentemente do trabalho de Medeiros (2009) que demonstrou que na lesão por etanol não envolve a migração neutrofílica, o presente estudo apresentou migração de células inflamatórias para a mucosa gástrica corroborando com o que foi demonstrado por Lee e colaboradores (2005) e Lieber (1997), onde eles mencionaram que a administração de etanol aumenta a resposta inflamatória juntamente com a infiltração de células inflamatórias para a mucosa gástrica. Os grupos que foram tratados com DIME foram capazes de reverter todos os escores histológicos avaliados, demonstrando que esse composto minimiza os agravos oriundos do etanol na mucosa gástrica. Tal feito se dá pela a diminuição de pontos hemorrágicos, bem como a diminuição da na formação do edema e infiltração neutrofílica, e, além disso, é responsável também por atenuar a perde de células epiteliais, garantindo assim uma considerável melhora histológica. Ko e colaboradores (1997) afirmam que a proteção histológica

e a proteção da integridade vascular são uns dos principais critérios de gastroproteção.

O próximo passo do trabalho foi avaliar a participação do peptídeo ativo Ang (1-7) ligando-se ao receptor MAS, e vendo se esta ligação estaria relacionada a gastroproteção promovida pelo o DIME. Pesquisas recentes têm demonstrado que o DIME é um ativador da Enzima Conversora de Angiotensina II (ECAII), que é responsável por promover a conversão da Angiotensina II em Angiotensina (1-7), que por sua vez irá se ligar a um receptor acoplado a proteína G, o receptor MAS (FERREIRA; BADER; SANTOS, 2012). Tal via ativada pelo DIME, ECAII/Ang(1-7)/Receptor MAS, já foi descrita na literatura com alguns resultados positivos em determinadas atividades biológicas, tais como: hipertensão pulmonar (SHENOY et al, 2013); infarto agudo do miocárdio (QI et al, 2013); uveítes (QIU et al, 2014); acidente vascular encefálico isquêmico (MECCA et al, 2011); hiperglicemia (COUTINHO et al, 2014); disfunção erétil (SILVA et al, 2015); desordem metabólica (MACÊDO et al, 2015); e aneurisma da aorta abdominal (THATCHER et al, 2014). O efeito benéfico promovido pelo o DIME em boa parte desses estudos foi revertido quando utilizado o antagonista seletivo para o receptor MAS, o A-779. O presente estudo demonstrou que a proteção garantida pelo o DIME no modelo de lesão gástrica por etanol 50%, foi revertido de forma significativa quando administrado A-779 nos animais, demonstrando com esse resultado que a proteção garantida pelo o DIME se dá pela a ligação do peptídeo Ang (1-7) ao receptor MAS (Figura 9).

As espécies reativas de oxigênio coexistem em equilíbrio com moléculas antioxidantes nas células. O aumento dos níveis intracelulares de ROS, a diminuição das defesas antioxidantes, ou ambos é denominado estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ser impedido por defesas antioxidantes enzimáticas e químicas. As enzimas que promovem a primeira linha de defesa contra superóxido e peróxido de hidrogênio são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e as glutations (MAYER, 2007). Dessa forma, os grupos sulfidrilas foram também avaliados no presente estudo, em especial o mais importante destes, a glutatona reduzida (GSH), tentando demonstrar que o DIME possui efeito gastroprotetor relacionado à diminuição do estado redox na gastropatia induzida pelo etanol (Figura 10). Sabe-se que o etanol é responsável por promover a depleção de grupos sulfidrilas, que são de fundamental importância para eliminar as espécies reativas de oxigênio do organismo. No estudo em questão, a administração de etanol 50% diminuiu

consideravelmente o nível gástrico de glutathione reduzida, provavelmente devido à depleção destes pelos radicais livres. Quando foi administrado DIME nos animais, a depleção de GSH foi diminuída, e os valores ficaram semelhantes ao grupo controle negativo, próximos à normalidade. Portanto, pode-se inferir que, em partes, a gastroproteção promovida pela administração de DIME se dá pela preservação dos níveis de GSH. É descrito na literatura que o GSH é um tripeptídeo (γ - L- Glu- L- Cys- Gly) com alta capacidade doadora de elétrons (alto potencial redox negativo) devido ao grupamento tiol (-SH) na porção cisteína, combinada com uma alta concentração intracelular, resultando em um alto poder redutor. Estas características justificam sua potente atividade antioxidante e sua propriedade de cofator enzimático, importantes para regulação da atividade celular (HADDAD; HARB, 2005). Além disso, o GSH é necessário para a conversão da prostaglandina H_2 em prostaglandina E_2 e D_2 (LU et al, 2000).

Além da análise de GSH, outro marcador relacionado à ação oxidativa no organismo foi avaliado, o malondialdeído (MDA). Os resultados obtidos no estudo em questão demonstrou que os níveis de MDA, produto da peroxidação lipídica, elevou-se de forma considerável nos grupos que foram administrados somente etanol 50%. No entanto, quando os animais foram pré-tratados com DIME, a peroxidação lipídica diminuiu com conseqüente diminuição na concentração de MDA, tal efeito foi abolido quando utilizado o antagonista seletivo para o receptor MAS, A-779. Sabe-se que, os produtos da peroxidação lipídica, como por exemplo, o MDA, podem ser utilizados como indicadores da ação dos radicais livres no organismo (RIO et al, 2005). Com isso, o mecanismo pelo qual o DIME exerce seu efeito gastroprotetor parece envolver a redução da peroxidação lipídica induzida pela administração de etanol.

Para avaliar o potencial cicatrizante do tratamento DIME, foi realizado o teste crônico de lesão gástrica por ácido acético. A administração de ácido acético 40% na superfície da serosa de estômagos de roedores resulta em úlceras muito semelhantes às observadas em humanos em termos de localização, severidade e cronicidade, bem como no que diz respeito ao processo de cicatrização (OKABE; PFEIFFER, 1972). Além disso, a úlcera gástrica induzida pelo ácido acético envolve alterações nos níveis de prostaglandinas, fatores de crescimento, óxido nítrico, citocinas e na quantidade de muco (KOBAYASHI et al., 2001). Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento dos animais por sete dias com

DIME reduziu significativamente a úlcera gástrica induzida por ácido acético quando comparado ao grupo controle positivo e ao grupo que recebeu o antagonista A-779 (Figura 12). A análise histológica também confirmou a ação gastroprotetora causada pelo o DIME, sendo observada significante regeneração da mucosa gástrica, reepitelização e uma área considerável de cicatrização (Figura 13, Tabela 1). A cicatrização é um processo complicado que envolve a migração de células inflamatórias, a síntese de tecido de granulação, a deposição de colágeno e de proteoglicanos e a maturação está associada com remodelação extensa (LOURDES et al, 2010).

Para comprovar a capacidade regenerativa tecidual promovida pelo o DIME foi realizada a determinação dos níveis de colágeno na mucosa gástrica de camundongos *swiss*. O colágeno é a proteína mais abundante do tecido em fase de cicatrização (HEALING, 2007). As várias diferenças na sua composição química determinam as suas funções biológicas. Foram descritas até o presente 19 isoformas (tipos) de colágeno, codificadas por um único gene. Os tipos de fibras colágenas do tecido conjuntivo são helicoidais, com sequência tripeptídica repetitiva composta de glicina-X-Y, sendo X representada pela prolina e Y pela hidroxiprolina. A rica presença de glicina e prolina são necessárias para que uma molécula madura de colágeno (Colágeno Tipo I) assuma a estrutura de tripla hélice. O colágeno desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade estrutural e a função do tecido (OBREGÓN; OLIVARES, 2012). A degradação do colágeno se inicia precocemente e é muito ativa durante o processo inflamatório. A sua digestão ocorre em ambiente extracelular e é mediada por colagenases específicas. A atividade das colagenases é controlada por citocinas liberadas principalmente por células inflamatórias, endoteliais, fibroblastos e queratinócitos. A formação da matriz extracelular é, pois, resultante de um balanço entre a deposição (síntese) e degradação de colágeno (HEALING, 2007). O resultado obtido no presente estudo demonstrou que o grupo controle negativo apresentou uma grande deposição de colágeno tipo I, também denominado de colágeno maduro (Figura 14). Já o grupo controle positivo teve uma perda significativa na deposição de colágeno, demonstrando uma ausência de regeneração e reorganização epitelial. Porém, o grupo tratado com DIME, reverteu o efeito promovido pela a lesão com ácido acético 40%, demonstrando uma deposição considerável de colágeno Tipo I. O grupo que foi administrado o antagonista apresentou deposição de colágeno, no entanto a

análise com auxílio da luz polarizada demonstrou a presença de fibras colágenas esverdeadas características de colágeno tipo III, ou também denominado de colágeno imaturo. Esse resultado demonstra que o DIME promoveu a deposição e amadurecimento das fibras de colágeno, vale ressaltar que o colágeno do tipo III possui pouca rigidez e pouca sustentabilidade, por isso é necessário sua maturação e transformação em colágeno tipo I. Esse resultado corrobora com o demonstrado por Junqueira e colaboradores (1982), onde eles mencionam que um tecido normal é formado por cerca de 90% colágeno tipo I e 10% colágeno tipo III, mas quando lesado, o tipo III é predominante na fase de granulação e sofrem remodelagem com o tempo, sendo substituídos ao longo do processo de reparo tecidual pelas fibras do tipo I.

A atividade de mieloperoxidase (MPO), além da dosagem de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-10) foram realizadas no presente trabalho para avaliar a capacidade anti-inflamatória do DIME nas lesões gástricas por ácido acético 40% (Figura 15, Tabela 2, respectivamente). A mieloperoxidase é uma enzima presente predominantemente nos neutrófilos e tem sido utilizado como marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios. Além disto, os neutrófilos também são indicativos de destruição tecidual. Os resultados obtidos demonstraram que o DIME diminuiu significativamente a atividade de mieloperoxidase na mucosa gástrica. Esse dado corrobora com o resultado obtido nas dosagens de citocinas pró-inflamatórias onde o DIME diminuiu significativamente os níveis de TNF- α e IL-6. Tais resultados demonstram que o DIME, pode, em partes promover gastroproteção por ações anti-inflamatórias no local da lesão. Os níveis de IL-10 não diferiram do grupo controle negativo.

Os níveis do peptídeo ativo Ang(1-7) foram analisados nos dois modelos de lesão gástrica (Figura 16). Os resultados obtidos demonstraram que os níveis de Ang (1-7) se elevaram de forma significativa no grupo controle positivo, quando comparado ao grupo salina. Esse resultado demonstra a tentativa do organismo em tentar recuperar a área lesada, buscando a homeostase. Como se trata de uma lesão aguda, os níveis de Ang (1-7) se elevaram tentando minimizar os efeitos provocados pela lesão ulcerativa. No entanto, quando se analisou os níveis de Ang (1-7) no modelo crônico por ácido acético, esse resultado foi diferente. Os níveis de Ang (1-7) não se elevaram no grupo controle negativo, demonstrando que o organismo não conseguiu manter por muito tempo os níveis desse peptídeo elevado,

ou então por conta dessa cronicidade a sua produção acabou sendo prejudicada. Vale a pena ressaltar ainda que os níveis de Ang (1-7) se elevaram de forma significativa nos grupos tratados com DIME em ambos os modelos de lesão.

Alguns parâmetros da fisiologia gástrica foram analisados, como a deposição de muco na mucosa gástrica e o volume de secreção gástrica (Figura 18, Tabela 3, respectivamente). Os resultados demonstraram o grupo que foi administrado etanol diminuiu consideravelmente os níveis de muco na mucosa gástrica. No entanto, quando os animais receberam DIME os níveis de muco se elevaram consideravelmente quando comparados ao controle positivo. A barreira mucoide gástrica desempenha um papel importante no mecanismo de defesa contra úlcera gástrica, pois forma um muco contínuo semelhante a um gel, essa superfície mucoide mantém um pH em torno de 6-7, protegendo a mucosa do meio ácido (pH 1-2) (ZAKARIA et al, 2014). A qualidade e quantidade da secreção do muco gástrico são os critérios mais importantes para a determinação do estado dessa barreira mucolítica na defesa das injúrias promovidas por ácido e ação da pepsina (RACHCHH & JAIN, 2008). Dessa forma, o DIME pode estar promovendo proteção gástrica também por proteger e manter a camada de muco. O DIME não apresentou nenhuma alteração nos parâmetros avaliados na secreção gástrica.

8. CONCLUSÃO

Mediante exposto no presente trabalho, o DIME apresentou gastroproteção em modelos de lesão gástrica por etanol e ácido acético. Essa proteção foi mediada pela a via ECA II/Ang (1-7)/Receptor MAS, no qual o DIME promoveu melhora na cicatrização e reepitelização da mucosa gástrica, por meio de ações antioxidantes, diminuição de infiltração neutrofílica e diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, o DIME foi capaz de promover a maturação de fibras de colágeno Tipo I, melhorando assim a cicatrização da úlcera gástrica, e mantendo a integridade da camada de muco aderido a mucosa gástrica. Notou-se que os níveis de Ang (1-7) se elevam na administração de DIME e que este peptídeo ativo se liga a um receptor específico, o receptor MAS. Infere-se ainda que a gastroproteção mediada por DIME foi revertida quando administrado o antagonista A-779. Dessa forma, acredita-se que, futuramente, o DIME possa ser utilizado como um possível alvo farmacológico no tratamento de úlceras gástricas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, A.; FLEMSTRO, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American J Phys**, v. 288, p. 1-19, 2005.

ALTURA, B. M.; GEBREWOLD, A. Inhibitor of nuclear factor-kappa B activation attenuates venular constriction, leukocyte rolling adhesion and micro vessel rupture induced by ethanol in intact rat brain microcirculation: relation to ethanol-induced brain injury. **Neurosci Lett**, v. 334, p. 21-24, 2002.

ANCHA, H.; OJEAS, H.; TEDESCO, D.; WARD, A.; HARTY, R. F. Somatostatin-induced gastric protection against ethanol: Involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow. **Regul Peptides**, v. 110, p. 107-113, 2003.

BAYIR, H. Reactive oxygen species. **Crit Car Med**, v. 33, p. 498-501, 2005.

BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytother Res**, v. 14, p. 581-591, 2000.

BREGONZIO, C.; ARMANDO, I.; ANDO, H.; JEZOVA, M.; BAIARDI, G.; SAAVEDRA J. M. Angiotensin II AT1 receptor blockade prevents gastric ulcers during cold-restraint stress. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1018, p. 351-5, 2004.

BRZOZOWSKI, T. Role of renin–angiotensin system and metabolites of angiotensin in the mechanism of gastric mucosal protection. **Current Opinion Pharmacol**, v. 19, p. 90-8, 2014.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. **Lipids**, v. 36, p. 1007-23, 2001.

CAMARA, P. R. S.; FERRAZ, G. J. N.; FRANCO-PENTEADO, C. F. Ablation of primary afferent neurons by neonatal capsaicin treatment reduces the susceptibility of the portal hypertensive gastric mucosa to ethanol-induced injury in cirrhotic rats. **E J Pharmacol**, v. 589, p. 245-250, 2008.

CAREY, R. M.; PADIA, S. H. Angiotensin AT₂ receptors: control of renal sodium excretion and blood pressure. **Trends Endocrinol Metab**, v. 19, p. 84-7, 2008.

CARVALHO, N. S.; et al. Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug Dev Res**, v. 76, p. 143-51, 2015.

CHAPPELL, M. C. Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure? **Hypertension**, v. 50, p. 596-9, 2007.

COUTINHO, D. C. O.; et al. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 improves cardiac electrical changes in ventricular repolarization in streptozotocin-induced hyperglycaemic rats. **Europace**, p. 1689–1696, 2014.

DAMASCENO, S. R. B.; et al. Role of the NO/K_{ATP} pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. **Rev Bras Farmacogn**, 2012.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

DONATINI, R. S.; et al. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v. 19, 2009.

FERREIRA, A. J.; BADER, M.; SANTOS, R. A. Therapeutic targeting of the angiotensin-converting enzyme 2/Angiotensin-(1-7)/Mas cascade in the renin–angiotensin system: a patent review. **Expert Opin Ther Pat**, v. 22, p. 567–574, 2012.

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

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 715-723, 1997.

HADDAD, J. J.; HARB, H.L. L-λ-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? **Molecular Immunol**, v. 42, p. 987–1014, 2005.

HEALING, W. Cicatrização de feridas. **ABCD**, v. 20, n. 1, 2007.

HOOGERWERF, W.; PASRICHA, P. J. **Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico**. Goodman & Gilman: 10. Ed. Rio de Janeiro, 2003.

JAHOVIC, N.; ERKANLI, G.; ISERI, S.; ARBAK, S.; ALICAN, I. Gastric protection by α -melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: Involvement of somatostatina. **Life Sciences**, v. 80, p. 1040-45, 2007.

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

JORDÃO JÚNIOR, A. A.; et al. Effect of methionine load on homocysteine levels, lipid peroxidation and DNA damage in rats receiving etanol. **BJPS**, v. 45, n. 4, p. 709-714, 2009.

JUNQUEIRA, L. C. U.; et al. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-Polarization Method. **Histochemistry**, v, 74, p. 153-156, 1982.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

KO, J. K. S.; et al. The vascular and glandular organoprotective properties of metronidazole in the rodent stomach. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 11, p. 811-819, 1997.

KOBAYASHI T.; et al. Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting neutrophil infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacol Research**, v. 43, p. 23 - 30, 2001.

KUBA, K.; IMAI, Y.; PENNINGER, J. M. Multiple functions of angiotensin converting enzyme 2 and its relevance. **Card Dis Circ. J**, v. 77, p. 301-8, 2013.

KURIAKOSE, S.; UZONNA, J. E. Diminazene aceturate (Berenil), a new use for an old compound? **Internatio Immunopharmacol**, v. 21, p. 342-5, 2014.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterol**, v. 135, p. 41 – 60, 2008.

LAINE, L.; WEINSTEIN, W. M. Histology of alcoholic hemorrhagic gastritis: a prospective evaluation. **Gastroenterol**, v. 94, p. 1254-62, 1988.

LEE, J. S.; et al. Protective effects of green tea polyphenol extracts against ethanol-induced gastric mucosal damages in rats: Stress-responsive transcription factors and MAP incases as potential targets. **Mutat Res**, v. 579, p. 214-224, 2005.

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

LOURDES, M. P. B. S.; et al. O Hormônio de Crescimento e a Concentração de Colágeno na Cicatrização de Feridas Cutâneas de Ratos. **Acta Cir Bras**, v. 15, n. 3, 2000. MATSUHASHI, T.; et al. Protective effect of a novel rice extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. **Dig Dis Sci**, v. 52, p. 434 – 41, 2007.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. *Curr. Topics Cell. Regulation*. v. 36, p.95-116, 2000.

MACÊDO, S. Angiotensin converting enzyme 2 activator DIZE modulates metabolic profile in mice decreasing lipogenesis. **Protein Pept Lett**, v. 22, p. 332-340, 2015.

MATSUI, H.; et al. The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries in stomach and small intestine. **J Clin Bio Nut**, v. 48, p. 107-11, 2011.

MAYER, B. Mecanismos Envolvidos nas Ações Antiúlcera Anti-Secretora Ácida dos Extratos da *Salvia officinalis* L. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmacologia, Paraná, 2007.

McGRATH, S.; et al. Angiotensin II-generating enzymes, angiotensin converting enzyme (ACE) and mast cell chymase (CMA1), in gastric inflammation may be regulated by *H. pylori* and associated cytokines. **Pathology**, v. 41, p. 419-27, 2009.

MECCA, A. P.; et al. Cerebroprotection by angiotensin-(1–7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. **Exp Physiol** v, 96, p. 1084-1096, 2011.

MEDEIROS, J. V. R. **Efeitos Gastroprotetor e Procinético do Sulfeto de Hidrogênio (H₂S) em Camundongos - Papel dos Neurônios Aferentes Sensíveis à Capsaicina, Receptores de Vanilóides do tipo 1 (TRPV1) e Canais de K ATP-Dependentes (KATP)**. 2009. 167 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MEDEIROS, J. V. R.; et al, Role of the No/cGMP/K_{ATP} pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced damage in rats. **British J Pharmacol**, v. 153, p. 721-27, 2008.

MEDEIROS, J. V. R. **Efeito gastroprotetor do sildenafil (Viagra) na lesão gástrica induzida por álcool em ratos: Papel do óxido nítrico, do GMPc e dos canais de potássio sensíveis ao ATP.** 2006. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MERCHANT, J. L. Tales from the crypts: regulatory peptides and cytokines in gastrointestinal homeostasis and disease. **J Clin Investig**, v. 117, p. 6 – 12, 2007.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem**, v. 86, p. 271-8, 1978.

MOORE, P. K.; et al. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, p. 609-11, 2003.

MUSCARA, M. N.; WALLACE, J. L. Nitric Oxide. V. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **American J Physiol**, v. 276, p. 1313-16, 1999.

NICOLAU, L. A.; et al. The hydrogen sulfide donor, Lawesson's reagent, prevents alendronate-induced gastric damage in rats. **Bra J Med Biol Res**, v. 46, p. 708-14, 2013.

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

OBREGÓN, E. B.; OLIVARES, C. Boron as Testicular Toxicant in Mice (*Mus domesticus*). **Int J Morphol**. v. 30, n.3, p. 1106-111, 2012.

OKABE, S.; PFEIFFER, C.J. Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach **American Journal of Physiology**, v. 17, p. 619 – 629, 1972.

OLIVEIRA, G. L. S.; FREITAS, R. M. Diminazene aceturate—An antiparasitic drug of antiquity: Advances in pharmacology & therapeutics. **Pharmacol Research**, p. 138-157, 2015.

OLIVEIRA, J. A.; et al. Avaliação da atividade protetora gástrica do extrato hidroalcoólico da semente de girassol*. **Rev Bras Clin Med**, v. 8, p. 129-34, 2010.

OLSZANECKI, R.; et al. Angiotensin metabolism in rat stomach wall: prevalence of angiotensin-(1-7) formation. **J Physiol Pharmacol**, v. 60, p. 191-6, 2009.

PAN, J.S.; et al. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **W J Gastroenterol**, v. 14, p. 5857-67, 2008.

PASRICHA, P. J. **Procinéticos, antieméticos e agentes usados na síndrome do intestino irritável**. Rio de Janeiro: Mac Graw Hill, 2006.

PEREGRINE, A. S.; MAMMAN, M. Pharmacology of diminazene: a review. **Acta Trop Sep**, v. 54, p. 185-203, 1993.

PERLOT, T.; PENNINGER, J. M. ACE2 e From the renineangiotensin system to gut microbiota and malnutrition. **Microbes Infect**, v. 15, p. 866-73, 2013.

POTRICH, F. B. **Atividade gastroprotetora do extrato bruto hidroalcoólico da *Achillea millefolium* L.: envolvimento do sistema antioxidante**. 2009. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal do Paraná.

QI, Y.; et al. J. Katovich, Diminazene aceturate enhances angiotensin-converting enzyme 2 activity and attenuates ischemia-induced cardiac pathophysiology. **Hypertension**, v. 62, p. 746-752, 2013.

QIU, Y.; et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Activator Diminazene Acetate Ameliorates Endotoxin-Induced Uveitis in Mice. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 55, p. 3809–3818, 2014.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SAMONINA, G. E.; et al. Antiulcer effects of amylin; a review. **Pathophysiol**, v. 11, p. 1-6, 2004.

SANTOS, R. A.; et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas, **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, p. 8258-63, 2003.

SHENOY, V.; et al. Diminazene attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 187, p. 648–657, 2013.

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

SILVA, R. A. F.; et al. Diminazene protects corpus cavernosum against hypercholesterolemia-induced injury. **J Sex Med**, v. 12, n. 289-302, 2015.

SILVA, D. G. P.; BRAGA, T. V.; SANTOS, R. A. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. **Clin Sci**, v. 124, p. 443-56, 2013.

SILVA, R. O. **Papel da via NO/GMPc/K_{ATP} e expressão da óxido nítrico sintetase endotelial e induzida na lesão gástrica causada por alendronato em ratos. 2014.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba.

SILVA, R. O.; et al. Sulfated-Polysaccharide Fraction from Red Algae *Gracilaria caudata* Protects Mice Gut Against Ethanol-Induced Damage. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 2188-200, 2011.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterol**, v. 134, p. 1842 – 60, 2008.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Cur Opi Gastroenterol**, v. 21, p. 636-43, 2005.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing. **Dig Dis Sci**, v. 50, p. 24 – 33, 2005.

TARNAWSKI, A.; et al. Adaptation of gastric mucosa to chronic alcohol administration is associated with increased mucosal expression of growth factors and their receptor. **Scand J Gastroenterol**, v. 193, p. 59-63, 1992.

THATCHER, S. E.; et al. Angiotensin-converting enzyme 2 decreases formation and severity of angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms, *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* v. 34, p. 2617-2623, 2014.

WALLACE, J. L. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **American J Med**, v. 110, p. 19 – 23, 2001.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nat Cli Pract Gastroenterol & Hepatol**, v. 3, 2006.

ZHU, A.; KAUNITZ, J. Gastruodenal mucosa defense. **Cur Gastroenterol Reports**, v. 10, p. 548-54, 2008.

