



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

SIMONE DE ARAÚJO

**PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR AMP (AMPK) E OS MEDIADORES
GASOSOS (H₂S, NO E CO): EVIDÊNCIA DE INTERAÇÃO MÚTUA NA
GASTROPROTEÇÃO EM CAMUNDONGOS.**

TERESINA

2018

SIMONE DE ARAÚJO

**PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR AMP (AMPK) E OS MEDIADORES
GASOSOS (H₂S, NO E CO): EVIDÊNCIA DE INTERAÇÃO MÚTUA NA
GASTROPROTEÇÃO EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde/Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. JAND VENES ROLIM MEDEIROS

TERESINA

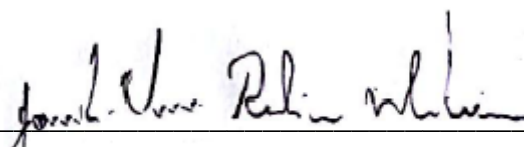
2018

SIMONE DE ARAÚJO

**PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR AMP (AMPK) E OS MEDIADORES
GASOSOS (H₂S, NO E CO): EVIDÊNCIA DE INTERAÇÃO MÚTUA NA
GASTROPROTEÇÃO EM CAMUNDONGOS.**

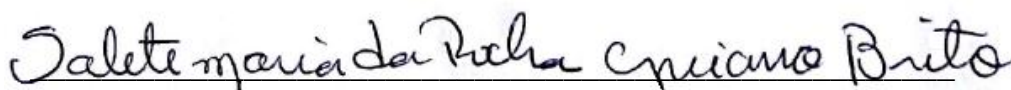
APROVADA EM: 26/02/2018

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. JAND VENES ROLIM MEDEIROS

(Orientador) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ



Dra. SALETE MARIA DA ROCHA CIPRIANO BRITO

(Examinadora interna) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ



Dr. RENAN OLIVEIRA SILVA

(Examinador externo) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde
Serviço de Processamento Técnico

Araújo, Simone de.
A658p Proteína cinase ativada por amp (AMPK) e os mediadores gasosos (H₂S, NO e CO): evidência de interação mútua na gastroproteção em camundongos / Simone de Araújo. -- Teresina, 2018.
113 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 2018.

“Orientação : Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros.”

Bibliografia

1. AMPK. 2. Sulfeto de hidrogênio. 3. Óxido nítrico. 4. Monóxido de carbono. 5. Etanol. I. Título.

CDD 615.1

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros que me abriu muitas portas para que eu chegasse até aqui e a todos os meus companheiros do laboratório LAFIDG pela amizade e a colaboração em todos os experimentos realizados.

Agradecimientos

Agradeço a **Deus** por todas as oportunidades de crescimento que Ele tem me proporcionado e por caminhar sempre comigo ao longo desta jornada.

À **Universidade Federal do Piauí** por toda a estrutura de laboratórios, bibliotecas, salas de aulas e demais instalações, e por me possibilitar um ensino de qualidade.

Ao **Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais (NPPM)** e ao **Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**, juntamente com os professores do programa, principalmente a **professora Doutora Rita de Cássia Meneses** pelo carinho e disponibilidade. Sou imensamente grata por todos os ensinamentos compartilhados durante as aulas e pelo bom trato que tiveram comigo.

Ao meu Orientador, **professor Doutor Jand Venes Rolim Medeiros**, que foi fundamental para a minha escolha no campo da Farmacologia e para a realização deste trabalho. Obrigada, professor, por ser como um pai e ao mesmo tempo um grande amigo. Jamais me esquecerei dos seus ensinamentos.

Agradeço imensamente ao **professor Doutor Marcelo de Carvalho Figueiras** pela disposição e dedicação árdua em colaboração com esta pesquisa e ao **Doutor Renan Oliveira Silva** pelas minuciosas correções que foram fundamentais para a conclusão do Paper e desta Dissertação.

Aos meus queridos amigos do laboratório (**LAFEX** – Laboratório de Fisiofarmacologia Experimental, atualmente denominado **LAFIDG**: Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Desordens Gastrointestinais): **Luan Kelves, Thiago Araújo, Gabriella Pacheco, Matheus Sombra, Bruno Iles, Kerolayne Nogueira** e principalmente a **Beatriz Sousa**, que sempre esteve disponível e prestativa na discussão dos protocolos experimentais. Obrigada, amigos!

Aos meus amigos queridos dos tempos da graduação em Biomedicina (**Ana Patrícia, Mariana Araújo, Renata Paiva, Maria Eletícia, Bruna Souza e Cleison Bruno**) que até hoje são muito presentes na minha vida e me dão forças para continuar a lutar por meus objetivos.

Aos meus companheiros e amigos de turma de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia: **Rodrigo Lopes, Karol, Pollyana, Ana Rita, Izabela, Ruan, Layane, Sávio, Aline, Yara** e ao meu namorado, **Erick Bryan**, por todos os momentos que passamos juntos, pela cordialidade, respeito e ajuda nas horas mais difíceis.

Aos funcionários do NPPM – **Gleice Lima, Patrícia Portela e Josi**, por toda disponibilidade e atenção prestada.

A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pelo apoio financeiro e suporte técnico através do Portal de Periódicos e ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de financiamento do projeto de pesquisa.

À minha querida mãe **Antonia** (*in memoriam*) por ter me concedido a vida e me ensinado o caminho do Bem. Aos meus pais adotivos (**José Bezerra e Marlene**), pela consideração e incentivo a nunca desistir dos meus sonhos. As minhas irmãs biológicas (**Cinthia, Sílvia e Silvana**) e aos meus irmãos do coração (**Lucilene, Rafael, Rangel e Ravell**) pelo o apoio nas minhas escolhas. Agradeço também a família do Erick (sr. **Expedito**, dona **Socorro, Sayonara e Monalisa**) pelo amor e o acolhimento que sempre prestaram a mim.

Finalmente, agradeço a todos que direta e/ou indiretamente tiveram participação para que este trabalho pudesse ser bem-sucedido.

Símone de Araújo

Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.

(Martin Luther King)

ARAÚJO, S. Proteína Cinase Ativada por AMP (AMPK) e os mediadores gasosos (H₂S, NO e CO): evidência de uma interação mútua na gastroproteção em camundongos [dissertação].
Piauí: Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Piauí; 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O sulfeto de hidrogênio (H₂S), óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO) constituem um grupo de mediadores gasosos biologicamente ativos que possuem efeito gastroprotetor por modulação positiva de fatores protetores da mucosa gástrica. Estudos demonstraram que esses mediadores gasosos exercem suas atividades biológicas interagindo com a Proteína Cinase Ativada por AMP (AMPK) em diferentes tipos de células. Entretanto, o envolvimento da AMPK no efeito gastroprotetor desses mediadores gasosos não é conhecido. **OBJETIVOS:** No presente estudo, buscamos elucidar se a AMPK previne e tem papel chave na proteção gástrica do H₂S, NO e CO contra a lesão induzida por etanol. **MÉTODO:** camundongos Swiss foram pré-tratados com AICAR (20 mg/kg, um ativador da AMPK) sozinho ou com etanol 50%. Outros grupos foram pré-tratados com PAG (50 mg/kg, v.o, um inibidor de H₂S), L-NAME (10 mg/Kg, i.p, um inibidor de NO) ou ZnPP IX (3 mg/Kg, i.p, um inibidor de CO) 30 minutos antes do AICAR. Em outro protocolo experimental, os animais foram pré-tratados com NaHS (150 µmol/kg, v.o), reagente de Lawesson (27 µmol/kg, v.o), NPS (10 mg/Kg, v.o), L-Arginina (200 mg/Kg, i.p), Hemina (10 mg/kg, i.p) ou CORM-2 (5 mg/kg, v.o) 30 minutos antes do etanol com ou sem o composto C (10 mg/kg, um inibidor não seletivo da AMPK). Os níveis de H₂S, nitrito / nitrito (NO₃⁻/NO₂⁻) e bilirrubina foram avaliados nos homogenatos gástricos. A mucosa gástrica também foi coletada para análise histopatológica e para expressão da AMPK por imunohistoquímica. **RESULTADOS:** O pré-tratamento com AICAR atenuou a lesão gástrica (2,74 ± 1,23 mm²) quando comparado com o grupo etanol (43,89 ± 4,36 mm²) e aumentou os níveis de H₂S (0,116 ± 0,009 µmol/g) e bilirrubina (0,0111 ± 0,0007 mg/dl), mas não os níveis de NO₃⁻/NO₂⁻ na mucosa gástrica. Além disso, a inibição da síntese de H₂S, NO ou de CO exacerbou o dano gástrico induzido por etanol e inibiu a gastroproteção do AICAR (50,83 ± 6,16 mm², 33,77 ± 5,11 mm², 47,30 ± 6,06 mm², respectivamente). O pré-tratamento com o composto C reverteu o efeito gastroprotetor do NaHS (22,75 ± 3,27 mm²), reagente de Lawesson (48,25 ± 1,21 mm²), NPS (40,55 ± 5,16 mm²), L-arginina (33,85 ± 6,90 mm²), CORM-2 (53,64 ± 4,68 mm²) ou Hemina (40,66 ± 4,79 mm²). O composto C também reverteu o efeito do NaHS nos níveis de H₂S (0,14 ± 0,03 µmol/g), do NPS nos níveis de NO₃⁻/NO₂⁻ (0,62 ± 0,09 µM) e da Hemina nos níveis de bilirrubina (0,006 ± 0,004 mg/dl), quando comparados com os grupos tratados com NaHS, NPS ou Hemina (0,45 ± 0,06 µmol/g; 85 ± 0,02 µM; 0,0020 ± 0,002 mg/dl, respectivamente). A imunohistoquímica demonstrou que a AMPK está expressa em níveis basais principalmente nas células da mucosa gástrica e teve expressão aumentada pelo pré-tratamento com NaHS, NPS e CORM-2. **CONCLUSÕES:** A ativação da AMPK protege o tecido gástrico de camundongos contra a lesão induzida por etanol e interage mutuamente com o H₂S, NO ou CO na gastroproteção.

Palavras-Chave: AMPK; Sulfeto de hidrogênio; Óxido nítrico; Monóxido de carbono; Etanol.

ARAÚJO, S. Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) and gas mediators (H₂S, NO and CO): evidence for a mutual interaction in the gastroprotective activity in mice. [dissertation]. PiauÍ: Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do PiauÍ; 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Hydrogen sulfide (H₂S), nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) are a group of biologically active gas mediators that have a gastroprotective effect by modulating positive defensive factors of the gastric mucosa. Studies have shown that these gaseous mediators exert their biological activities interacting with AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) in different cell types. However, the involvement of AMPK in the gastroprotective effect of these gaseous mediators has not been reported yet. **AIM:** The aim of the present study was to evaluate whether 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) prevents and has key role in the gastric protection of hydrogen sulfide (H₂S), nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) against ethanol-induced injury. **METHOD:** Mice were pretreated with AICAR (20 mg/kg, an AMPK activator) alone or with 50% ethanol. Other groups were pretreated with PAG (50 mg/kg, P.O, a H₂S inhibitor), L-NAME (10 mg/Kg, i.p, a NO inhibitor) or ZnPP IX (3 mg/Kg, i.p, a CO inhibitor) 30 min prior of AICAR. In other design, the animals were pretreated with NaHS (150 µmol/kg, p.o), Lawesson's reagent (27 µmol/kg, p.o), SNP (10 mg/Kg, p.o), L-Arginine (200 mg/Kg, i.p), Hemin (10 mg/kg, i.p) or CORM-2 (5 mg/kg, p.o) 30 min prior to ethanol with or without compound C (10 mg/kg, a non-selective AMPK inhibitor). The H₂S, nitrate/nitrite (NO₃⁻/NO₂⁻) and bilirubin levels were evaluated in the gastric mucosa. The gastric mucosa also was collected to histopathological analysis and AMPK expression by immunohistochemistry. **RESULTS:** Pretreatment with AICAR (2,74 ± 1,23 mm²) attenuated the ethanol-induced injury and increased the H₂S (0,116 ± 0,009 µmol/g) and bilirubin (0,0111 ± 0,0007 mg/dl) levels, but not NO₃⁻/NO₂⁻ levels in the gastric mucosa. In addition, inhibition of the H₂S, NO, or CO synthesis exacerbated the ethanol-induced gastric damage and inhibited the gastroprotection by AICAR (50,83 ± 6,16 mm², 33,77 ± 5,11 mm², 47,30 ± 6,06 mm², respectively). Pretreatment with compound C reversed the gastroprotective effect of NaHS (22,75 ± 3,27 mm²), Lawesson's reagent (48,25 ± 1,21 mm²), SNP (40,55 ± 5,16 mm²), L-Arginine (33,85 ± 6,90 mm²), CORM-2 (53,64 ± 4,68 mm²) or Hemin (40,66 ± 4,79 mm²). Compound C also reversed the effect of NaHS on H₂S levels (0,14 ± 0,03 µmol/g), SNP on NO₃⁻/NO₂⁻ levels (0,62 ± 0,09 µM) and Hemin on bilirubin levels (0,006 ± 0,004 mg/dl) when compared with the NaHS, SNP or Hemin groups (0,45 ± 0,06 µmol/g, 85 ± 0,02 µM, 0,0020 ± 0,002 mg/dl, respectively). The immunohistochemistry revealed that AMPK occurs at basal levels mainly in the gastric mucosa cells, and was increased by pretreatment with NaHS, SNP and CORM-2. **CONCLUSIONS:** AMPK activation exerts gastroprotection against ethanol-induced gastric damage and mutually interacts with H₂S, NO, or CO in the gastroprotection.

Keywords: AMPK; Hydrogen Sulphide; Nitric Oxide; Carbon Monoxide; Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos diretos e indiretos do etanol no desenvolvimento da lesão gástrica.....	26
Figura 2: Vias de produção do H ₂ S.....	28
Figura 3: Efeito gastroprotetor do H ₂ S.....	30
Figura 4: Biossíntese e mecanismo de ação do NO.....	31
Figura 5: Efeito gastroprotetor do NO.....	32
Figura 6: Biossíntese do CO.....	33
Figura 7: Efeito gastroprotetor do CO.....	34
Figura 8: Estrutura da AMPK.....	36
Figura 9: Ativadores fisiológicos, farmacológicos, naturais e hormonais da AMPK.....	38
Figura 10: Representação esquemática do delineamento experimental realizado.....	49
Figura 11: Efeito do AICAR, ativador da AMPK, na presença dos inibidores de H ₂ S, NO ou CO na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....	58
Figura 12: Alterações histopatológicas no tecido gástrico de camundongos durante a avaliação do envolvimento entre AMPK e os mediadores gasosos (H ₂ S, NO e CO) na lesão induzida por etanol.....	60
Figura 13: Avaliação da produção de H ₂ S, de nitrato/nitrito ou de bilirrubina após o tratamento com AICAR em homogenatos de tecido gástrico de camundongos.	63
Figura 14: Análise da concentração de H ₂ S em homogenatos de tecidos gástricos de camundongos.....	65

Figura 15: Avaliação do envolvimento entre AMPK e H ₂ S na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....	67
Figura 16: Alterações histopatológicas no tecido gástrico de camundongos durante a avaliação do envolvimento entre AMPK e sulfeto de hidrogênio na lesão induzida por etanol.....	69
Figura 17: Níveis de nitrato/nitrito em homogenatos de tecido gástrico de camundongos.....	72
Figura 18: Avaliação do envolvimento entre AMPK e NO na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....	74
Figura 19: Alterações histopatológicas no tecido gástrico de camundongos durante a avaliação do envolvimento entre AMPK e óxido nítrico na lesão induzida por etanol.....	76
Figura 20: Níveis de bilirrubina em homogenatos de tecido gástrico de camundongos.....	79
Figura 21: Avaliação do envolvimento entre AMPK e CO na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.....	81
Figura 22: Alterações histopatológicas no tecido gástrico de camundongos durante a avaliação do envolvimento entre AMPK e monóxido de carbono na lesão induzida por etanol.....	83
Figura 23: Fotomicrografias de imunohistoquímica demonstrando a expressão da AMPK α no tecido gástrico de camundongos.....	86
Figura 24: Fotomicrografias de imunohistoquímica demonstrando a expressão da AMPK fosforilada no tecido gástrico de camundongos.....	88

Figura 25: Análise de imunohistoquímica demonstrando a quantificação da intensidade da coloração DAB para AMPK fosforilada na mucosa gástrica camundongos..... 90

Figura 26: Diagrama esquemático representativo da possível interação entre AMPK e os mediadores gasosos: sulfeto de hidrogênio, óxido nítrico e monóxido de carbono..... 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação histopatológica do envolvimento entre AMPK e mediadores gasosos (H ₂ S, NO e CO) em tecidos gástricos de camundongos submetidos à lesão por etanol.....	59
Tabela 2: Avaliação histopatológica do envolvimento entre AMPK e H ₂ S em tecidos gástricos de camundongos submetidos à lesão por etanol.....	70
Tabela 3: Avaliação histopatológica do envolvimento entre AMPK e NO em tecidos gástricos de camundongos submetidos à lesão por etanol.....	77
Tabela 4: Avaliação histopatológica do envolvimento entre AMPK e CO em tecidos gástricos de camundongos submetidos à lesão por etanol.....	84

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADP	difosfato de adenosina
AICAR	5- aminoimidazole-4-carboxamida-1-β-D-ribofuranoside
AID	domínio auto inibitório
AINEs	anti-inflamatórios não esteroides
AMP	monofosfato de adenosina
AMPK	proteína cinase ativada por AMP
ANOVA	análise unidirecional da variância
ATP	trifosfato de adenosina
BaCl₂	cloreto de bário
Ca²⁺	cálcio
CAMKKβ	P roteína cinase tipo β da proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina
CAT	cisteína aminotransferase
CBM	molécula central de ligação aos carboidratos
CBS	cistationina β-sintase
CFTR	canal regulador de condutância transmembranar de fibrose cística
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
CO	monóxido de carbono
CORM-2	dímero de tricarbonildiclororutênio (II)
CSE	cistationina γ-liase
DAO	D-aminoácido oxidase
DMSO	dimetilsulfóxido
Comp C	composto C
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
EPM	erro padrão da média
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
GCs	guanilato ciclase solúvel
GSH	glutathiona reduzida
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina

GTP	trifosfato de guanosina
H₂S	sulfeto de hidrogênio
HO	heme oxigenase
i. p	intraperitoneal
IKKβ	proteína cinase I κ B
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-1β	interleucina 1 beta
KCl	cloreto de potássio
LAW	reagente de Lawesson
LKB1	cinase hepática B1
L-NAME	L-NG-nitro-arginina metil éster
MDA	malondialdeído
MPO	mieloperoxidase
NaHS	hidrossulfito de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NFκB	fator nuclear kappa B
Nrf2	fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
NO	óxido nítrico
NO₂⁻	nitrito
NO₃⁻	nitrato
Nos3 - / -	<i>knockout</i> para o gene da NOS 3
NPS	nitroprussiato de sódio
OH	hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO⁻	peroxinitrito
PAG	DL-propargilglicina
pH	potencial hidrogeniônico
ROS	espécies reativas de oxigênio
RPM	rotação por minuto
S²⁻	íon sulfeto

Ser1177	aminoácido serina na posição 1177
Ser1179	aminoácido serina na posição 1179
SOD	superóxido dismutase
TAK1	cinase 1 ativadora do fator transformador de crescimento β
TGI	trato gastrointestinal
Thr172	aminoácido treonina na posição 172
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TRPV1	receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular
ZnPP IX	zinco protoporfirina IX
3MST	3-mercaptopiruvato sulfurtransferase
°C	graus Celsius
v.o	via oral

UNIDADES

g	grama
h	hora
M	molar
mg / dL	miligrama por decilitro
mg / kg	miligrama por quilograma
ml / kg	mililitro por quilograma
mM	milimolar
mm²	milímetro quadrado
nm	nanômetro
μL	microlitro
μM	micromoles
μmol / g	micromol por grama
μmol / L	micromol por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1. PROBLEMATIZAÇÃO.....	23
1.2. ASPECTOS RELACIONADOS AO USO EXCESSIVO DO ETANOL.....	24
1.3. FISIOPATOLOGIA DA LESÃO GÁSTRICA CAUSADA POR ETANOL.....	25
1.4. MEDIADORES GASOSOS (H ₂ S, NO E CO) E OS SEUS EFEITOS BENÉFICOS NO TRATO GASTRINTESTINAL.....	27
1.4.1. Sulfeto de hidrogênio	28
1.4.2. Óxido Nítrico	31
1.4.3. Monóxido de Carbono.....	33
1.5. PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR AMP (AMPK): ESTRUTURA E REGULAÇÃO.....	35
1.5.1. Evidências da AMPK no trato gastrintestinal.....	38
1.5.2. Envolvimento da AMPK nos efeitos benéficos do sulfeto de hidrogênio, óxido nítrico e monóxido de carbono	39
1.5.2.1. AMPK e Sulfeto de Hidrogênio.....	39
1.5.2.2. AMPK e Óxido Nítrico.....	40
1.5.2.3. AMPK e Monóxido de Carbono	41
2 OBJETIVOS	43
2.1. OBJETIVO GERAL	44
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1. DROGAS E REAGENTES	47
3.2. ANIMAIS	47
3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	48
3.3.1. Lesão gástrica induzida por etanol.....	50

3.3.2. Protocolo I – Avaliação do envolvimento da AMPK no efeito gastroprotetor do H ₂ S na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos	50
3.3.3. Protocolo II – avaliação do envolvimento da AMPK no efeito gastroprotetor do NO na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos	50
3.3.4. Protocolo III – avaliação do envolvimento da AMPK no efeito gastroprotetor do CO na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos	51
3.3.5. Protocolo IV – avaliação do efeito gastroprotetor da AMPK sobre a produção de H ₂ S, nitrato/nitrito ou de bilirrubina em homogenatos gástricos de camundongos.....	51
3.3.6. Avaliação histológica das lesões gástricas.....	52
3.3.7. Determinação dos níveis de sulfeto de hidrogênio no tecido gástrico de camundongos.....	52
3.3.8. Dosagem dos níveis de nitrato/nitrito no tecido gástrico de camundongos.....	53
3.3.9. Determinação dos níveis de bilirrubina no tecido gástrico de camundongos	53
3.3.10. Imunohistoquímica para AMPK α e AMPK fosforilada no tecido gástrico de camundongos.....	54
3.3.11. Análise da imunohistoquímica para AMPK fosforilada.....	55
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
4 RESULTADOS	56
4.1. O EFEITO GASTROPROTETOR DA AMPK É DEPENDENTE DO SULFETO DE HIDROGÊNIO, DO ÓXIDO NÍTRICO E DO MONÓXIDO DE CARBONO ..	57
4.1.1. A inibição de H ₂ S, NO e CO no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor da AMPK: avaliação macroscópica.....	57
4.1.2. A inibição de H ₂ S, NO e CO no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor da AMPK: avaliação histopatológica.....	59
4.1.3. Efeito da ativação da AMPK sobre os níveis de H ₂ S, de bilirrubina e de nitrato/nitrito no tecido gástrico de camundongos.....	62

4.2.	O EFEITO GASTROPROTETOR DO SULFETO DE HIDROGÊNIO É DEPENDENTE DA AMPK.....	64
4.2.1.	A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o aumento dos níveis de H ₂ S produzidos pelo NaHS.....	64
4.2.2.	A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor do H ₂ S: avaliação macroscópica	66
4.2.3.	A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor do H ₂ S: avaliação histopatológica	68
4.3.	O EFEITO GASTROPROTETOR DO ÓXIDO NÍTRICO É DEPENDENTE DA AMPK.....	71
4.3.1.	A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o aumento dos níveis de nitrato/nitrito produzidos pelo NPS	71
4.3.2.	A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor do NO: avaliação macroscópica	73
4.3.3.	A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor do NO: avaliação histopatológica	75
4.4.	O EFEITO GASTROPROTETOR DO MONÓXIDO DE CARBONO É DEPENDENTE DA AMPK	78
4.4.1.	A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o aumento dos níveis de bilirrubina produzidos pela Hemina.	78
4.4.2.	A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor do CO: avaliação macroscópica.....	80
4.4.3.	A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor do CO: avaliação histopatológica.	82
4.5.	OS DOADORES DE SULFETO DE HIDROGÊNIO, DE ÓXIDO NÍTRICO OU DE MONÓXIDO DE CARBONO AUMENTAM A EXPRESSÃO DA AMPK NO TECIDO GÁSTRICO DE CAMUNDONGOS.....	85
4.5.1.	NaHS, NPS ou CORM-2 aumentam a imunomarcação da AMPK α no tecido gástrico de camundongos	85

4.5.2. NaHS, NPS ou CORM-2 aumentam a imunomarcção da AMPK fosforilada no tecido gástrico de camundongos	87
4.5.3. NaHS, NPS ou CORM-2 aumentam a coloração DAB para AMPK fosforilada na mucosa gástrica de camundongos	89
5 DISCUSSÃO	91
6 CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS	102
ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CEEA/UFPI.....	112

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1. PROBLEMATIZAÇÃO

O trato gastrintestinal (TGI) é constantemente exposto a várias substâncias que muitas vezes causam danos na mucosa gástrica (SOUZA et al., 2017). Entre essas substâncias está o etanol, que provoca lesões gástricas caracterizadas por edema e perda de células epiteliais. O etanol penetra rapidamente na mucosa gástrica; provoca danos nas membranas celulares, podendo ocasionar a formação de úlceras através da destruição da barreira mucosa e do aumento da permeabilidade vascular (NASSINI et al., 2010). Neste contexto, estudos realizados com foco na fisiopatologia do TGI têm consistentemente demonstrado o papel do sulfeto de hidrogênio (H₂S), do óxido nítrico (NO) e do monóxido de carbono (CO) no tratamento de patologias inflamatórias, incluindo a lesão gástrica induzida por etanol (MEDEIROS et al., 2008; GOMES et al., 2010; SOUZA et al., 2017).

Esses mediadores gasosos exercem importantes mecanismos de gastroproteção, por exemplo, doadores de H₂S diminuíram a peroxidação lipídica e aumentaram os sistemas antioxidantes no tecido gástrico de animais com úlceras induzidas por estresse (LOU et al., 2008; ABOUBAKR et al., 2013). Além disso, doadores de NO estimularam a produção de prostaglandinas citoprotetoras em tecidos gástricos de ratos (BRZOZOWSKI et al., 2005) e o tratamento com doadores de CO protegeu a mucosa gástrica de camundongos e diminuiu a produção de radicais livres no modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol (GOMES et al., 2010).

A literatura descreve que muitas das atividades biológicas exercidas pelo H₂S, NO e CO ocorrem por meio da ativação da Proteína Cinase Ativada por AMP (AMPK) em diferentes tipos de células (ZHANG et al., 2008; NIZAMUTDINOVA et al., 2009; XIE et al., 2015). Do mesmo modo, há estudos que também demonstram que os efeitos benéficos da AMPK em diferentes sistemas biológicos são mediados pela interação com esses mediadores gasosos, por exemplo, a AMPK ativada é capaz de induzir a produção de óxido nítrico ou de estimular a expressão gênica de enzimas relacionadas com a síntese desses mediadores gasosos, como a NO sintase (eNOS) para o óxido nítrico e a heme oxigenase-1 (HO-1) para o monóxido

de carbono (MORROW et al., 2003; CARRASCO-CHAUMEL et al., 2005; ZHANG et al., 2006; LIU et al., 2011). Os resultados observados nessas publicações sugerem que a AMPK e os mediadores gasosos interagem mutuamente para efetuar suas ações farmacológicas.

A AMPK é uma enzima que desempenha um papel importante na regulação do metabolismo energético celular (CAMERON; KURUMBAIL, 2016). Essa enzima é expressa em muitos órgãos e tecidos de mamíferos, incluindo o TGI (SIDANI et al., 2009; KOPIC et al., 2010; BARAKA; DEIF, 2011; ROGERS et al., 2013). Foi demonstrado que a ativação da AMPK em células parietais inibe a secreção ácida gástrica (SIDANI et al., 2009; KOPIC et al., 2010). Além disso, a sua ativação no tecido gástrico de ratos diabéticos acelerou o processo de cicatrização de úlceras gástricas induzidas por ácido acético (BARAKA; DEIF, 2011) e em células epiteliais intestinais, a ativação dessa enzima foi relacionada com o equilíbrio hidroeletrolítico celular (ROGERS et al., 2013).

Embora vários estudos tenham demonstrado a relação entre AMPK e o sulfeto de hidrogênio, óxido nítrico e monóxido de carbono em diferentes tipos celulares, até o momento nenhuma dessas pesquisas descreveu o envolvimento da AMPK no efeito gastroprotetor desses mediadores gasosos. Com base nisso, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a AMPK apresenta efeito gastroprotetor e se está envolvida na gastroproteção mediada pelo H₂S, NO e CO no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

1.2. ASPECTOS RELACIONADOS AO USO EXCESSIVO DO ETANOL

Quimicamente, o etanol (álcool etílico) faz parte do grupo dos álcoois e é classificado como monoálcool ou como álcool primário. Trata-se de um composto orgânico de fórmula molecular CH₃CH₂OH que contém um grupo hidroxila (OH), sendo ligado diretamente a dois átomos de carbonos saturados. Por conta de seu baixo peso molecular e do grupo OH, o etanol torna-se solúvel tanto em ambiente aquoso quanto lipídico. Isso permite que passe livremente dos fluidos corporais para as células. Depois de ingerido, o etanol tem o seu metabolismo iniciado na mucosa gástrica (BEAZELL; IVY, 1940). Posteriormente, chega ao intestino e passa para a

circulação portal, primeiro através do fígado, onde a sua maior parte é metabolizada (WU; CEDERBAUM, 2009).

O álcool etílico é uma das poucas drogas psicotrópicas que tem o seu consumo admitido e incentivado pela sociedade. Apesar da sua ampla aceitação social, o consumo de bebidas alcoólicas, quando excessivo, pode levar ao desenvolvimento de doenças crônicas e outras disfunções graves, incluindo: hipertensão, doença cardíaca, acidente vascular cerebral, doença hepática e alterações no TGI (REHM et al., 2010). Além dos problemas de saúde, têm-se também os elevados gastos públicos e privados decorrentes do uso/abuso ou dependência de álcool (BRASIL, 2012).

Em maio de 2010, a Assembleia Mundial da Saúde, que representa todos os 193 Estados membros da OMS, aprovou uma resolução para garantir a estratégia global na perspectiva de reduzir o uso nocivo do álcool etílico (WHO, 2011). Muitas pesquisas científicas também têm sido conduzidas com o objetivo de investigar e inibir os mecanismos pelos quais o etanol ocasiona disfunções em diferentes sistemas biológicos. Por exemplo, atualmente sabe-se que o consumo excessivo ou concentrações de etanol superiores a 30% promovem o desenvolvimento de lesões gástricas por diferentes mecanismos, seja pelo aumento da resposta inflamatória ou pela diminuição de sistemas antioxidantes, dentre outros (HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2000, ASMARI et al., 2016). Essas pesquisas que tem como foco os efeitos do etanol no TGI são de grande relevância, pois podem fornecer novos alvos terapêuticos para o tratamento de disfunções gástricas, principalmente em pessoas que consomem bebidas alcólicas de forma demasiada.

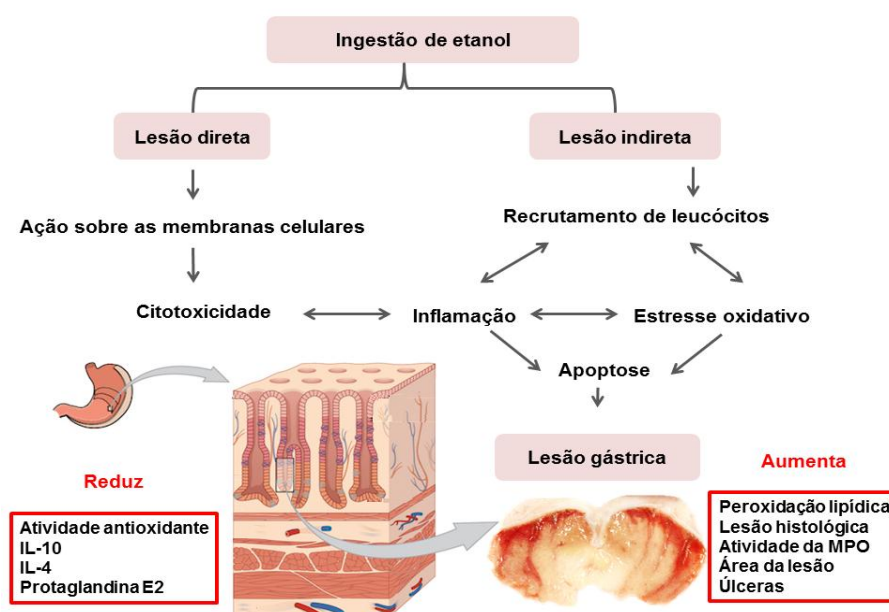
1.3. FISIOPATOLOGIA DA LESÃO GÁSTRICA CAUSADA POR ETANOL

Após a ingestão, o etanol tem o seu metabolismo iniciado na mucosa gástrica. Posteriormente, chega ao intestino e passa para a circulação portal, primeiro através do fígado, onde a sua maior parte é metabolizada. (BEAZELL; IVY, 1940). Embora em doses baixas ou moderadas o etanol não ocasione tal dano em indivíduos saudáveis, é importante considerar que uma única dose excessiva pode induzir inflamação e lesões hemorrágicas no tecido gástrico (BODE; BODE, 1997). Isso acontece porque os efeitos do etanol na mucosa gástrica dependem da dose, ou

seja, quanto maior a dose, maior a chance de ocorrer lesão. Tanto em humanos saudáveis quanto em animais, o dano gástrico aparece em até 30 minutos após a ingestão do etanol e atinge um pico sanguíneo em cerca de 60 minutos (MITCHELL et al., 2014, ASMARI et al., 2016).

Experimentalmente, a lesão gástrica induzida por etanol em animais é caracterizada por uma gastrite do tipo hemorrágica com edema subepitelial e perda de células epiteliais (MEDEIROS et al., 2009). Esse tipo de lesão pode ocorrer pela ação direta ou indireta do etanol sobre a mucosa gástrica (Figura 1). Quando o etanol age diretamente sobre o tecido gástrico, ocasiona alterações nas membranas celulares e consequentemente induz a citotoxicidade, que é capaz de estimular a resposta imune inflamatória (SALGA et al., 2012). De maneira análoga, a sua ação indireta sobre a mucosa gástrica é evidenciada pelo o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e interleucina 6 (IL-6) (SALGA et al., 2012), elevação do estresse oxidativo e a ocorrência de apoptose, que são fatores que desempenham papéis cruciais na patogênese da lesão gástrica induzida por etanol (LUO et al., 2013). Embora seja conhecido que na lesão por etanol ocorre o recrutamento de leucócitos (ARAB et al., 2015), foi demonstrado também que a infiltração de neutrófilos é bastante baixa nesse modelo de lesão gástrica (MEDEIROS et al., 2009).

Figura 1: Efeitos diretos e indiretos do etanol no desenvolvimento da lesão gástrica.



Fonte: autoria própria, 2017.

O etanol estimula a produção de mediadores inflamatórios como leucotrienos, prostanoídes e produtos de mastócitos, que cooperam para a gravidade da lesão (PESKAR et al., 1988). Esse agente também induz a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que conduzem ao aumento da peroxidação lipídica e provocam a depleção da atividade de sistemas antioxidantes, como os grupos sulfidrilas não proteicos (SOUZA et al., 2017), que são fundamentais para reduzir as ROS e, conseqüentemente, preservar os mecanismos protetores da mucosa gástrica. As lesões induzidas por etanol são também caracterizadas por elevação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) (PESKAR et al., 1988) e pela diminuição da produção de citocinas anti-inflamatórias como as interleucinas 4 e 10 (IL-4 e IL-10, respectivamente) (ARAB et al., 2015).

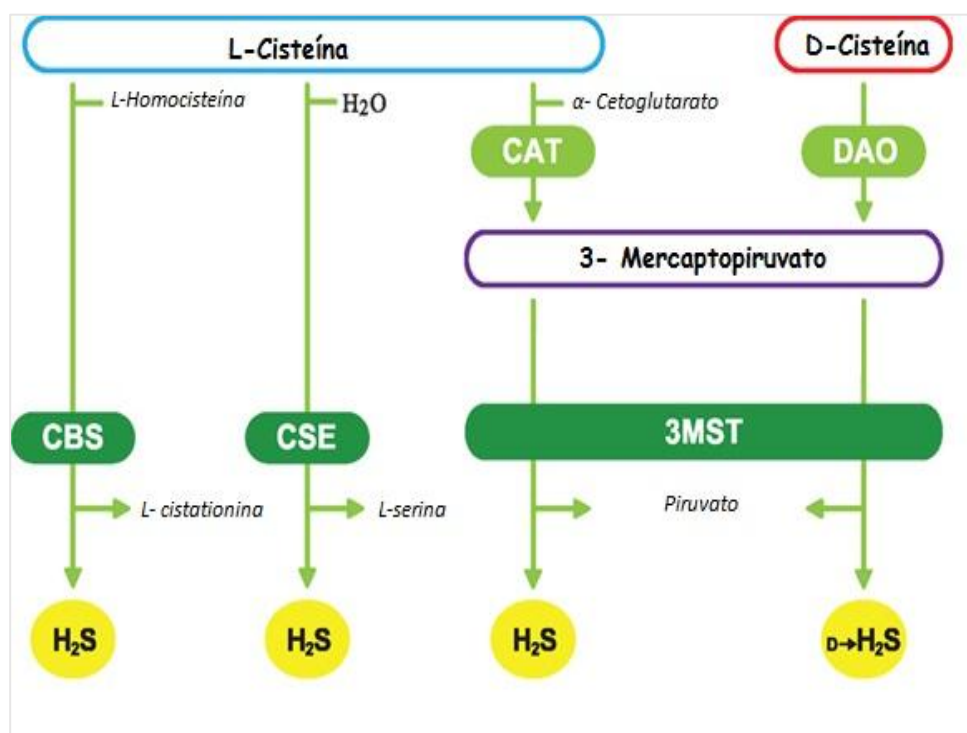
1.4. MEDIADORES GASOSOS (H₂S, NO E CO) E OS SEUS EFEITOS BENÉFICOS NO TRATO GASTRINTESTINAL

O sulfeto de hidrogênio (H₂S) juntamente com o óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO) constituem um grupo de gases biologicamente ativos que são denominados gasotransmissores ou mediadores gasosos (FARRUGIA; SZURSZEWSKI, 2014). Por muitos anos essas moléculas foram evidenciadas apenas por seus efeitos tóxicos, tanto para os seres vivos quanto para o meio ambiente (BROWN; COOPER, 1994; KABIL; BANERJEE, 2010; PEERS; STEELE, 2012). Entretanto, depois de muitas pesquisas realizadas sobre as suas características farmacológicas, atualmente sabe-se que ambos apresentam vários efeitos benéficos em muitos sistemas biológicos, incluindo a modulação das funções do TGI (FARRUGIA; SZURSZEWSKI, 2014; LUCETTI et al., 2016). Nesta seção serão discutidos os principais efeitos benéficos do H₂S, do NO e do CO sobre o TGI, dando ênfase ao papel desses mediadores gasosos na recuperação de lesões gástricas.

1.4.1. Sulfeto de Hidrogênio

A produção fisiológica do H₂S em células de mamíferos é atribuída principalmente a três sistemas enzimáticos, incluindo a cistationina-β-sintase (CBS), a cistationina-γ-liase (CSE) e um terceiro sistema, a ação combinada da 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3-MST) e da cisteína aminotransferase (CAT) (KABIL e BANERJEE, 2010; KIMURA et al., 2012). Além disso, foi descoberto um quarto sistema para a produção de H₂S a partir do aminoácido D-cisteína. Nessa via de produção a enzima D-aminoácido oxidase (DAO) converte 3-mercaptopiruvato em 3-MST e, assim, realiza a produção de H₂S (SHIBUYA e KIMURA, 2013) (Figura 2).

Figura 2: Vias de produção do H₂S.



Legenda: A cistationina-β-sintase (CBS) catalisa a substituição β da L-cisteína para produzir H₂S e L-cistationina. A cistationina-γ-liase (CSE) catalisa a hidrólise da L-cisteína. A 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3MST) produz H₂S a partir da 3-mercaptopiruvato, que é gerada pela cisteína aminotransferase (CAT) e pela D-aminoácido oxidase (DAO) da L-cisteína e D-cisteína, respectivamente. Fonte: Adaptado de SHIBUYA e KIMURA, 2013.

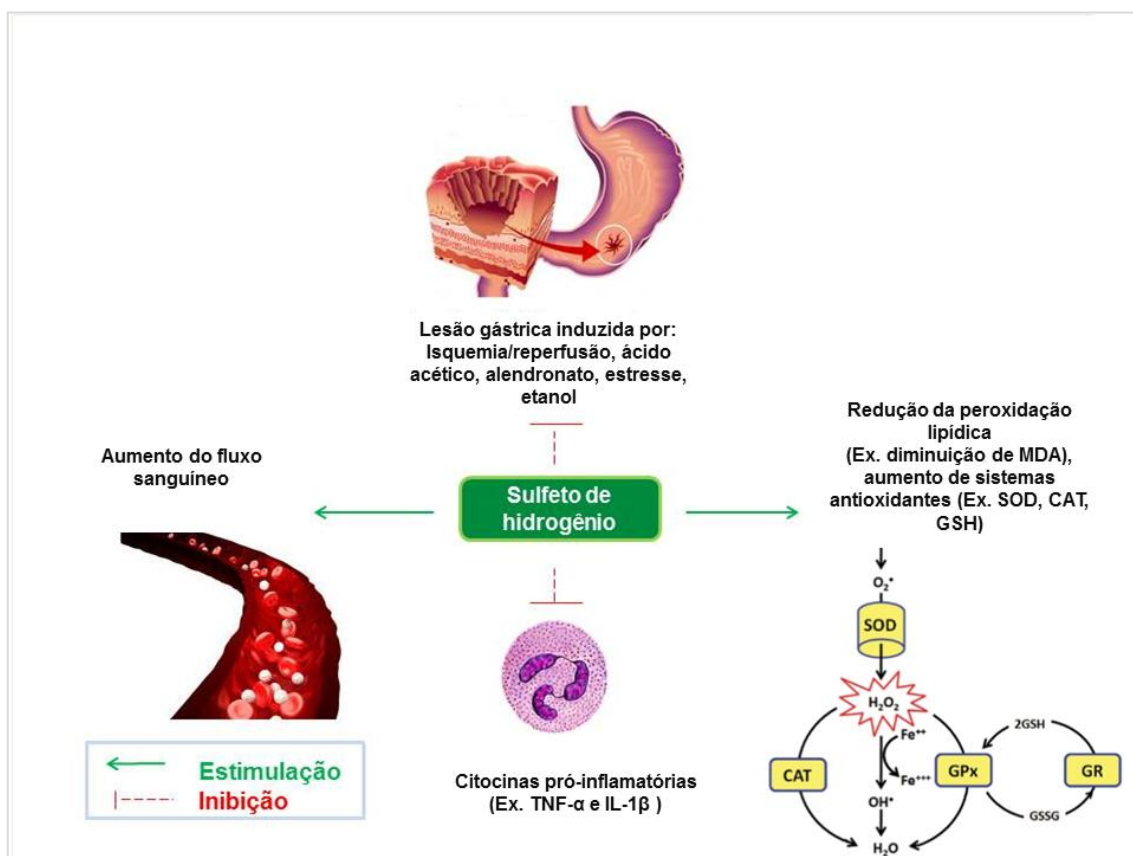
Todas essas enzimas exibem expressão específica em tecidos. Por exemplo, a CBS é expressa abundantemente no sistema nervoso central, fígado e rim de animais (FIORUCCI et al., 2006; KIMURA, 2013; FELIERS et al., 2016). Acredita-se que a CSE é produzida principalmente no sistema cardiovascular (POLHEMUS; LEFER, 2014), mas também pode ser encontrada em outros órgãos, como os rins (SONG et al., 2014). A 3-MST foi inicialmente descoberta no cérebro de camundongos *knockout* para CBS (SHIBUYA et al., 2009), e em seguida essa enzima foi descrita como ubíqua, sendo expressa no pulmão, nos rins, no fígado e nos vasos sanguíneos de camundongos (AHMAD et al., 2016). Tanto a CBS quanto a CSE também podem ser encontradas no tecido gástrico de camundongos e estão relacionadas com a produção de H₂S nesse órgão (MEDEIROS et al., 2013).

Experimentalmente, para aumentar o nível endógeno de H₂S, os pesquisadores usam um precursor da síntese desse mediador gasoso, a L-cisteína, ou fazem uso de doadores diretos desse gás, como o hidrossulfito de sódio (NaHS), o reagente de Lawesson, dentre outros (WALLACE et al., 2007; MEDEIROS et al., 2009; SOUZA et al., 2017). Como efeito, foi demonstrado que o H₂S, liberado do NaHS, e a L-cisteína exerceram atividade gastroprotetora em modelo de lesão gástrica induzida por isquemia e reperfusão em ratos (MARD et al., 2012). O NaHS também aumentou a secreção gástrica de íons bicarbonato, diminuiu a produção de radicais livres e aumentou o fluxo sanguíneo na mucosa (TAKEUCHI et al., 2015; LUCETTI et al., 2016). Além disso, Wallace e colaboradores (2007) demonstraram que a administração de reagente de Lawesson acelerou a cicatrização de úlceras gástricas causadas por ácido acético em ratos. Resultados semelhantes também foram descritos por Nicolau e colaboradores (2013) que demonstraram que o reagente de Lawesson protegeu a mucosa gástrica de ratos contra lesões induzidas por alendronato de sódio, sendo essa gastroproteção confirmada pela redução da peroxidação lipídica, evidenciada pela diminuição da formação de malondialdeído (MDA), pela baixa atividade da MPO, aumento do nível de glutathiona reduzida (GSH) e concentração diminuída de citocinas TNF- α e IL-1 β no tecido gástrico.

Doadores de H₂S também se demonstraram eficazes na recuperação de lesões gástricas induzidas por estresse em ratos, reduzindo a peroxidação lipídica e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase e a GSH (ABOUBAKR et al., 2013). Além disso, na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos os efeitos benéficos do H₂S podem estar

relacionados com o envolvimento de canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), neurônios aferentes sensíveis a capsaicina e receptores TRPV1 (MEDEIROS et al., 2009). Recentemente também foi demonstrado que o H₂S produzido pela DAO apresentou gastroproteção contra lesões induzidas por etanol, diminuindo os níveis de MDA e mantendo os níveis gástricos de GSH (SOUZA et al., 2017). De acordo com os estudos citados, pode-se concluir que o H₂S, como um mediador gasoso, desempenha um papel importante em muitos aspectos fisiopatológicos do TGI (Figura 3).

Figura 3: Efeito gastroprotetor do H₂S.

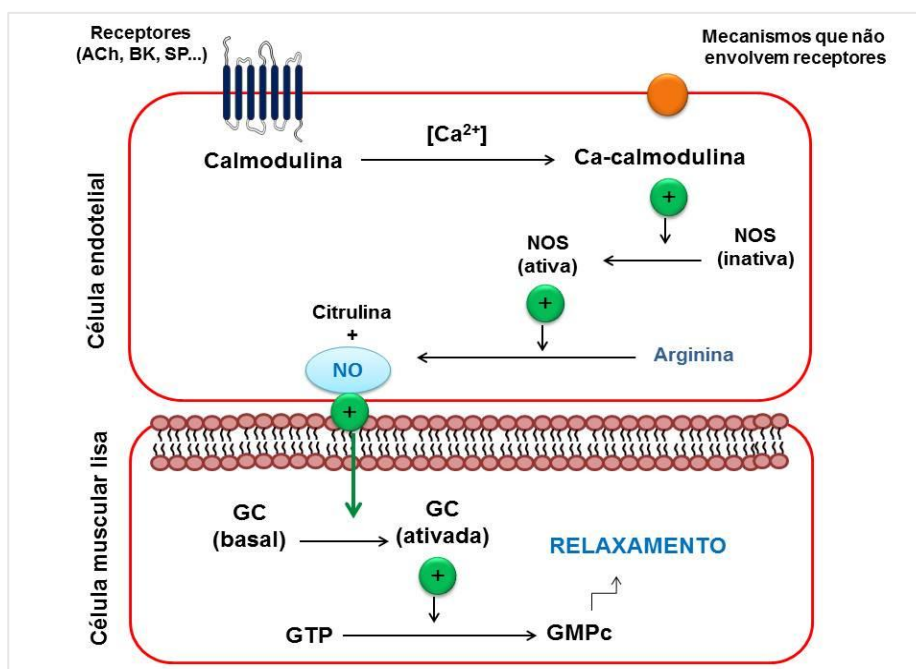


Fonte: Adaptado de MAGIEROWSKI et al., 2015.

1.4.2. Óxido Nítrico

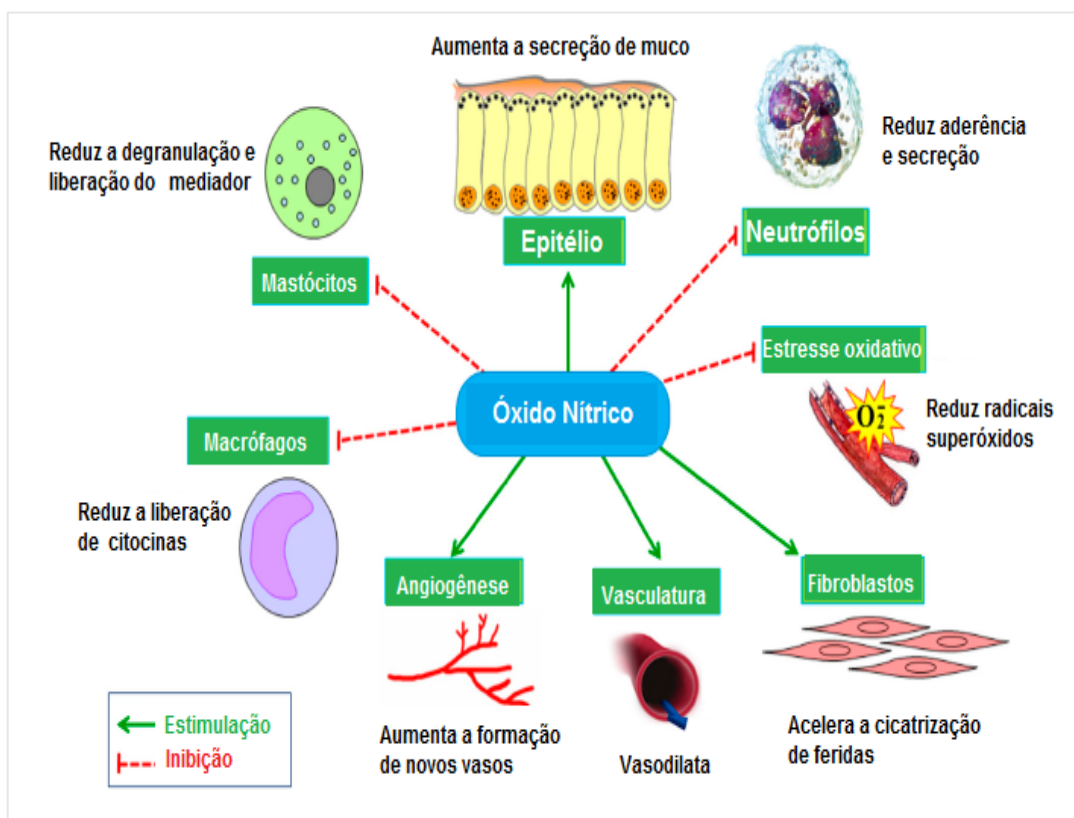
A síntese do óxido nítrico ocorre durante a transformação do aminoácido L-arginina em L-citrulina, em uma reação mediada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Figura 4). A enzima NOS, inicialmente descoberta no endotélio vascular, é conhecida como eNOS (NOS endotelial), porém a que se encontra presente no cérebro e no sistema nervoso periférico é chamada de nNOS (NOS neuronal). A forma da enzima NOS cuja síntese é induzida pelo estímulo imunológico ou inflamatório é designada como iNOS (NOS induzida) (NAPOLI; IGNARRO, 2009). Depois de produzido, o NO se difunde do endotélio para os músculos lisos, localizados na parede vascular, onde reage com a guanilato ciclase solúvel (GCs), levando ao aumento de um segundo mensageiro, o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Assim, o NO ativa a GCs, transformando trifosfato de guanosina (GTP) em GMPc. Por sua vez, o GMPc, atuando através da proteína cinase G, conduz ao relaxamento celular do músculo liso e subsequentemente ao aumento do diâmetro do vaso e aumento no fluxo sanguíneo do órgão (BIAN; MURAD, 2014). A vasodilatação provocada por essa molécula gasosa contribui para a manutenção da integridade gástrica (MAGIEROWSKI et al., 2015).

Figura 4: Biossíntese e mecanismo de ação do NO.



A ação biológica do NO pode ser mimetizada pela administração exógena de doadores de NO, tais como o nitrato de sódio, o nitroprussiato de sódio (NPS) ou outros nitratos orgânicos (MUSCARA; WALLACE, 1999). Desse modo, esses doadores de óxido nítrico apresentam efeito gastroprotetor, evidenciado pelo aumento da secreção de muco pelas células epiteliais e pela redução de citocinas pró-inflamatórias e do estresse oxidativo (MAGIEROWSKI et al, 2015) (Figura 5). Demonstrou-se também que o pré-tratamento com NPS reverteu o efeito do alendronato de sódio sobre o esvaziamento gástrico de líquidos em ratos (SILVA et al., 2015).

Figura 5: Efeito gastroprotetor do NO.



Fonte: Adaptado de MAGIEROWSKI et al., 2015.

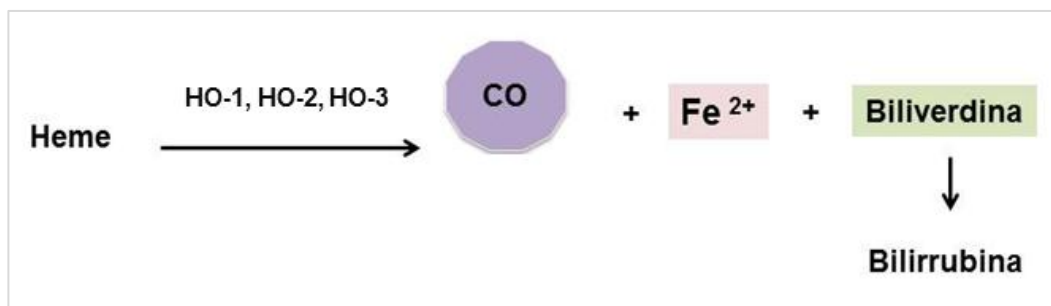
Na lesão gástrica induzida por etanol, o óxido nítrico protegeu a mucosa de animais reduzindo os produtos da peroxidação lipídica, como MDA, e mantendo os níveis gástricos de GSH. Assim como ocorre na gastroproteção mediada pelo H₂S, esse mecanismo também parece ser dependente da participação de canais K_{ATP}, bem como da produção de GMPc (MEDEIROS et al., 2008; SANTANA et al., 2015).

Foi demonstrado também que o NO endógeno reduziu a lesão gástrica causada por etanol através da regulação da microcirculação da mucosa gástrica (MASUDA et al., 1995). Além do mais, foi demonstrado em um estudo *in vitro* que esses doadores de NO também inibiram a secreção ácida em células parietais isoladas, contribuindo, portanto, para a gastroproteção que foi observada em estudos *in vivo* (KONTUREK et al., 2001).

1.4.3. Monóxido de Carbono

O monóxido de carbono é produzido por meio da ação de enzimas denominadas heme oxigenases (HO), que catabolizam o heme e produzem CO, biliverdina e ferro livre (Fe²⁺) (Figura 6). Posteriormente a biliverdina é convertida em bilirrubina, um pigmento conhecido por sua função antioxidante no tecido gástrico de animais (GOMES et al., 2010). Atualmente, são descritas na literatura três isoformas da heme oxigenase (HO-1, HO-2 e HO-3) (IMMENSCHUH et al., 1999). A HO-1 é descrita como a isoforma enzimática induzível, sendo geralmente expressa em níveis muito baixos no lúmen do trato gastrointestinal, mas pode ser acentuadamente induzida a elevados níveis por uma grande variedade de moléculas, incluindo agentes que induzem o estresse celular (NAIK et al., 2003; CHANG et al., 2009). A HO-2 é reconhecida como a forma constitutiva e, é amplamente expressa no trato gastrointestinal, em nervos entéricos e nas células intersticiais de Cajal (FARRUGIA; SZURSZEWSKI, 1999; BATTISH et al., 2000). Quanto a HO-3, essa isoforma é descrita como um pseudogene em algumas espécies e há poucas publicações descrevendo as suas funções (FARRUGIA; SZURSZEWSKI, 2014).

Figura 6: Biossíntese do CO.



Os estudos citados nesta seção reforçam a ideia de que o monóxido de carbono juntamente com o sulfeto de hidrogênio e o óxido nítrico são extremamente importantes para o trato gastrointestinal, pois essas moléculas mantêm a integridade da mucosa e estimulam os mecanismos de proteção gástrica. Embora esteja muito claro que esses mediadores gasosos apresentam efeito gastroprotetor, ainda é necessário que mais estudos sejam realizados para compreender melhor as vias de sinalização que estão envolvidas nesses efeitos benéficos.

1.5. PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR AMP (AMPK): ESTRUTURA E REGULAÇÃO

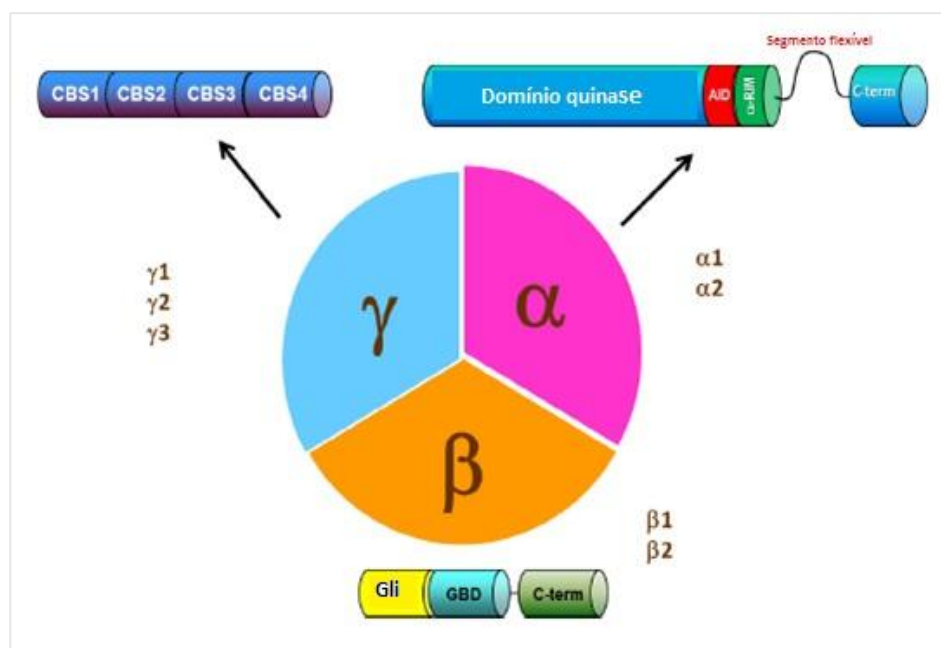
A Proteína Cinase Ativada por AMP (AMPK) é uma enzima considerada como sensor intracelular que controla a homeostase energética ao nível de vários tecidos (MUANPRASAT et al., 2015). A AMPK conserva os níveis de ATP em situações de estresse energético, como no exercício físico, em casos de hipóxia ou em eventos de proliferação celular (HARDIE, 2014; MOUNIER et al., 2015). Estruturalmente, a AMPK é uma proteína cinase heterotrimérica serina / treonina que consiste em uma subunidade catalítica (α) e duas subunidades reguladoras (β e γ) que existem como múltiplas isoformas e variantes (por exemplo: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$), resultando na geração de 12 possíveis combinações heterotriméricas, com uma ampla diversidade entre os padrões de expressão celulares (HARDIE et al., 1998, CAMERON; KURUMBAIL, 2016).

A subunidade α contém o domínio serina-treonina cinase N-terminal que também inclui o resíduo Thr₁₇₂, cuja fosforilação por outras proteínas cinases faz-se necessária para a ativação dessa enzima. Além disso, há um domínio auto inibitório (AID) que é fundamental para reduzir a atividade cinase na ausência de AMP (CHEN et al., 2013), e um domínio globular C-terminal, que se liga às subunidades β e γ (Figura 8). A subunidade β contém uma molécula central de ligação aos carboidratos (CBM), que permite que a AMPK se ligue ao glicogênio (POLEKHINA et al., 2003). Já a subunidade γ contém quatro repetições de sequências em *tandem* denominadas de motivo CBS (a partir da cistationina β -sintase, onde foram originalmente encontradas), que funcionam em pares para proporcionar quatro locais de ligação de nucleotídeos potenciais, tais como o AMP e o ATP (CAMERON;

KURUMBAIL, 2016). Entretanto, apenas a ligação do AMP, mas não do ADP, pode conduzir a ativação alostérica da enzima, a qual é antagonizada pela elevação nos níveis de ATP.

A AMPK pode ser regulada por outras proteínas cinases, incluindo a LKB1 (cinase hepática B1), bem como a cinase ativada por proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo beta (CAMKK β) (JENSEN et al., 2007) e a cinase 1 ativadora do fator transformador de crescimento β (TAK1) (HERRERO-MARTIN et al., 2009; CHEN et al., 2013). A ativação alostérica da AMPK por AMP foi demonstrada em 1980, porém foi somente no início de 1990 que observaram que a ligação da AMP a AMPK não causa apenas uma ativação alostérica, mas também promove a sua fosforilação no resíduo Thr₁₇₂ (MOORE et al., 1991).

Figura 8: Estrutura da AMPK



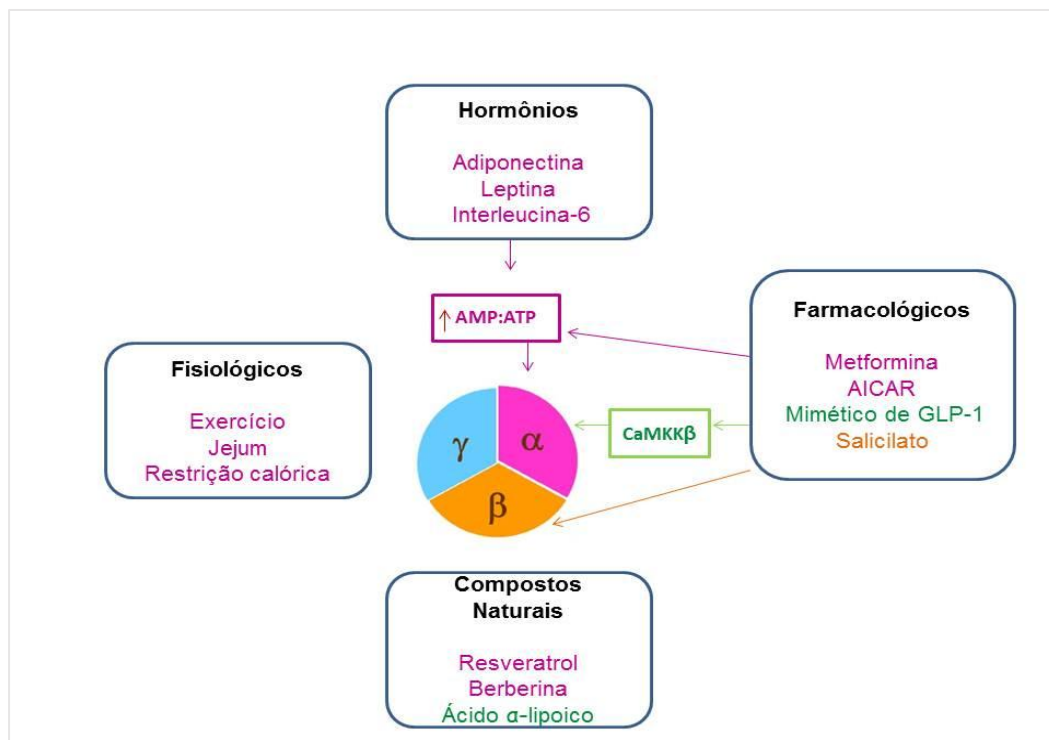
Legenda: São conhecidas duas subunidades α , duas β e três γ da AMPK. Para modular a proteína cinase, a subunidade α contém um domínio auto inibitório (AID), elementos reguladores conhecidos como α RIMs e um domínio C-terminal que se liga estreitamente com as subunidades β e γ . A subunidade β é ligada a um resíduo de glicina N terminal, seguido por um módulo de ligação a carboidrato (CBM) e um domínio C terminal que ancora as subunidades α e γ . A subunidade γ contém quatro módulos cistationina- β -sintase (CBS) em tandem. Além disso, as subunidades $\gamma 2$ e $\gamma 3$ possuem longas extensões N-terminais. Adaptado de Cameron; Kurumbail, 2016.

A descoberta de que o exercício físico induz a ativação da AMPK no músculo esquelético e, assim, estimula o aumento da captação de glicose sugeriu o potencial terapêutico dos ativadores da AMPK para o tratamento da diabetes do tipo 2 (FRIEDRICHSEN et al., 2013). Além disso, a ativação da AMPK no fígado e no tecido adiposo (BIJLAND et al., 2013) modula diferentes vias para equilibrar a lipogênese e a lipólise na conservação dos níveis de ATP. Desse modo, estudos sugerem que os ativadores da AMPK podem inibir a gliconeogênese, entretanto o uso de modelos genéticos indicou que os efeitos diretos na produção de glicose hepática foram independentes da atividade dessa enzima (FORETZ et al., 2010), o que demonstra a necessidade de mais pesquisas para evidenciar esses mecanismos.

A AMPK pode ser ativada por ativadores naturais ou sintéticos. Dentre os compostos naturais, cita-se o resveratrol e o ácido α -lipóico. Essa enzima também pode ser ativada por hormônios como adiponectina, leptina e interleucina-6, por condições fisiológicas como o exercício físico, o jejum prolongado ou pela restrição calórica (Figura 9) (HARDIE, 2016). Consequentemente, a AMPK ativada provoca efeitos pleiotrópicos, incluindo a melhora da função endotelial, a redução da inflamação e o controle do equilíbrio redox celular (O'NEILL; HARDIE, 2013; SHIRWANY; ZOU, 2014).

Para avaliar o papel da AMPK em modelos experimentais geralmente são utilizados ativadores farmacológicos, como o 5-aminoimidazole-4-carboxamida-1- β -D-ribofuranoside (AICAR), a metformina, os salicilatos, dentre outros (HARDIE, 2016). O AICAR é um intermediário endógeno na síntese de inosina monofosfato, que ativa a AMPK em células e tecidos (CAMERON; KURUMBAIL, 2016). Após a entrada na célula, o AICAR é fosforilado para gerar ZMP, um mimético do AMP (YOUNG et al., 1996). Com base nisso, muitos estudos sugeriram que os ativadores da AMPK poderiam ser eficazes para o tratamento de uma variedade de disfunções fisiológicas (CAMERON; KURUMBAIL, 2016) incluindo doenças renais (DECLEVES et al., 2014), cardiovasculares (KIM; DYCK, 2015) ou inflamatórias (O'NEILL; HARDIE, 2013).

Figura 9: Ativadores fisiológicos, farmacológicos, naturais e hormonais da AMPK.



Legenda: Abreviações: CaMKK β - cinase ativada por proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo beta, AMP: Adenosina Monofosfato; ATP: Adenosina Trifosfato; GLP-1: Peptídeo semelhante ao Glucagon do tipo 1. Adaptado de Hardie, 2016.

1.5.1. Evidências da AMPK no trato gastrointestinal

A detecção da AMPK em células epiteliais intestinais foi relacionada com a manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico celular, pois a sua ativação contribui para a inibição dos canais reguladores de condutância transmembranar de fibrose cística (CFTR), que promovem a perda excessiva de água e de eletrólitos (KONGSUPHOL et al., 2009), bem como para a regulação de proteínas de transporte como as aquaporinas, que também são essenciais para o equilíbrio hidroeletrólítico intestinal (HE et al., 2017). Com base nessas funções, estudos indicam que a AMPK poderá ser um futuro alvo terapêutico para o tratamento de disfunções que acometem o TGI, como exemplo as diarreias secretoras (WALKER et al., 2003; ROGERS et al., 2013).

A AMPK também é expressa em células parietais de camundongos, onde participa da modulação da secreção ácida gástrica agindo como um interruptor metabólico da liberação de ácido clorídrico (SIDANI et al., 2009). A ativação da AMPK em células epiteliais gástricas de humanos está relacionada com a proteção

contra apoptose induzida por *Helicobacter pylori* (GUOQIANG et al., 2014). Demonstrou-se também que a ativação da AMPK no tecido gástrico de ratos diabéticos, tratados com metformina, reduziu significativamente as úlceras gástricas induzidas por ácido acético e esse efeito se deu principalmente pela produção de fatores angiogênicos (BARAKA; DEIF, 2011). Essas evidências demonstram que a ativação da AMPK no TGI contribui para muitos efeitos benéficos, incluindo a gastroproteção.

1.5.2. Envolvimento da AMPK nos efeitos benéficos do sulfeto de hidrogênio, óxido nítrico e monóxido de carbono

A literatura é extensa ao descrever a interação da AMPK com os mediadores gasosos: sulfeto de hidrogênio, óxido nítrico e monóxido de carbono em diferentes tipos de células, incluindo células endoteliais, neurônios, entre outras (LIU et al., 2011; NUNES et al., 2015; XIE et al., 2015). Nesta seção serão descritos os principais estudos que evidenciaram o envolvimento da AMPK nas funções exercidas por essas moléculas gasosas, bem como a participação desses mediadores gasosos nos efeitos benéficos da AMPK.

1.5.2.1. AMPK e Sulfeto de Hidrogênio

Xie e colaboradores (2015) demonstraram que a AMPK, quando ativada por H₂S, reduziu significativamente a lesão miocárdica ocasionada por isquemia e reperfusão. Além disso, o envolvimento da AMPK também foi atribuído aos efeitos cardioprotetores do H₂S frente a disfunção cardíaca induzida por dieta hiperlipídica em camundongos ou pelo modelo de tabagismo em ratos (ZHOU et al., 2014a; BARR et al., 2015). Estudos também mostraram que o H₂S causa supressão notável na produção de citocinas inflamatórias em macrófagos e em células de microglia frente ao estímulo por injeção de lipopolissacarídeo (HU et al., 2007; WHITEMAN et al., 2010). Paralelamente, a inibição da inflamação pela ativação da AMPK também foi demonstrada (O'NEILL; HARDIE, 2013), sendo assim, Zhou e colaboradores (2014b) descobriram que a supressão da inflamação da microglia por ação do H₂S dependia em grande parte da ativação da AMPK via CaMKK β , isso foi evidenciado

por doadores de H₂S, pelo aumento da expressão de CBS e por animais *knockdown* para o gene da AMPK.

Um doador de H₂S, o NaHS, diminuiu o estresse oxidativo, restaurou a atividade de sistemas antioxidantes e reduziu os níveis de apoptose através da ativação da sinalização CaMKK β /AMPK, atenuando, portanto, o processo de envelhecimento tanto em modelo experimental *in vivo* quanto *in vitro* (CHEN et al., 2017). Além disso, a produção de ROS foi diminuída pela ativação da AMPK, induzida por H₂S, em células osteoblásticas tratadas com dexametasona (YANG et al., 2014). Com base nesses estudos, pode-se sugerir que muitos dos efeitos benéficos do H₂S podem ser mediados pela AMPK.

1.5.2.2. AMPK e Óxido Nítrico

Zhang e colaboradores (2008) demonstraram que o NO age como um ativador endógeno da AMPK em células endoteliais, aumentando os níveis de Ca²⁺ por meio da ativação da GCs. Posteriormente, o aumento dos níveis de cálcio conduz a ativação da AMPK mediada por CaMKK β . Além disso, em circunstâncias patológicas, caracterizadas por aumento na produção de peroxinitrito (ONOO⁻), foi relatado que o ONOO⁻ ativa a proteína cinase C (PKC), e isso estimula a fosforilação da LKB1, levando à ativação da AMPK (XIE et al., 2006).

A isoforma endotelial da NO sintase é ativada por AMPK através da fosforilação da Ser1177 (CHEN et al., 1999), indicando que a AMPK também é capaz de regular os níveis de espécies reativas de nitrogênio, bem como de induzir a produção de NO. Por conseguinte, um aumento na atividade da AMPK em diferentes condições fisiológicas e patológicas, por exemplo, a estimulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pode levar a um aumento na síntese de NO por ação da eNOS (REIHILL et al., 2007; LEVINE et al., 2007) que, por sua vez, é capaz de aumentar ainda mais a produção de óxido nítrico através do *feedback* positivo da AMPK.

É importante destacar que em camundongos *knockout* para Nos3^{-/-}, a metformina (CALVERT et al., 2008), não tem efeito sobre a AMPK em células endoteliais, enfatizando o papel do NO endógeno na ativação da AMPK e a sua

subsequente modulação sobre o metabolismo bioenergético. Neste contexto, foi demonstrado que, em células endoteliais, a AMPK é fosforilada após o tratamento com diferentes dadores de NO e, uma vez ativada, essa enzima fosforila a proteína cinase I κ B (IKK β) (BESS et al., 2011). Isso conduz à redução da expressão do fator nuclear NF κ B, sugerindo o papel do NO na inibição da resposta inflamatória (HATTORI et al., 2008; BESS et al., 2011).

Tanto a administração de metformina bem como de AICAR, ambos ativadores da AMPK, aumentou significativamente a fosforilação da eNOS no resíduo Ser1179, induzindo a síntese de NO e melhorando o quadro de disfunção endotelial vascular (DAVIS et al., 2006). Ainda relativo aos efeitos benéficos do NO, o sildenafil, fármaco usado para inibir a disfunção erétil, apresenta efeito gastroprotetor através da indução da produção de óxido nítrico na mucosa gástrica de camundongos com lesões induzidas por etanol (MEDEIROS et al., 2008). Foi demonstrado também que a expressão da eNOS, induzida pelo sildenafil, ocorre por meio da ativação da AMPK em células neuronais (NUNES et al., 2015). Esses estudos sugerem que os efeitos benéficos do óxido nítrico, dentre outros fatores, se devem a ativação da AMPK.

1.5.2.3. AMPK e Monóxido de Carbono

Liu e colaboradores (2011) demonstraram que a ativação da AMPK, pelo AICAR, em células endoteliais humanas aumentou a expressão gênica da HO-1, o que contribuiu para os efeitos antiapoptóticos da AMPK, preservando a viabilidade celular durante o estresse metabólico. Foi demonstrado também que a AMPK exerce uma influência positiva na sinalização Nrf2 / HO -1 em fibroblastos embrionários de ratos (ZIMMERMANN et al., 2015). O Nrf2 é um fator nuclear de transcrição que regula a expressão de proteínas antioxidantes e protege células e tecidos contra o estresse oxidativo induzido por lesões e inflamação (QIANG, 2013). Assim, a ativação da AMPK além de induzir a produção endógena de monóxido de carbono por meio da HO-1, também auxilia no combate das ROS através da indução da expressão de Nrf2 (ZIMMERMANN et al., 2015).

Um estudo *in vitro* demonstrou que a hemina, um substrato para a síntese de monóxido de carbono, aumentou a expressão da HO-1 e essa, por sua vez, induziu

a fosforilação da AMPK em queratinócitos humanos expostos a radiação UVB (PARK et al., 2017). Além disso, como citado anteriormente, foi observado também que o AICAR induziu a expressão da HO-1 em células endoteliais humanas (LIU et al., 2011; BYUN et al., 2014), ou seja, esses mecanismos sugerem uma interação mútua entre a AMPK e a via de sinalização do monóxido de carbono, onde tanto a AMPK pode induzir a expressão da HO-1, quanto a HO-1, induzida por hemina, também pode estimular a fosforilação da AMPK (PARK et al., 2017).

Finalizando, nesta seção foram demonstrados os principais estudos que evidenciaram o envolvimento da AMPK nas funções biológicas exercidas pelo sulfeto de hidrogênio, óxido nítrico e monóxido de carbono. Embora muitas pesquisas tenham sido realizadas nos últimos anos tendo como foco esses mecanismos, até o presente momento nenhuma publicação descreveu o envolvimento da AMPK nos efeitos gastroprotetores desses mediadores gasosos, deixando uma lacuna aberta para investigações futuras.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Investigar se a Proteína Cinase Ativada por AMP (AMPK) apresenta efeito gastroprotetor e se está envolvida na gastroproteção mediada por H₂S, NO e CO na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do AICAR (ativador da AMPK) ou do Composto C (inibidor da AMPK) em modelo de lesão gástrica induzida por etanol 50% em camundongos;
- Analisar o efeito da ativação da AMPK sobre os níveis gástricos de H₂S, nitrato / nitrito e de bilirrubina através da dosagem desses mediadores gasosos em homogenatos de tecido gástrico de camundongos;
- Avaliar o efeito da ativação da AMPK na presença dos inibidores enzimáticos de H₂S, NO ou CO na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos através da avaliação macroscópica e histológica das lesões;
- Investigar o envolvimento da AMPK na proteção gástrica mediada por H₂S, NO e CO em modelo de lesão gástrica induzida por etanol, por meio da avaliação macroscópica e histológica das lesões;
- Demonstrar o efeito da inibição da AMPK sobre os níveis de H₂S, nitrato/nitrito e de bilirrubina em homogenatos gástricos de camundongos tratados com doadores ou substratos para a síntese dos mediadores gasosos (H₂S, NO e CO);

- Verificar a expressão da AMPK em amostras gástricas de animais submetidos ao tratamento com doadores de H₂S, NO e CO na lesão gástrica induzida por etanol, através da técnica de imunohistoquímica;

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DROGAS E REAGENTES

O Hidrossulfeto de sódio (NaHS) e o Reagente de Lawesson, ambos doadores de sulfeto de hidrogênio, DL-propargilglicina (PAG, inibidor da enzima cistationina-γ-liase), o Nitroprussiato de sódio (NPS, doador de óxido nítrico), a L-arginina (substrato para a síntese de óxido nítrico), L-NG-nitro-arginina metil éster (L-NAME, inibidor da síntese de óxido nítrico), Dímero de tricarbonildicloro rutênio II (CORM-2, doador de monóxido de carbono), Hemina (substrato da enzima HO-1 para a síntese de monóxido de carbono), Zinco protoporfirina IX (ZnPP IX, inibidor da síntese de monóxido de carbono), AICAR (ativador da AMPK) e o Composto C (inibidor da AMPK) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

O ZnPP IX foi dissolvido em 50 mM de Na₂CO₃, a Hemina em 1 mM de NaOH, o CORM-2 foi diluído em DMSO a 1% e o Composto C em PBS. As demais drogas foram dissolvidas em salina 0,9%.

3.2. ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos (variedade Swiss) pesando entre 25-30 g de ambos os sexos provenientes do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos em gaiolas e acondicionados no laboratório com temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo de 12 h claro/12 h escuro, com livre acesso a ração (dieta padrão) e água *ad libitum*. Cada grupo experimental consistiu de 5 a 6 animais e os controles utilizados foram etanol (agente indutor de lesões gástricas) e salina. Antes dos experimentos os animais foram submetidos a jejum de 18 a 20 horas, mas com livre acesso ao consumo de água. Os procedimentos e os protocolos experimentais usados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Piauí (protocolo n° 228/2016).

3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Para verificar o envolvimento da AMPK no efeito gastroprotetor dos mediadores gasosos (H₂S, NO e CO) os grupos experimentais foram divididos conforme representado no delineamento experimental da figura 10. Foram realizados quatro protocolos experimentais, onde no primeiro foi avaliada a interação entre AMPK e H₂S. Para isso, os animais foram pré-tratados com o inibidor da AMPK (Composto C) seguido ou não dos doadores de H₂S (NaHS ou Reagente de Lawesson). Outro grupo experimental foi tratado com o inibidor da síntese de H₂S (PAG) e posteriormente recebeu AICAR.

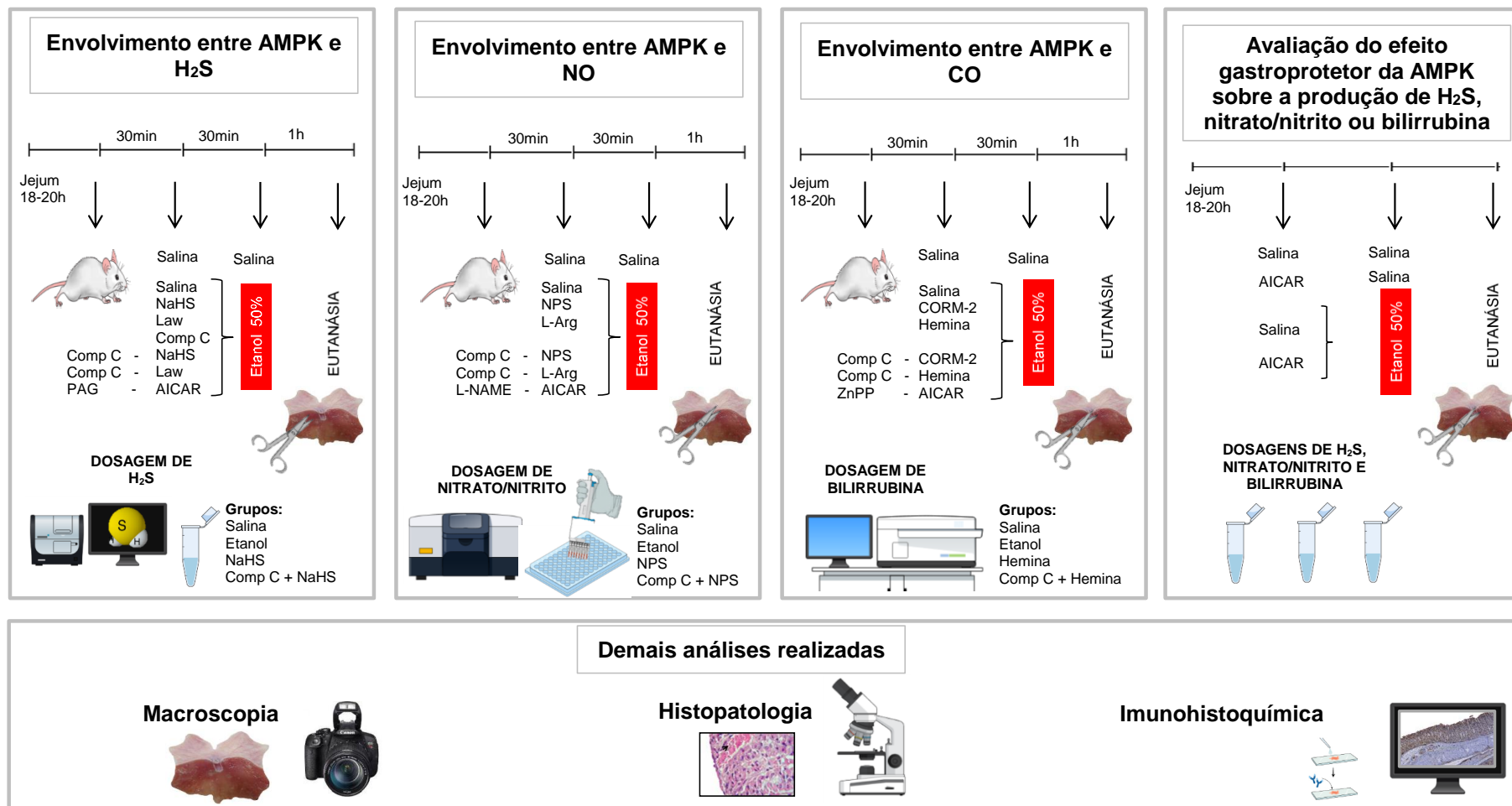
No segundo protocolo, investigou-se a interação entre AMPK e NO e, para isso os animais foram também tratados com um doador ou um substrato para a síntese de NO (NPS ou L-arginina, respectivamente) na presença ou não do pré-tratamento com o inibidor da AMPK. Outro grupo de animais recebeu L-NAME seguido por AICAR.

No terceiro grupo experimental foi avaliada a interação entre AMPK no efeito gastroprotetor do CO. Assim, os animais foram tratados com um doador de CO (CORM-2) ou com um substrato para a síntese desse mediador gasoso (hemina) na presença ou não do inibidor da AMPK. Outro grupo de animais foram tratados com ZnPP IX seguido por AICAR.

No quarto protocolo foi avaliado o efeito da ativação da AMPK, pelo AICAR, no tecido gástrico de camundongos tanto na proteção gástrica quanto na capacidade de estimular a produção de mediadores gasosos. Após 30 minutos de cada tratamento os animais receberam etanol 50% por via oral (exceto o grupo salina e um grupo AICAR) e após 1 hora foram eutanasiados e as amostras de tecido gástrico foram utilizadas para análises posteriores, incluindo a avaliação histopatológica, quantificação da produção de H₂S, nitrato /nitrito e de bilirrubina e para a verificação da expressão da AMPK no tecido gástrico dos camundongos que foram tratados com AICAR, NaHS, NPS ou CORM-2 na lesão por etanol (Figura 10). É importante destacar que o intervalo entre cada um dos tratamentos de todos os grupos experimentais foi de 30 minutos.

Figura 10: Representação esquemática do delineamento experimental realizado.

Estudo do envolvimento entre AMPK e mediadores gasosos (H₂S, NO e CO) na lesão gástrica por etanol em camundongos.



3.3.1. Lesão gástrica induzida por etanol

Após o jejum de 18 a 20 horas, os grupos de animais receberam etanol na concentração de 50% (0,5 ml/25 g) por via oral e foram eutanasiados 1 hora depois. Posteriormente, foi feita uma laparotomia mediana e os estômagos foram excisados e abertos ao longo da curvatura maior, lavados com água corrente e estendidos sobre uma placa, onde foram fotografados com câmera digital (Canon Profissional Eos Rebel EF-S 18-135, 18MP) para posterior análise e medições das alterações macroscópicas com uso de um programa de planimetria computadorizada (Image J). Os dados referentes à área da lesão gástrica foram transferidos para o Software GraphPad Prism versão 6.0 para a realização da análise estatística. Os fragmentos de tecidos gástricos foram pesados e armazenados sob refrigeração para análises posteriores (MEDEIROS et al., 2009).

3.3.2 Protocolo I – Avaliação do envolvimento da AMPK no efeito gastroprotetor do H₂S na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

Os camundongos foram tratados por via oral com NaHS (150 µmol/kg, MEDEIROS et al., 2009) ou reagente de Lawesson (27 µmol/kg, MEDEIROS et al., 2009). Outros grupos receberam Composto C (10 mg/Kg i. p, RIOS et al., 2013) + NaHS ou Composto C + reagente de Lawesson ou PAG (50 mg/Kg, v.o, MEDEIROS et al., 2009) + AICAR (20 mg/Kg, i.p, BUENO JÚNIOR et al., 2012). Trinta minutos depois as lesões gástricas foram induzidas por etanol conforme descrito no tópico 3.3.1. Alguns fragmentos de tecidos foram armazenados em formol a 10% para serem usados para a avaliação histológica e para imunohistoquímica da expressão da AMPK. Amostras também foram imediatamente utilizadas para a quantificação de H₂S (GU et al., 2013).

3.3.3 Protocolo II – avaliação do envolvimento da AMPK no efeito gastroprotetor do NO na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

Neste protocolo experimental, os camundongos foram tratados com NPS (10 mg/Kg v.o, SILVA et al., 2015), L-Arginina (200 mg/Kg i. p, MEDEIROS et al., 2008) ou com L-NAME (10 mg/Kg, i. p, SILVA et al., 2014) ou um volume equivalente de

seus respectivos veículos. Outros grupos receberam Composto C + NPS, Composto C + L-arginina ou L-NAME + AICAR. Trinta minutos depois, o etanol foi administrado conforme descrito no tópico 3.3.1. Os fragmentos de tecido gástrico foram utilizados para a avaliação histológica, análise da expressão da AMPK ou para a quantificação dos níveis de nitrato/nitrito (GREEN et al., 1982).

3.3.4 Protocolo III – avaliação do envolvimento da AMPK no efeito gastroprotetor do CO na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

Os animais foram tratados com CORM-2 (5 mg / kg v.o, MAGIEROWSKA et al., 2015), hemina (10 mg / kg, v.o, GOMES et al., 2010), ou ZnPP IX (3 mg / Kg i.p, MAGIESROWSKA et al., 2016). Outros grupos receberam Composto C + CORM-2, Composto C + hemina ou ZnPP IX + AICAR. Trinta minutos depois as lesões gástricas foram induzidas por etanol conforme relatado no tópico 3.3.1. Alguns fragmentos de tecidos gástricos foram utilizados para avaliação histopatológica bem como para análise da expressão da AMPK ou dos níveis de bilirrubina (FORESTI et al., 2003).

3.3.5 Protocolo IV – avaliação do efeito gastroprotetor da AMPK sobre a produção de H₂S, nitrato/nitrito ou de bilirrubina em homogenatos gástricos de camundongos

Neste protocolo, os animais foram pré-tratados por via intraperitoneal com AICAR (20 mg/Kg) seguido ou não do tratamento com etanol. Uma hora depois os animais foram eutanasiados e os seus estômagos foram removidos, conforme citado no tópico 3.3.1. Em seguida, as amostras foram utilizadas para a análise histológica e para verificar a possibilidade da produção de sulfeto de hidrogênio (GU et al., 2013), de nitrato / nitrito (GREEN et al., 1982) ou de bilirrubina (FORESTI et al., 2003) no tecido gástrico dos animais. Além disso, foi avaliada a expressão da AMPK nos tecidos gástricos de animais tratados com AICAR + etanol.

3.3.6 Avaliação histológica das lesões gástricas

Fragmentos do estômago dos animais foram colhidos e fixados em formol a 10 % por 24 horas, para análise histológica. O material biológico foi desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico, processado e emblocados em parafina. As secções de quatro micrômetros de espessura foram desparafinadas, coradas com hematoxilina e eosina, e depois examinadas sob microscópio óptico. As amostras de tecido gástrico foram avaliadas de acordo com critérios previamente descritos por Laine e Weinstein (1988), onde foram atribuídas pontuações nos seguintes parâmetros: lesão hemorrágica (pontuação de 0-4), edema (pontuação de 0- 4), perda de células epiteliais (pontuação 0-3) e presença de células inflamatórias (pontuação de 0-3), obtendo-se uma pontuação máxima de 14, conforme pode ser observado nas tabelas de 1 a 4.

3.3.7 Determinação dos níveis de sulfeto de hidrogênio no tecido gástrico de camundongos

As amostras de estômagos de animais que foram tratados com AICAR, NaHS ou com Composto C + NaHS, foram obtidas por meio do procedimento previamente descrito no item 3.3.2. Ambas foram utilizadas para determinar os níveis de H₂S de acordo com o método descrito por Gu e colaboradores (2013). Este método permite quantificar indiretamente os níveis de H₂S teciduais por meio da utilização de um tampão antioxidante diluído na amostra de interesse. Esse tampão contém salicilato de sódio, ácido ascórbico e NaOH, que convertem todo o H₂S no íon S²⁻, que é então mensurado por um microeletrodo de íon sulfeto. Inicialmente, as amostras foram pesadas e homogeneizadas no tampão antioxidante diluído para se obter um homogenato a 10%. No homogenato de cada amostra foi então inserido o microeletrodo de íon sulfeto (Lazar Research Laboratories, Los Angeles, CA, EUA) ligado a um medidor de pH modelo 6230M (Jenco Instruments), seguindo as especificações do fabricante. As soluções padrões para a curva de calibração foram preparadas usando-se o NaHS como doador de sulfeto.

3.3.8 Dosagem dos níveis de nitrato/nitrito no tecido gástrico de camundongos

A produção de óxido nítrico no tecido gástrico dos animais foi avaliada indiretamente por meio da quantificação dos níveis gástricos de nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻) (coletivamente denominados como NOx), utilizando a reação de Griess. As amostras de tecidos gástricos dos animais controles e dos que foram tratados com AICAR, com NPS ou com Composto C + NPS foram maceradas em solução de cloreto de potássio (KCl, 0,15 M) e o homogenato foi centrifugado sob refrigeração. Em seguida, o sobrenadante (100 µL) foi misturado com o reagente de Griess (100 µL) (ácido fosfórico, sulfanilamida e di-hidrocloreto de N- (1-naftil) etilenodiamina). Após 10 min, a absorbância das amostras foi medida a 540 nm. Os resultados foram expressos como micromoles de nitrito e nitrato (NOx) (GREEN et al., 1982).

3.3.9 Determinação dos níveis de bilirrubina no tecido gástrico de camundongos

A produção de monóxido de carbono no tecido gástrico dos camundongos foi avaliada indiretamente por meio da dosagem de bilirrubina, pois quando esse pigmento é produzido também ocorre a produção de ferro livre (Fe²⁺) e de monóxido de carbono através do metabolismo do heme (GOMES et al., 2010). Resumidamente, 100 mg de tecidos gástricos congelados foram homogeneizados em 1 ml de solução salina. Foram adicionadas alíquotas de 500 µl do homogenato a 250 mg de BaCl₂ e misturou-se completamente com o auxílio de um vórtex, conforme descrito por Foresti et al, (2003) com algumas modificações. Em seguida, adicionou-se 0,75 ml de benzeno à mistura, e os tubos foram novamente misturados vigorosamente com o vórtex. A fase benzênica contendo a bilirrubina extraída foi separada da fase aquosa por centrifugação a 13 000 RPM durante 30 min. Uma curva padrão de bilirrubina foi obtida a partir da bilirrubina comercial (8,6 mg / dL) (Labtest, Brasil). A bilirrubina foi medida espectrofotometricamente, com a diferença de absorbância entre 450 e 600 nm e expressa como mg / dL (FORESTI et al., 2003).

3.3.10 Imunohistoquímica para AMPK α e AMPK fosforilada no tecido gástrico de camundongos

As amostras gástricas de camundongos tratados com AICAR, NaHS, NPS ou CORM-2 na lesão gástrica induzida por etanol foram avaliadas para a expressão da AMPK por meio da técnica de imunohistoquímica. As lâminas que foram montadas a partir dos blocos de parafina para as análises histológicas foram desparafinizadas e, em seguida hidratadas. Posteriormente essas lâminas foram submetidas ao processo de recuperação antigênica em pH alto (PT link 10027, Dako) por um período de 1 hora e 30 minutos em temperaturas variando de 65 a 99 °C. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (EnVision Flex Peroxidase Blocking, Dako) e depois foi adicionado o anticorpo primário anti-AMPK α (Mouse monoclonal, 1:400, Abcam) ou o anticorpo anti-AMPK fosforilada (Rabbit policlonal, 1:100, Abcam) . Os anticorpos foram incubados por 20 minutos e logo depois se prosseguiu com a incubação secundária (HRP EnVision, Dako). A revelação foi feita com cromógeno 3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB) (EnVision DAB + Dako), que forneceu a lâmina a cor marrom típica da reação e a contra coloração foi feita com hematoxilina de Harry (Heamatoxylin EnVisionFlex Dako). As lâminas de controle negativo foram processadas ao mesmo tempo como descrito, mas sem o uso dos respectivos anticorpos. Este protocolo foi executado de acordo com especificações dos fabricantes de anticorpos e dos respectivos reagentes usados.

3.3.11 Análise da imunohistoquímica para AMPK fosforilada

As imagens para a análise foram adquiridas de uma câmera com um sistema de aquisição LAZ 3.5 (LEICA DM1000, Alemanha) acoplado a um microscópio de luz. As imagens microscópicas resultantes foram submetidas a subtração de fundo e correção de cor. A intensidade de coloração da AMPK foi estimada com o software ImageJ versão 2.1, de acordo com o método qualitativo e não subjetivo descrito por Ruifrok e Johnston (2001). Os vetores de componentes de hematoxilina e DAB foram separados em imagens de seção, com uma ampliação final de 100 x, pelo plugin ImageJ Color deconvolution (H-DAB). Este método demonstra uma correlação linear entre o aumento da concentração de anticorpos e o peso DAB (DABwt) (HARFORD-WRIGHT et al., 2014). Os resultados foram expressos como DABwt%.

3.4. Análise estatística

Os dados foram apresentados como a média (\pm EPM) de 5 a 6 animais em cada grupo. Os testes estatísticos foram realizados no software Graphpad Prism (versão 6.0). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi determinada por análise unidirecional de variância (ANOVA) seguida do teste de múltiplas comparações de Student-Newman-Keuls. Para a análise histológica os dados foram apresentados como medianas com os escores mínimos e máximos e foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Resultados

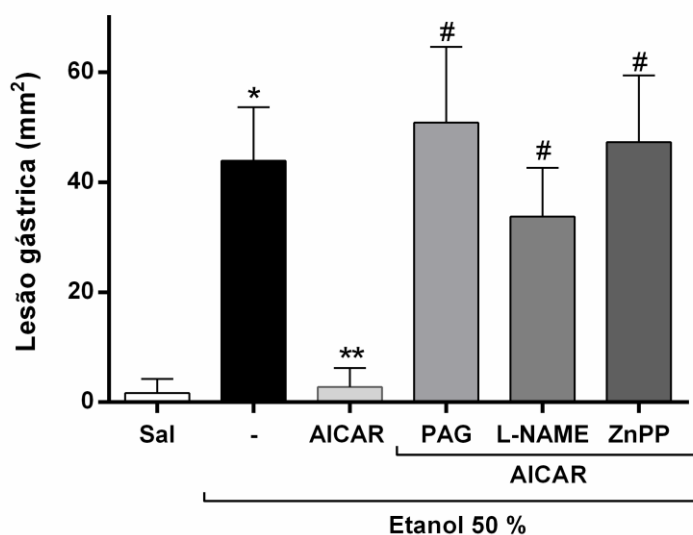
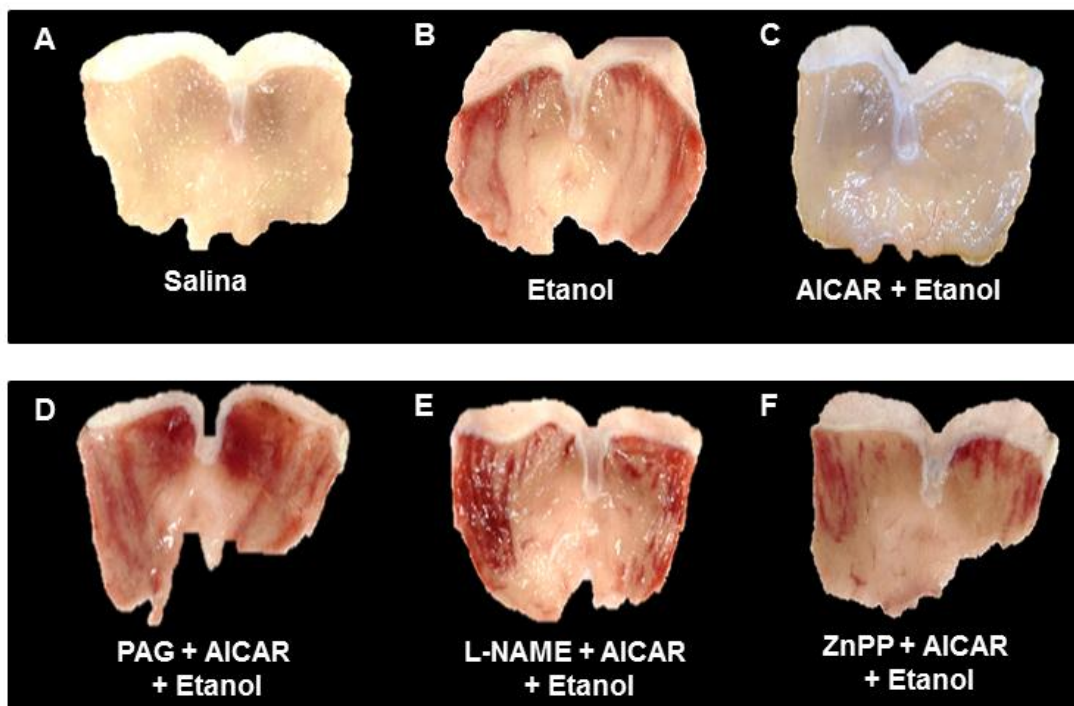
4 RESULTADOS

4.1. O EFEITO GASTROPROTETOR DA AMPK É DEPENDENTE DO SULFETO DE HIDROGÊNIO, DO ÓXIDO NÍTRICO E DO MONÓXIDO DE CARBONO.

4.1.1. A inibição de H₂S, NO e CO no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor da AMPK: avaliação macroscópica.

A figura 11 demonstra que o tratamento com etanol 50% (0,5 mL por 25 g) promoveu a formação de extensas lesões macroscópicas na mucosa gástrica de camundongos ($43,89 \pm 4,36 \text{ mm}^2$, figura 11 B) quando comparado com o grupo salina (figura 11 A). Observou-se também que o tratamento com AICAR ($2,74 \pm 1,23 \text{ mm}^2$, figura 11 C) protegeu significativamente o tecido gástrico de camundongos com lesões induzidas por etanol ($p < 0,05$). Entretanto, evidenciou-se que o pré-tratamento com o inibidor de sulfeto de hidrogênio (PAG), com o inibidor da produção de óxido nítrico (L-NAME) ou com o inibidor da biossíntese de monóxido de carbono (ZnPP IX) reverteu significativamente ($P < 0,05$) o efeito gastroprotetor do AICAR ($50,83 \pm 6,16 \text{ mm}^2$, $33,77 \pm 5,11 \text{ mm}^2$, $47,30 \pm 6,06 \text{ mm}^2$, respectivamente, figuras 11 D-F).

Figura 11: Efeito do AICAR, ativador da AMPK, na presença dos inibidores de H₂S, NO ou CO na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

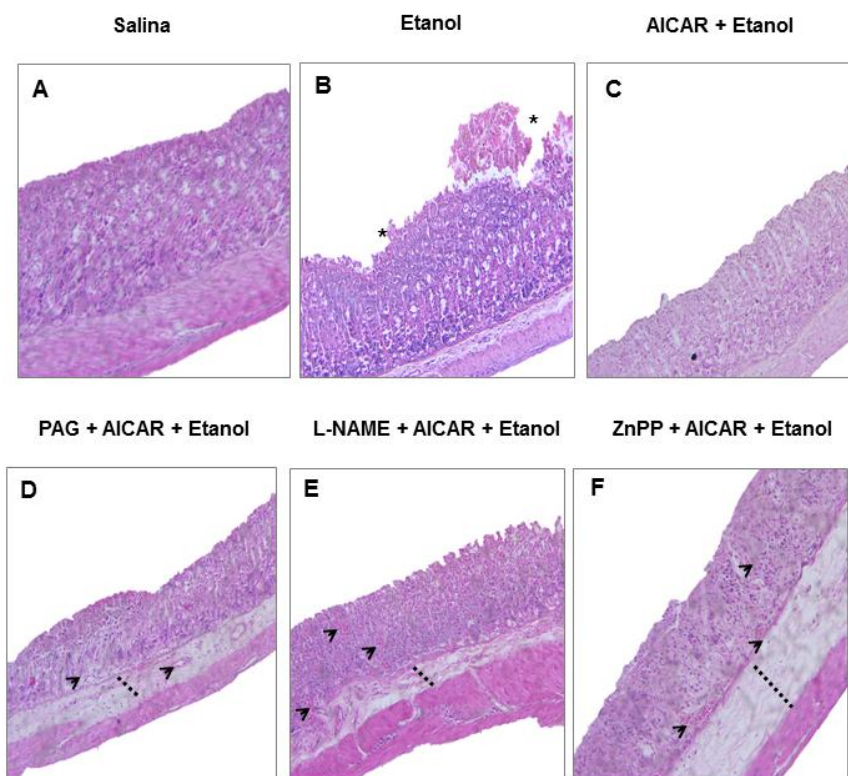


Legenda: Os animais foram pré-tratados apenas com salina ou com AICAR (20 mg/kg, i.p), na presença do etanol 50%. Em outros grupos experimentais, os camundongos foram tratados com PAG (50 mg/Kg, vo), L-NAME (10 mg/Kg, ip) ou ZnPP (3 mg/Kg ip) e após 30 min receberam AICAR. Depois de 30 min, as lesões gástricas foram induzidas com etanol e 1h depois os animais foram eutanasiados. Os resultados estão expressos como a média \pm EPM de 6-8 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus grupo salina, ** $p < 0,05$ versus grupo etanol, # $P < 0,05$ versus grupo AICAR (one-way ANOVA e pós-teste de Newman–Keuls). As figuras de A-F representam as alterações macroscópicas dos estômagos de camundongos submetidos aos tratamentos citados anteriormente.

4.1.2. A inibição de H₂S, NO e CO no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor da AMPK: avaliação histopatológica.

A tabela 1 demonstra os parâmetros histopatológicos de tecidos gástricos de camundongos tratados com AICAR, ativador da AMPK, na lesão gástrica induzida por etanol 50%. Observa-se que o etanol ocasiona extensas lesões microscópicas, caracterizadas por perda de células epiteliais (figura 12 B). Além disso, nota-se também que nas amostras gástricas de animais tratados com os inibidores de H₂S, de NO ou de CO apresentaram elevados danos histopatológicos provocados pelo etanol, e o efeito gastroprotetor do AICAR foi abolido (figuras 12 D-F, respectivamente).

Figura 12: Alterações histopatológicas no tecido gástrico de camundongos durante a avaliação do envolvimento entre AMPK e os mediadores gasosos (H₂S, NO e CO) na lesão induzida por etanol.



Legenda: A e B são imagens histológicas dos grupos controles (salina e etanol 50%, respectivamente). A imagem C se refere ao grupo experimental tratado com AICAR. As imagens D, E e F demonstram o tecido gástrico de animais pré-tratados com PAG, L-NAME ou ZnPP, respectivamente, seguido da administração de AICAR.. As imagens A e C evidenciam integridade do tecido gástrico dos animais. Entretanto, as imagens B,D,E e F demonstram perda de células epiteliais (asterisco), edema (linha tracejada) ou dano hemorrágico (setas). Ampliação: 100X.

Tabela 1: Avaliação histopatológica do envolvimento entre AMPK e mediadores gasosos (H₂S, NO e CO) em tecidos gástricos de camundongos submetidos à lesão por etanol.

Grupo experimental (n=6)	Lesão hemorrágica (escore 0–4)	Edema (escore 0–4)	Perda de células epiteliais (escore 0–3)	Células inflamatórias (escore 0–3)	Total (escores 14)
Salina	0 (0–0)	0 (0–1)	0 (0–1)	0 (0–0)	0 (0–2)
Etanol	2 (1–4)*	3 (2–4)*	2 (2–3)*	1 (0–1)	9 (8–11)*
AICAR+ etanol	0 (0–1)	1 (0–2)**	0 (0–2)**	0 (0–1)	1 (0–5)**
PAG + AICAR + etanol	3 (1–4)	2 (2–3)	2 (1–3)	0 (0–1)	7 (6–9)
L-NAME + AICAR + etanol	3 (3–4)#*	3 (2–4)*	2 (1–3)*	1 (0–1)	9 (9–10)#*
ZnPP + AICAR + etanol	2 (2–3)	3 (2–4)#*	2 (1–2)	1 (0–1)	8 (7–9)

Legenda: Os dados apresentados são medianas com os escores mínimos e máximos (indicados entre parênteses). O teste não paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do teste de Dunn, foram utilizados para as comparações múltiplas na avaliação histológica. (*) p<0,05, quando comparado com o grupo salina, (**) p<0,05, quando comparado com o grupo etanol, (#) p<0,05 quando comparado com o grupo pré-tratado com AICAR.

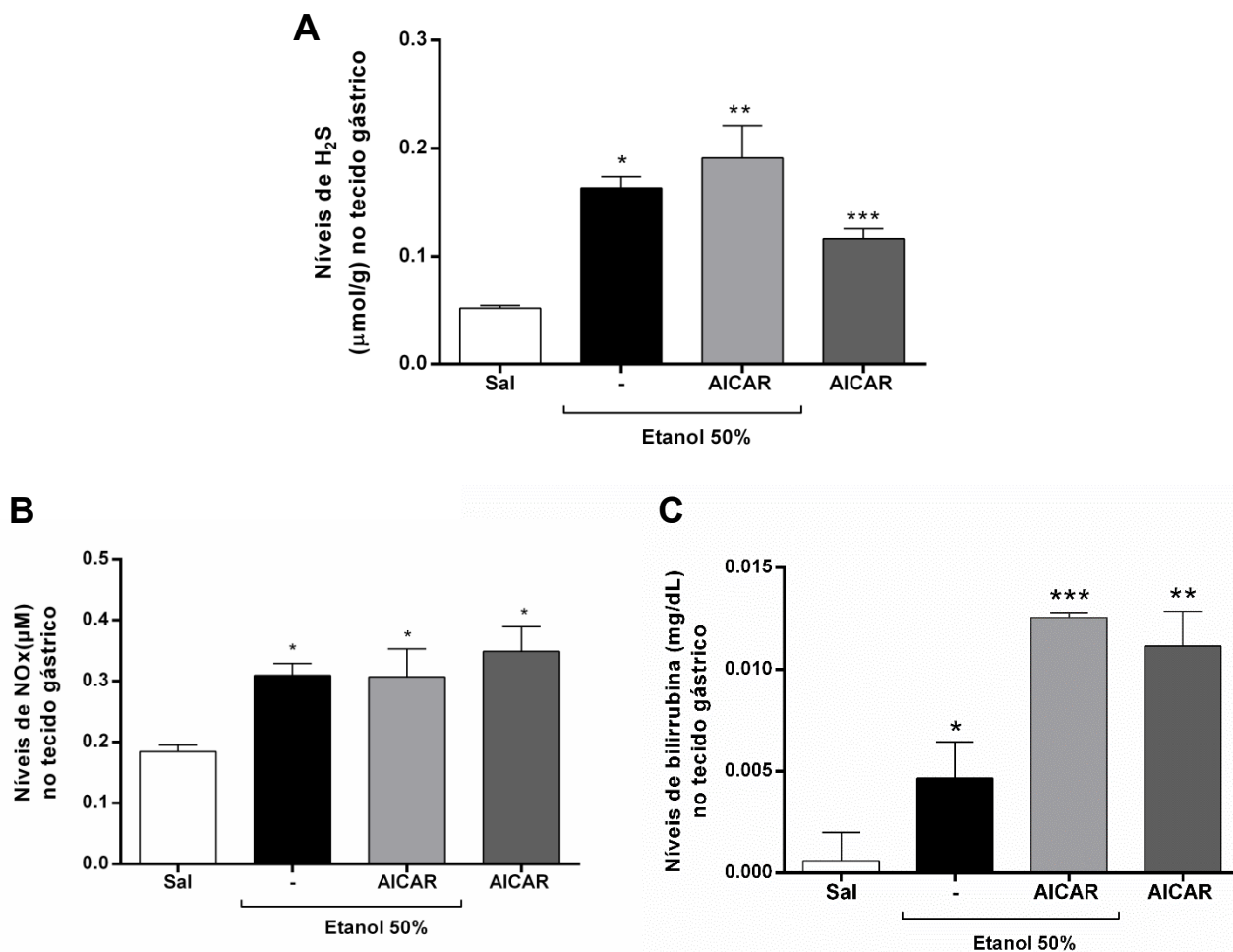
4.1.3. Efeito da ativação da AMPK sobre os níveis de H₂S, de bilirrubina e de nitrato/nitrito no tecido gástrico de camundongos.

A administração de AICAR aumentou significativamente os níveis de H₂S no tecido gástrico dos camundongos ($0,116 \pm 0,009 \mu\text{mol} / \text{g}$) quando comparado ao grupo salina ($0,051 \pm 0,002 \mu\text{mol} / \text{g}$). Além disso, os camundongos tratados apenas com etanol 50% também mostraram níveis significativamente elevados de H₂S ($0,163 \pm 0,010 \mu\text{mol} / \text{g}$) quando comparados com os grupos salina ou AICAR sozinho. O pré-tratamento com AICAR na presença de etanol 50% apresentou níveis significativamente maiores de H₂S ($0,190 \pm 0,030 \mu\text{mol} / \text{g}$) quando comparados ao grupo que recebeu apenas AICAR ($P < 0,05$) (figura 13 A).

Quanto aos níveis de nitrato/nitrito nos tecidos gástricos de camundongos, nota-se que o tratamento com o etanol elevou esses níveis ($0,38 \pm 0,02 \mu\text{M}$) quando comparado com o grupo salina ($0,24 \pm 0,02 \mu\text{M}$), sendo estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Entretanto, o tratamento apenas com AICAR ou com AICAR seguido de etanol não foi capaz de elevar os níveis do NO_x gástrico quando comparado com os grupos salina ou etanol (figura 13 B).

A análise da concentração de bilirrubina nos homogenatos de tecido gástrico mostrou que o AICAR aumentou os níveis desse pigmento ($0,0111 \pm 0,0007 \text{ mg/dl}$) quando comparado ao grupo salina ($0,0006 \pm 0,0006 \text{ mg/dl}$). Semelhantemente, o grupo etanol 50% também apresentou níveis significativamente aumentados de bilirrubina ($0,0046 \pm 0,0008 \text{ mg/dl}$) quando comparados ao grupo salina. O grupo AICAR, na presença de etanol 50%, apresentou níveis elevados de bilirrubina ($0,0124 \pm 0,0001 \text{ mg/dl}$) quando comparados aos grupos salina ou etanol, contudo, não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo AICAR sozinho (figura 13 C).

Figura 13: Avaliação da produção de H₂S, de nitrato/nitrito ou de bilirrubina após o tratamento com AICAR em homogenatos de tecido gástrico de camundongos.



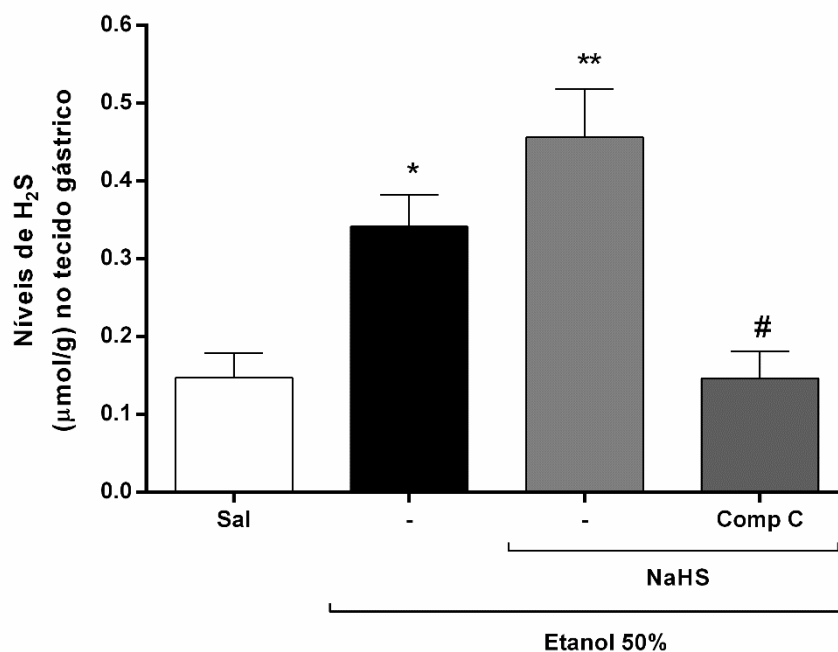
Legenda: Os camundongos foram tratados com salina, etanol 50%, AICAR (20 mg/kg, ip) ou AICAR + etanol (administrado 30 min depois). Os animais foram eutanasiados 1 h mais tarde e os homogenatos de tecido gástrico foram utilizados para quantificar os níveis de H₂S (A), nitrato/nitrito (B) ou de bilirrubina (C). Os resultados estão expressos como a média ± EPM de 7-8 animais por grupo. *P<0,05 versus grupo salina, ** ou *** p< 0,05 versus grupo etanol, **p< 0,05 versus o grupo AICAR sem etanol (apenas no gráfico A). (one-way ANOVA e pós-teste de Newman–Keuls).

4.2. O EFEITO GASTROPROTETOR DO SULFETO DE HIDROGÊNIO É DEPENDENTE DA AMPK.

4.2.1. A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o aumento dos níveis de H₂S produzidos pelo NaHS.

A figura 14 demonstra que a administração de NaHS aumentou significativamente os níveis de H₂S no tecido gástrico de camundongos ($0,45 \pm 0,06$ $\mu\text{mol /g}$) quando comparado ao grupo controle salina ($0,14 \pm 0,03$ $\mu\text{mol /g}$). Os animais tratados com etanol 50% também mostraram níveis significativamente elevados de H₂S ($0,34 \pm 0,04$ $\mu\text{mol /g}$) quando comparados ao grupo salina. Todavia, a administração do Composto C, inibidor da AMPK, reverteu o efeito do NaHS ($0,14 \pm 0,03$ $\mu\text{mol /g}$) na produção de H₂S.

Figura 14: Análise da concentração de H₂S em homogenatos de tecidos gástricos de camundongos.

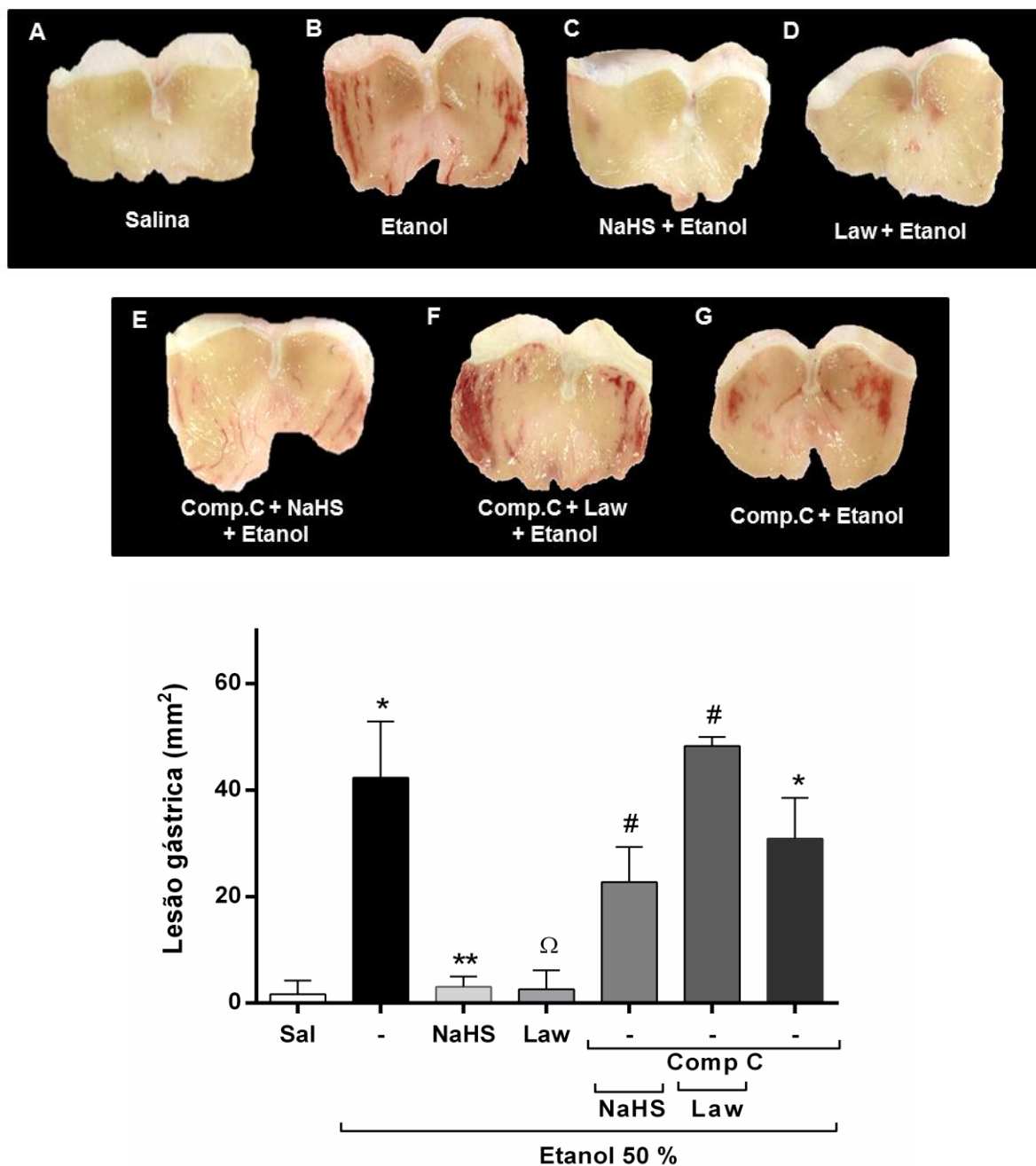


Legenda: Efeitos do NaHS (150 µmol/kg, vo) ou Comp C (10 mg/kg, i.p) + NaHS na produção de H₂S no tecido gástrico. O grupo controle negativo recebeu apenas solução salina (Sal). Entretanto, após 30 minutos os demais grupos foram submetidos ao tratamento com etanol 50% para indução das lesões gástricas. 1 h depois os animais foram eutanasiados. Os dados estão expressos como a média ± EPM de 5-6 camundongos por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman Keuls. As diferenças foram consideradas significativas: *p < 0.005 versus o grupo salina; **p < 0.005 versus os grupos salina e etanol; #p < 0.05 versus o grupo pré-tratado apenas com NaHS. Abreviatura: Comp C - Composto C.

4.2.2. A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor do H₂S: avaliação macroscópica.

A figura 15 demonstra que o tratamento com etanol 50% (0,5 mL por 25 g) promoveu a formação de extensas lesões macroscópicas na mucosa gástrica de camundongos ($39,6 \pm 3,49 \text{ mm}^2$, figura 15 B) quando comparado com o grupo salina (figura 15 A). Entretanto, o tratamento com NaHS ($3,08 \pm 0,84 \text{ mm}^2$, figura 15 C) ou Reagente de Lawesson (Law, $2,60 \pm 1,60 \text{ mm}^2$, figura 15 D) protegeram significativamente o tecido gástrico de camundongos com lesões induzidas pelo etanol ($P < 0.05$). Por outro lado, o pré-tratamento com o Composto C (Comp C) reverteu o efeito gastroprotetor do NaHS ($22,75 \pm 3,27 \text{ mm}^2$, figura 15 E) e do Law ($48,25 \pm 1,21 \text{ mm}^2$, figura 15 F). Além disso, o tratamento com o Comp C ($30,86 \pm 4,43 \text{ mm}^2$, figura 15 G) na presença do etanol, não apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo controle etanol.

Figura 15: Avaliação do envolvimento entre AMPK e H₂S na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

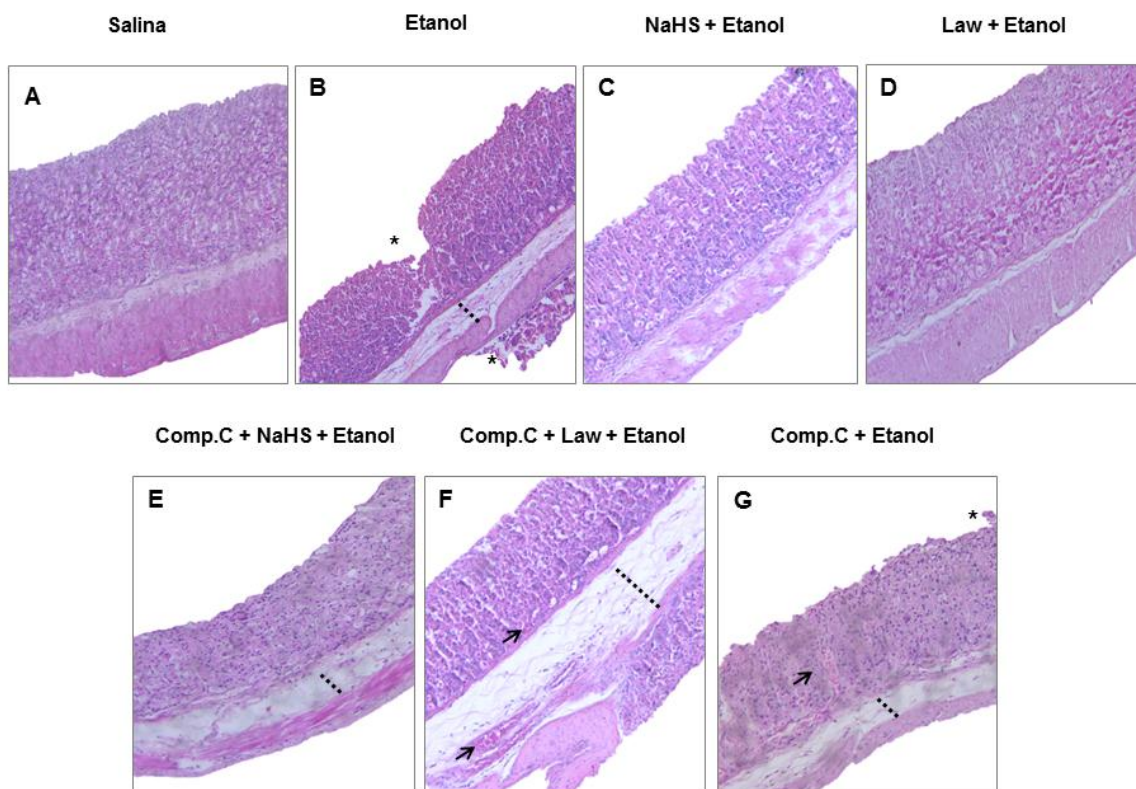


Legenda: Os animais foram tratados com salina, NaHS (150 µmol/kg, vo), Law (27 µmol/kg, vo) ou Comp C (10 mg/kg, i.p) + NaHS ou Comp C + Law. Após 30 min, a lesão gástrica foi induzida por etanol 50% e os animais foram eutanasiados 1 h depois. Os resultados são expressos como a média ± EPM de até 6 animais por grupo. * p<0,05 versus o grupo salina, ** ou Ω p< 0,05 versus o grupo etanol, # p<0,05 versus NaHS ou Law, (one-way ANOVA e pós-teste Newman–Keuls). As figuras de A-G representam as alterações macroscópicas dos estômagos de camundongos submetidos aos tratamentos citados anteriormente. Abreviaturas: Comp C - Composto C. Law- Reagente de Lawesson.

4.2.3. A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor do H₂S: avaliação histopatológica.

A tabela 2 demonstra os parâmetros histopatológicos de tecidos gástricos de camundongos tratados com doadores de H₂S na lesão gástrica induzida por etanol 50%. Observa-se que o etanol ocasiona extensas lesões microscópicas, caracterizadas por edema e perda de células epiteliais (figura 16 B). Entretanto, o pré-tratamento dos animais com doadores de sulfeto de hidrogênio (NaHS 150 µmol / kg e reagente de Lawessons 27 µmol / kg, figuras 16 C e D, respectivamente) diminuíram de forma significativa (p<0,05) esses danos histopatológicos provocados pelo etanol. Além disso, a administração de Comp C (10 mg / Kg i. p) reverteu o efeito gastroprotetor dos doadores de sulfeto de hidrogênio (figuras 16 E e F).

Figura 16: Alterações histopatológicas no tecido gástrico de camundongos durante a avaliação do envolvimento entre AMPK e sulfeto de hidrogênio na lesão induzida por etanol.



Legenda: A e B são imagens histológicas dos grupos controles (salina e etanol 50%, respectivamente). As imagens C e D referem-se aos grupos experimentais tratados com NaHS ou Law, respectivamente. As imagens E e F demonstram o tecido gástrico de animais pré-tratados com Comp C seguida da administração de NaHS ou Law, respectivamente. Além disso, demonstra-se a imagem histopatológica (G) de tecido gástrico de camundongos tratados apenas com Comp C na presença do etanol 50%. As imagens A, C e D evidenciam integridade do tecido gástrico dos animais. Entretanto, as imagens B, E, F e G demonstram perda de células epiteliais (asterisco), edema (linha tracejada) ou dano hemorrágico (setas). Ampliação: 100X. Abreviaturas: Comp C – Composto C. Reagente de Lawesson – Law.

Tabela 2: Avaliação histopatológica do envolvimento entre AMPK e H₂S em tecidos gástricos de camundongos submetidos à lesão por etanol.

Grupo experimental (n=6)	Lesão hemorrágica (escore 0–4)	Edema (escore 0–4)	Perda de células epiteliais (escore 0–3)	Células inflamatórias (escore 0–3)	Total (escores 14)
Salina	0 (0–0)	0 (0–1)	0 (0–1)	0 (0–0)	0 (0–2)
Etanol	1 (0–1)*	4 (3–4)*	3 (2–3)*	1 (0–1)	8 (6–9)*
NaHS + etanol	0 (0–1)	2 (0–2)**	1 (0–2)	0 (0–1)	3 (0–4)
Comp C + NaHS + etanol	1 (1–4)*	4 (2–4)*	2 (0–2)	0 (0–1)	6 (6–9)*
LAW + etanol	0 (0–1)	2 (1–2)	0 (0–1)**	0 (0–1)	3 (2–4)
Comp C + LAW + etanol	1 (1–3)	3 (2–4)*	2 (1–3)	0 (0–1)	8 (4–10)*
Comp C + etanol	2 (1–4)*	2 (2–4)	2 (1–3)	0 (1–1)	8 (5–10)*

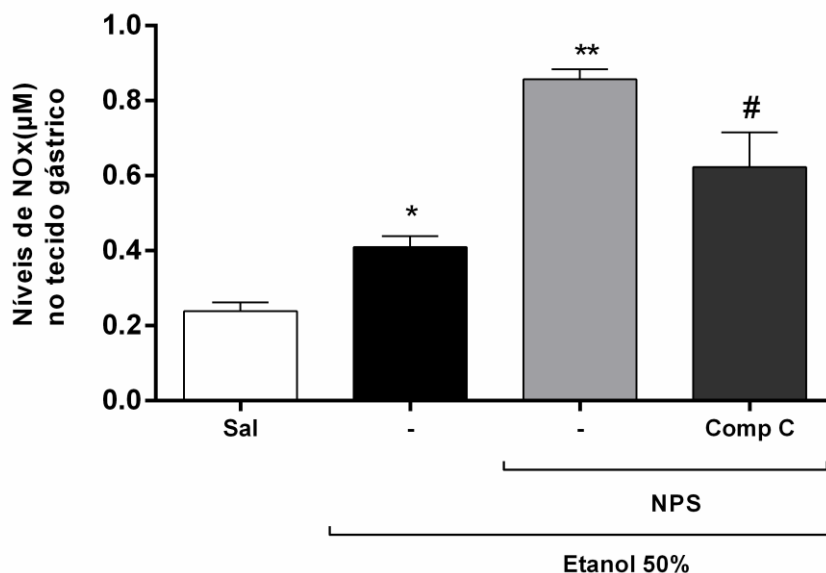
Legenda: Os dados apresentados são medianas com os escores mínimos e máximos, respectivamente (indicados entre parênteses). O teste não paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do teste de Dunn foi utilizado para as comparações múltiplas na avaliação histopatológica. (*) p<0,05, quando comparado com o grupo salina, (**) p<0,05, quando comparado com o grupo etanol.

4.3. O EFEITO GASTROPROTETOR DO ÓXIDO NÍTRICO É DEPENDENTE DA AMPK.

4.3.1. A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o aumento dos níveis de nitrato/nitrito produzidos pelo NPS.

A figura 17 demonstra que a administração de etanol 50% elevou os níveis gástricos de nitrato/nitrito (NO_x) ($0,40 \pm 0,02 \mu\text{M}$) quando comparados ao controle salina ($0,23 \pm 0,02 \mu\text{M}$). Além disso, o tratamento com NPS elevou ainda mais esses níveis ($0,85 \pm 0,02 \mu\text{M}$) quando comparado ao grupo controle etanol. Por outro lado, o pré-tratamento com Comp C reverteu o efeito do NPS, evidenciado pela diminuição significativa dos níveis do NO_x ($0,62 \pm 0,09 \mu\text{M}$) quando comparado com o grupo NPS.

Figura 17: Níveis de nitrato/nitrito em homogenatos de tecido gástrico de camundongos.

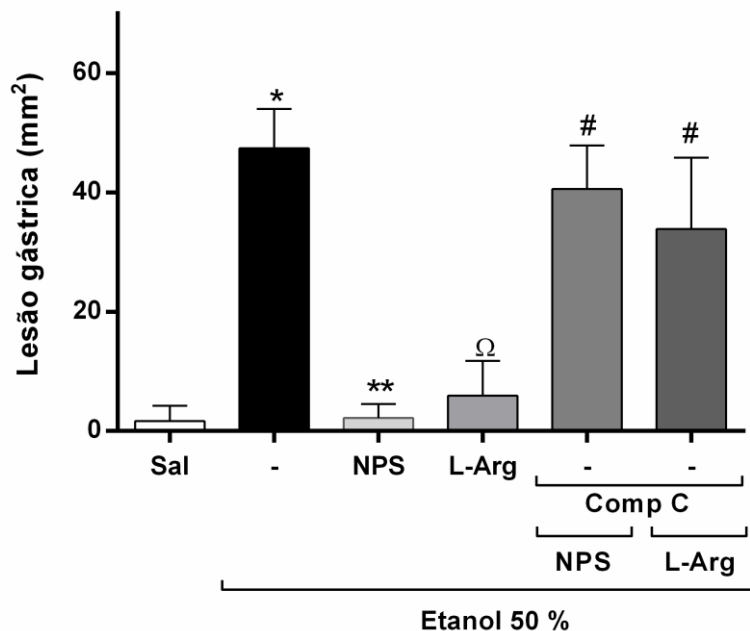
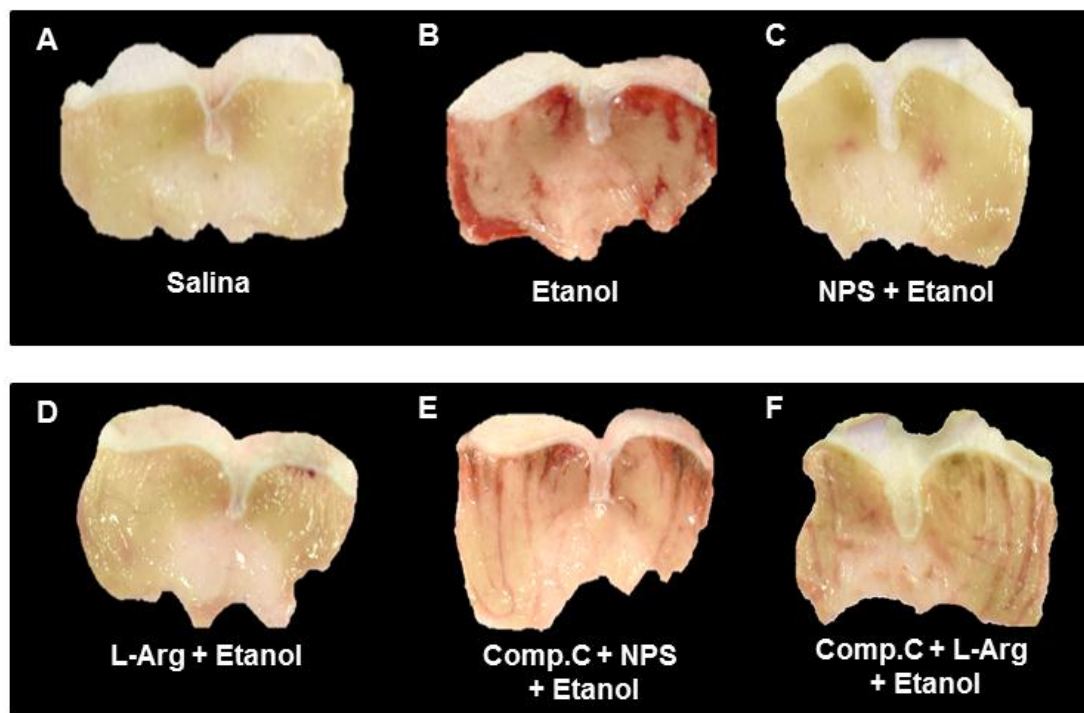


Legenda: Efeitos de NPS (10 mg/kg, vo) ou Comp C (10 mg/kg, ip) + NPS sobre os níveis de nitrato/nitrito no tecido gástrico de camundongos. O grupo controle negativo recebeu apenas solução salina (Sal). Contudo, após 30 min os demais grupos foram submetidos ao tratamento com etanol 50% para indução das lesões gástricas. 1 h depois os animais foram eutanasiados. Os dados estão expressos como a média \pm EPM de 5-6 camundongos por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguidos pelo pós-teste de Newman Keuls. As diferenças foram consideradas significativas: *p < 0,005 versus o grupo salina; **p < 0,005 versus os grupos salina e etanol; #p < 0,05 versus o grupo pré-tratado apenas com NPS. Abreviaturas: Comp C - Composto C.

4.3.2. A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor do NO: avaliação macroscópica.

A figura 18 demonstra que o tratamento com etanol 50% (0,5 mL por 25 g) promoveu a formação de extensas lesões macroscópicas na mucosa gástrica de camundongos ($47,38 \pm 3,30 \text{ mm}^2$, figura 18 B) quando comparado com o grupo salina (figura 18 A). Entretanto, o tratamento com NPS ($2,18 \pm 1,17 \text{ mm}^2$, figura 18 C) ou L-Arginina (L-Arg, $5,94 \pm 3,36 \text{ mm}^2$, figura 18 D) protegeu significativamente o tecido gástrico de camundongos com lesões induzidas por etanol ($P < 0.05$). Por outro lado, o pré-tratamento com Composto C (Comp C) reverteu o efeito gastroprotetor do NPS ($40,55 \pm 5,16 \text{ mm}^2$, figura 18 E) e da L-Arg ($33,85 \pm 6,90 \text{ mm}^2$, figura 18 F).

Figura 18: Avaliação do envolvimento entre AMPK e NO na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

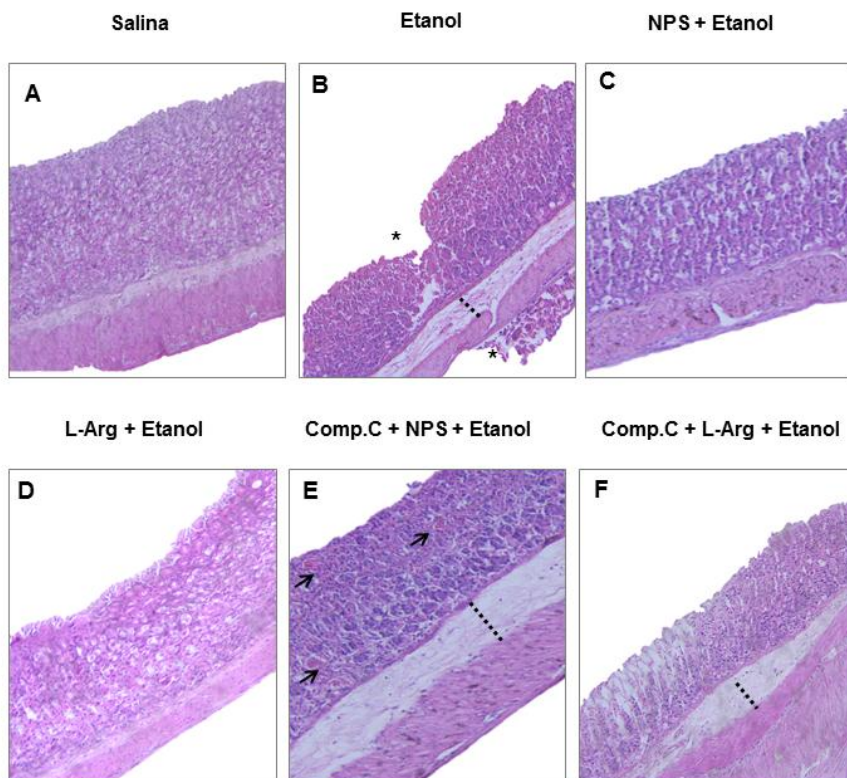


Legenda: Os animais foram tratados com salina, NPS (10 mg/kg, vo), L-arginina (200 mg/kg, i.p) ou Comp C (10 mg/kg, i.p) + NPS ou Comp C + L-arginina. Após 30 min, a lesão gástrica foi induzida por etanol 50% e os animais foram eutanasiados 1 h depois. Os resultados são expressos como a média \pm EPM de até 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus o grupo salina, ** ou Ω $p < 0,05$ versus o grupo etanol, # $p < 0,05$ versus NPS ou L-arginina (one-way ANOVA e pós-teste Newman-Keuls). As figuras de A-F representam as alterações macroscópicas dos estômagos de camundongos submetidos aos tratamentos citados anteriormente. Abreviaturas: NPS- Nitroprussiato de sódio; Comp C - Composto C.

4.3.3. A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor do NO: avaliação histopatológica.

A tabela 3 demonstra os parâmetros histopatológicos de tecidos gástricos de camundongos tratados com um doador de NO ou com um substrato para a síntese desse mediador gasoso na lesão gástrica induzida por etanol 50%. Observa-se que o etanol ocasiona extensas lesões microscópicas, caracterizadas por edema e perda de células epiteliais (figura 19 B). Entretanto, o pré-tratamento dos animais com um doador de óxido nítrico (NPS 10 mg/kg, v.o) ou com o substrato L-Arginina (200 mg/kg, i.p), demonstrados nas figuras 19 C e D, respectivamente) diminuíram de forma significativa ($p < 0,05$) esses danos histopatológicos provocados pelo etanol. Além disso, a administração de Comp C (10 mg/Kg, i.p) reverteu o efeito gastroprotetor do óxido nítrico neste tipo de lesão (figuras 19 E e F).

Figura 19: Alterações histopatológicas no tecido gástrico de camundongos durante a avaliação do envolvimento entre AMPK e óxido nítrico na lesão induzida por etanol.



Legenda: A e B são imagens histológicas dos grupos controles (salina e etanol 50%, respectivamente). As imagens C e D referem-se aos grupos experimentais tratados com NPS ou L-Arginina (L-Arg), respectivamente. As imagens E e F demonstram o tecido gástrico de animais pré-tratados com Comp C seguida da administração de NPS ou L-Arg, respectivamente. As imagens A, C e D evidenciam integridade do tecido gástrico dos animais. Entretanto, as imagens B, E e F demonstram perda de células epiteliais (asterisco), edema (linha tracejada) ou dano hemorrágico (setas). Ampliação: 100X. Abreviatura: Comp C – Composto C.

Tabela 3: Avaliação histopatológica do envolvimento entre AMPK e NO em tecidos gástricos de camundongos submetidos à lesão por etanol.

Grupo experimental (n=6)	Lesão hemorrágica (escore 0–4)	Edema (escore 0–4)	Perda de células epiteliais (escore 0–3)	Células inflamatórias (escore 0–3)	Total (escores 14)
Salina	0 (0–0)	0 (0–1)	0 (0–1)	0 (0–0)	0 (0–2)
Etanol	1 (0–1)*	4 (3–4)*	3 (2–3)*	1 (0–1)	8 (6–9)*
NPS + etanol	1 (0–2)	1 (0–1)**	0 (0–1)**	0 (0–1)	2 (0–4)
Comp C + NPS + etanol	2 (2–3)*	3 (2–4)*	1 (1–2)	1 (0–1)	7 (7–9)*
L-Arg + etanol	0 (0–2)	1 (0–2)**	0 (0–1)**	0 (0–1)	2 (1–3)**
Comp C + L-Arg + etanol	1 (0–3)	1 (1–3)	1(1–2)	0 (0–1)	5 (3–9)*

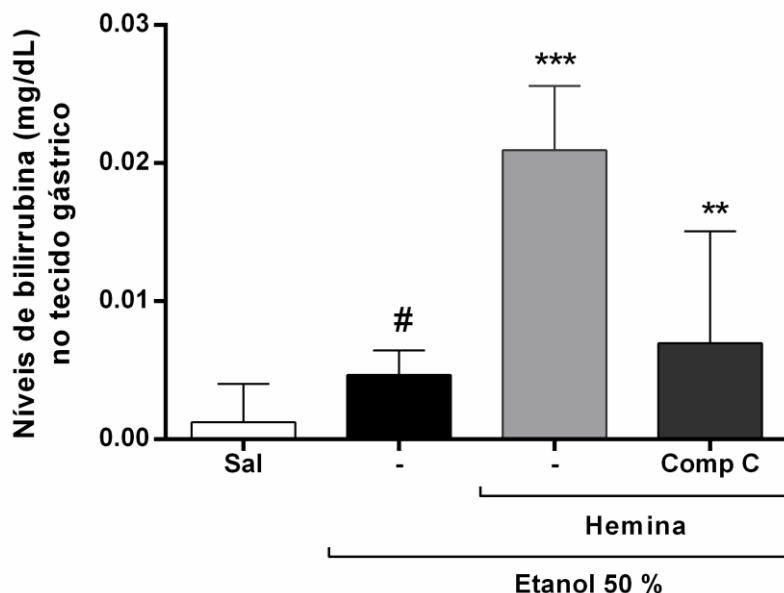
Legenda: Os dados apresentados são medianas com os escores mínimos e máximos, respectivamente (indicados entre parênteses). O teste não paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do teste de Dunn foi utilizado para as comparações múltiplas na avaliação histopatológica. (*) p<0,05, quando comparado com o grupo salina, (**) p<0,05, quando comparado com o grupo etanol.

4.4. EFEITO GASTROPROTETOR DO MONÓXIDO DE CARBONO É DEPENDENTE DA AMPK.

4.4.1. A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o aumento dos níveis de bilirrubina produzidos pela Hemina.

A figura 20 demonstra que a administração de Hemina, um substrato da HO-1, aumentou significativamente os níveis de bilirrubina no tecido gástrico de camundongos ($0,020 \pm 0,002$ mg /dl), quando comparado ao grupo controle salina ($0,0012 \pm 0,0012$ mg /dl). Os animais tratados com etanol 50% também mostraram níveis significativamente elevados de bilirrubina gástrica ($0,0046 \pm 0,0008$ mg/dl), quando comparados ao grupo salina. Entretanto, a administração do Composto C reverteu o efeito da Hemina ($0,006 \pm 0,004$ mg / dl) na elevação dos níveis desse pigmento.

Figura 20: Níveis de bilirrubina em homogenatos de tecido gástrico de camundongos.

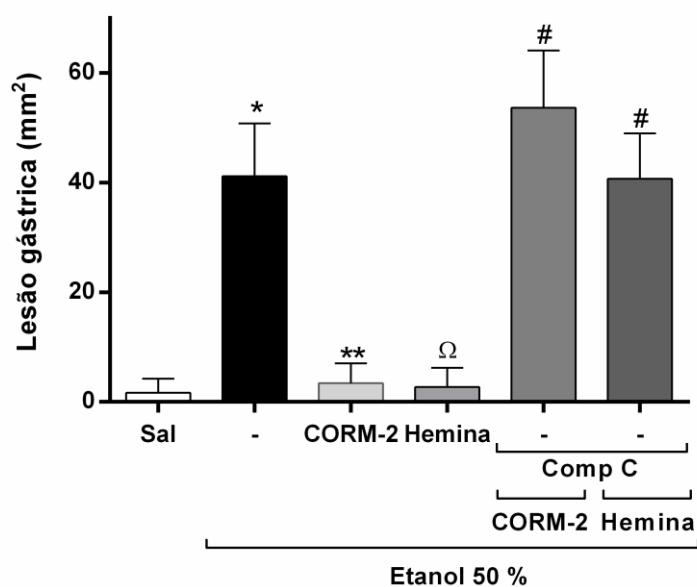
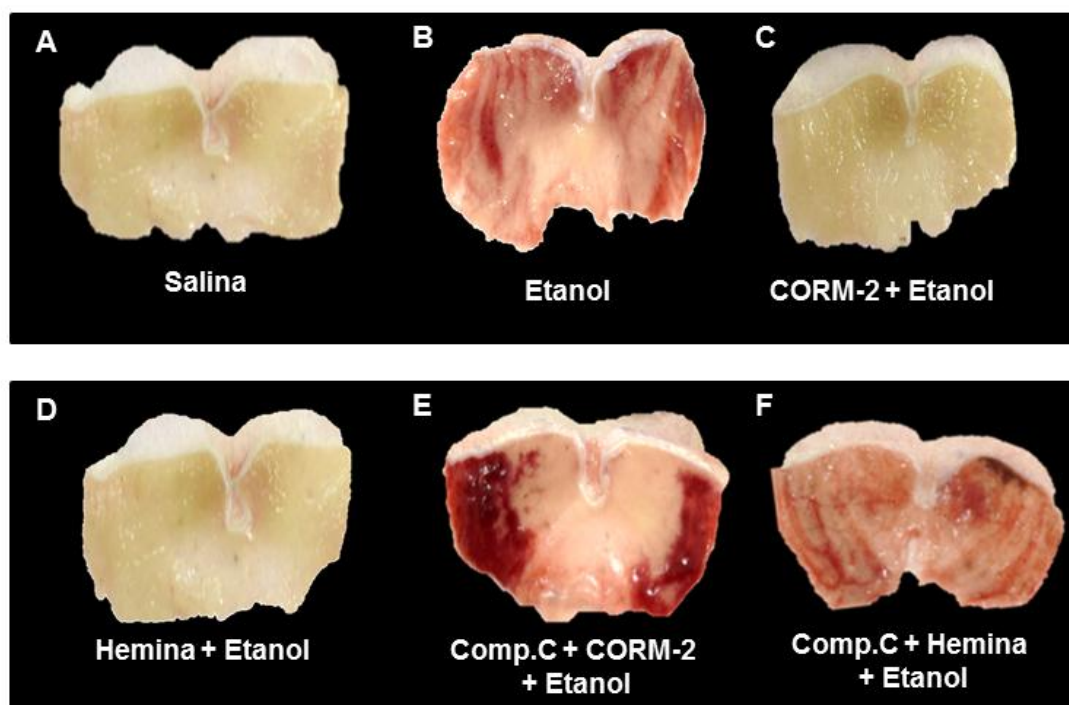


Legenda: Efeitos da Hemina (10 mg/kg, ip) ou Comp C (10 mg/kg, ip) + Hemina na produção de bilirrubina em homogenatos de tecido gástrico. O grupo controle negativo recebeu apenas solução salina (Sal). No entanto, após 30 min os demais grupos foram submetidos ao tratamento com etanol 50% para indução das lesões gástricas e 1 h depois os animais foram eutanasiados. Os dados estão expressos como a média \pm EPM de 5-6 camundongos por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguidos pelo pós-teste de Newman Keuls. As diferenças foram consideradas significativas: #p < 0,005 versus o grupo salina; ***p < 0,005 versus os grupos salina e etanol; **p < 0,05 versus o grupo pré-tratado apenas com Hemina. Abreviatura: Comp C - Composto C.

4.4.2. A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor do CO: avaliação macroscópica.

A figura 21 demonstra que o tratamento com etanol 50% (0,5 mL por 25 g) promoveu a formação de extensas lesões macroscópicas na mucosa gástrica de camundongos ($42,22 \pm 3,66 \text{ mm}^2$, figura 21 B) quando comparado com o grupo salina (figura 21 A). O tratamento com CORM-2 ($3,41 \pm 1,28 \text{ mm}^2$, figura 21 C) ou Hemina ($2,71 \pm 1,16 \text{ mm}^2$, figura 21 D) protegeu significativamente o tecido gástrico de camundongos com lesões induzidas pelo etanol ($P < 0,05$). Entretanto, o pré-tratamento com Composto C (Comp C) reverteu o efeito gastroprotetor do CORM-2 ($53,64 \pm 4,68 \text{ mm}^2$, figura 21 E) e da Hemina ($40,66 \pm 4,79 \text{ mm}^2$, figura 21 F).

Figura 21: Avaliação do envolvimento entre AMPK e CO na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

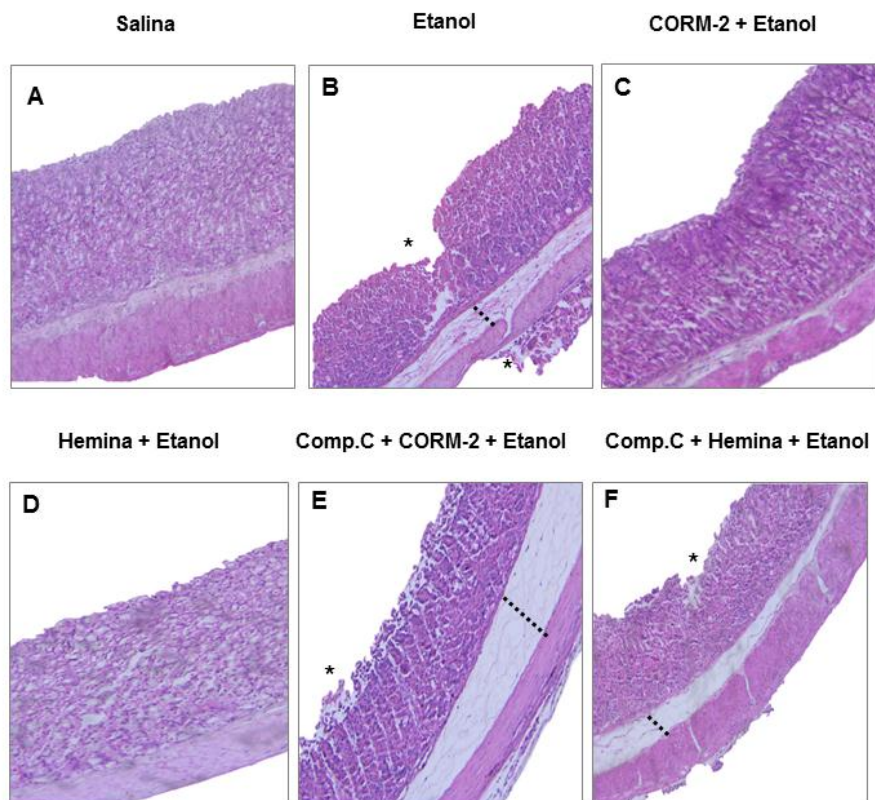


Legenda: Os animais foram tratados com salina, CORM-2 (5 mg/kg, vo), Hemina (10 mg/kg, i.p) ou Comp C (10 mg/kg, i.p) + CORM-2 ou Comp C + Hemina. Após 30 min, a lesão gástrica foi induzida por etanol 50% e os animais foram eutanasiados 1 h depois. Os resultados são expressos como a média ± EPM de até 6 animais por grupo. * p<0,05 versus o grupo salina, ** ou Ω p< 0,05 versus o grupo etanol, # p< 0,05 versus CORM-2 ou Hemina (one-way ANOVA e pós-teste Newman–Keuls). As figuras de A-F representam as alterações macroscópicas dos estômagos de camundongos submetidos aos tratamentos citados anteriormente. Abreviatura: Comp C – Composto C.

4.4.3. A inibição da AMPK no tecido gástrico de camundongos reverte o efeito gastroprotetor do CO: avaliação histopatológica.

A tabela 4 demonstra os parâmetros histopatológicos de tecidos gástricos de camundongos tratados com um doador de CO ou com um substrato para a síntese desse mediador gasoso na lesão gástrica induzida por etanol 50%. Observa-se que o etanol ocasiona extensas lesões microscópicas, caracterizadas por edema e perda de células epiteliais (figura 22 B). Entretanto, o pré-tratamento dos animais com um doador de monóxido de carbono (CORM-2 5 mg/kg, v.o) ou com o substrato Hemina (10 mg/kg, i.p), demonstrados nas figuras 22 C e D, respectivamente) diminuíram de forma significativa ($p < 0,05$) esses danos histopatológicos provocados pelo etanol. Além disso, a administração de Composto C (10 mg/Kg, i.p) reverteu o efeito gastroprotetor do monóxido de carbono neste tipo de lesão (figuras 22 E e F).

Figura 22: Alterações histopatológicas no tecido gástrico de camundongos durante a avaliação do envolvimento entre AMPK e monóxido de carbono na lesão induzida por etanol.



Legenda: A e B são imagens histológicas dos grupos controles (salina e etanol 50%, respectivamente). As imagens C e D referem-se aos grupos experimentais tratados com CORM-2 ou Hemina, respectivamente. As imagens E e F demonstram o tecido gástrico de animais pré-tratados com Comp C seguida da administração de CORM-2 ou Hemina, respectivamente. As imagens A, C e D evidenciam integridade do tecido gástrico dos animais. Entretanto, as imagens B, E e F demonstram perda de células epiteliais (asterisco), edema (linha tracejada) ou dano hemorrágico (setas). Ampliação: 100X. Abreviatura: Comp C – Composto C.

Tabela 4: Avaliação histopatológica do envolvimento entre AMPK e CO em tecidos gástricos de camundongos submetidos à lesão por etanol.

Grupo experimental (n=6)	Lesão hemorrágica (escore 0–4)	Edema (escore 0–4)	Perda de células epiteliais (escore 0–3)	Células inflamatórias (escore 0–3)	Total (escores 14)
Salina	0 (0–0)	0 (0–1)	0 (0–1)	0 (0–0)	0 (0–2)
Etanol	1 (0–1)*	4 (3–4)*	3 (2–3)*	1 (0–1)	8 (6–9)*
CORM-2 + etanol	0 (0–1)	0 (0–1)**	0 (0–1)**	0 (0–0)	2 (1–3)
Comp C + CORM-2 + etanol	2 (1–3)*	3 (2–4)*	2 (1–3)*	0 (0–1)	6 (6–9)*
Hemina + etanol	1 (0–2)	0 (0–1)**	1 (0–1)**	0 (0–1)	1 (0–4)**
Comp C + Hemina + etanol	2 (2–3)*	2 (2–3)*	2 (1–3)*	0 (0–1)	6 (5–9)*

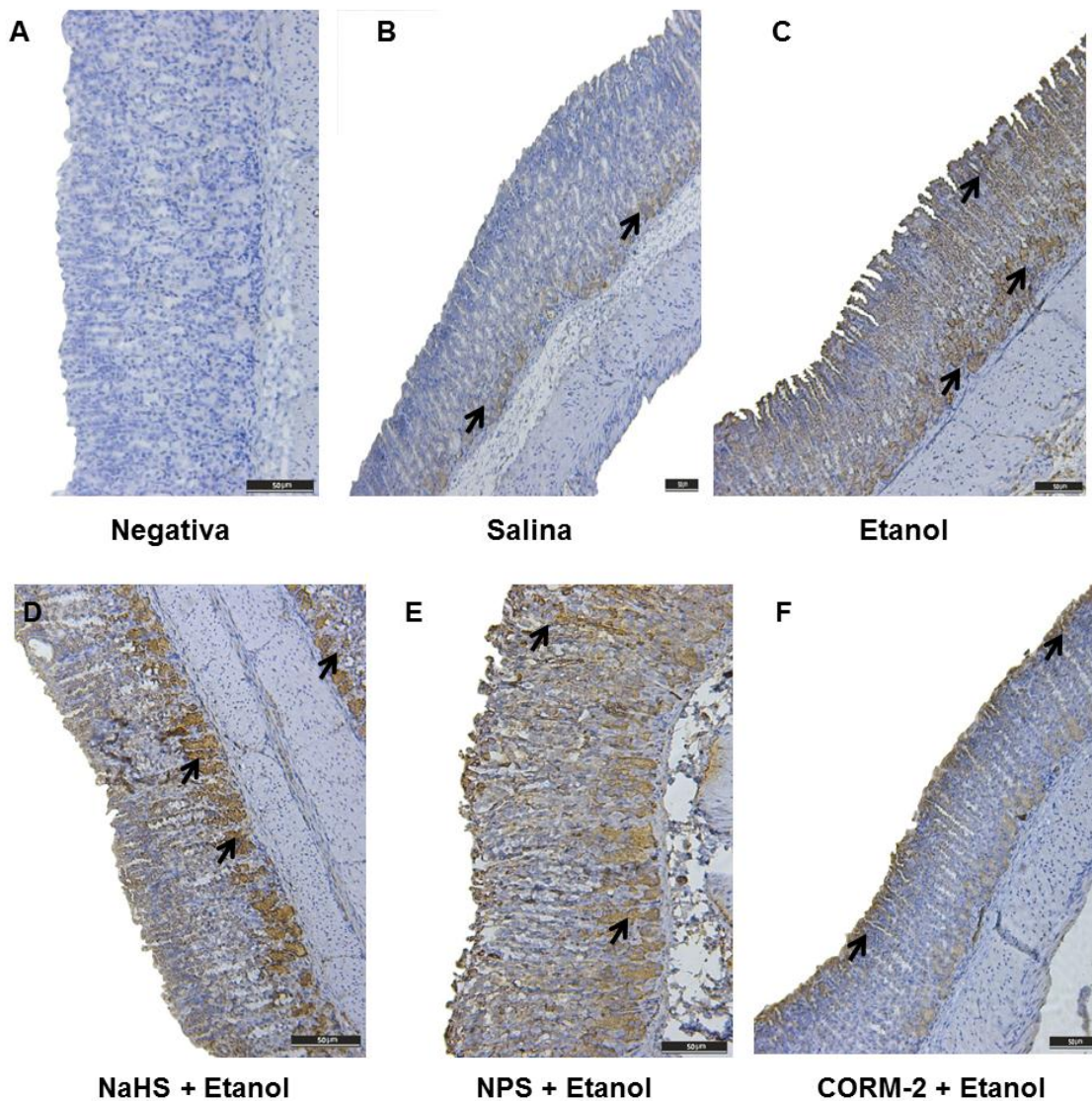
Legenda: Os dados apresentados são medianas com os escores mínimos e máximos, respectivamente (indicados entre parênteses). O teste não paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do teste de Dunn foi utilizado para as comparações múltiplas na avaliação histopatológica. (*) p<0,05, quando comparado com o grupo salina, (**) p<0,05, quando comparado com o grupo etanol.

4.5. OS DOADORES DE SULFETO DE HIDROGÊNIO, DE ÓXIDO NÍTRICO OU DE MONÓXIDO DE CARBONO AUMENTAM A EXPRESSÃO DA AMPK NO TECIDO GÁSTRICO DE CAMUNDONGOS.

4.5.1. NaHS, NPS ou CORM-2 aumentam a imunomarcção da AMPK α no tecido gástrico de camundongos.

Os tecidos gástricos de camundongos foram avaliados por meio de imunohistoquímica para determinar a localização da AMPK α (figura 23). Observa-se que a imunomarcção para essa enzima foi discreta nos tecidos gástricos dos animais tratados com salina (figura 23 B). Entretanto, a intensidade de coloração para AMPK α foi aumentada nas demais amostras gástricas que foram tratadas apenas com etanol 50% (figura 23 C) ou com o etanol na presença de NaHS (figura 22 D), NPS (figura 23 E) ou do CORM-2 (figura 23 F).

Figura 23: Fotomicrografias de imunohistoquímica demonstrando a expressão da AMPK α no tecido gástrico de camundongos.

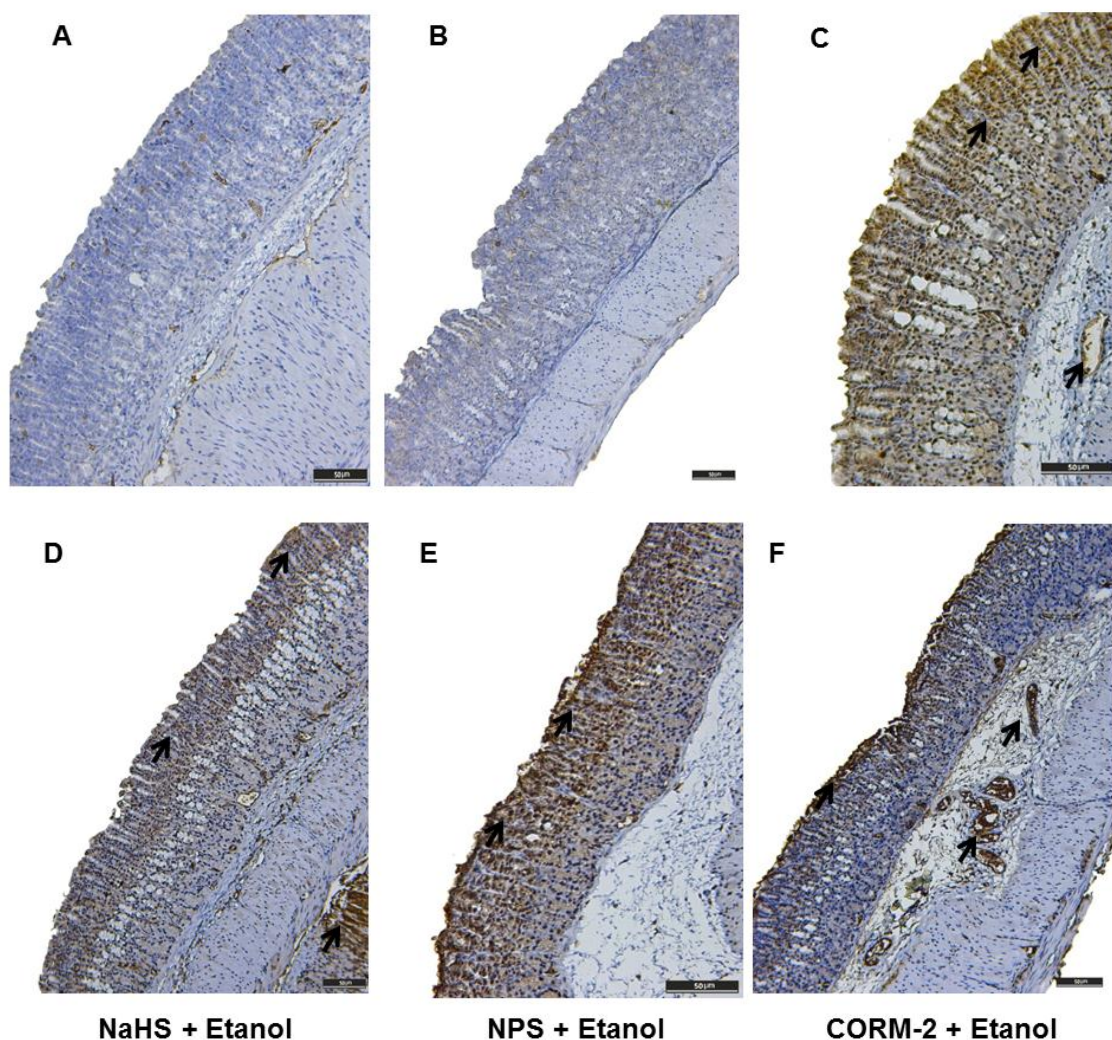


Legenda: Imagem A: fotomicrografias do tecido gástrico de camundongos (Magnificação, x100, escala de 50 μ m) demonstrando ausência de imunoreatividade para a enzima AMPK na mucosa gástrica de camundongos normais (lâmina negativa). Na imagem B (salina) observa-se baixa imunoreatividade para a enzima AMPK. Por outro lado, nas imagens C, D, E e F mostra-se elevada imunomarcção nas células epiteliais do tecido gástrico de camundongos 1 hora após a administração de etanol 50%. (Anticorpo contra AMPK α , diluição 1/400). Setas indicam a imunomarcção.

4.5.2. NaHS, NPS ou CORM-2 aumentam a imunomarcação da AMPK fosforilada no tecido gástrico de camundongos.

A figura 24 demonstra os tecidos gástricos de camundongos que foram avaliados por meio de imunohistoquímica para determinar a localização da AMPK fosforilada. Evidencia-se que a imunomarcação para essa enzima foi discreta tanto nos tecidos gástricos dos animais que foram tratados com salina quanto naqueles que foram tratados com etanol 50% (figuras 24 A e B, respectivamente). No entanto, demonstra-se coloração mais intensa para AMPK fosforilada nos tecidos gástricos de camundongos que foram tratados com AICAR (figura 24 C), NaHS (figura 24 D), NPS (figura 24 E) ou com CORM-2 (figura 24 F), ambos na presença do etanol.

Figura 24: Fotomicrografias de imunohistoquímica demonstrando a expressão da AMPK fosforilada no tecido gástrico de camundongos.

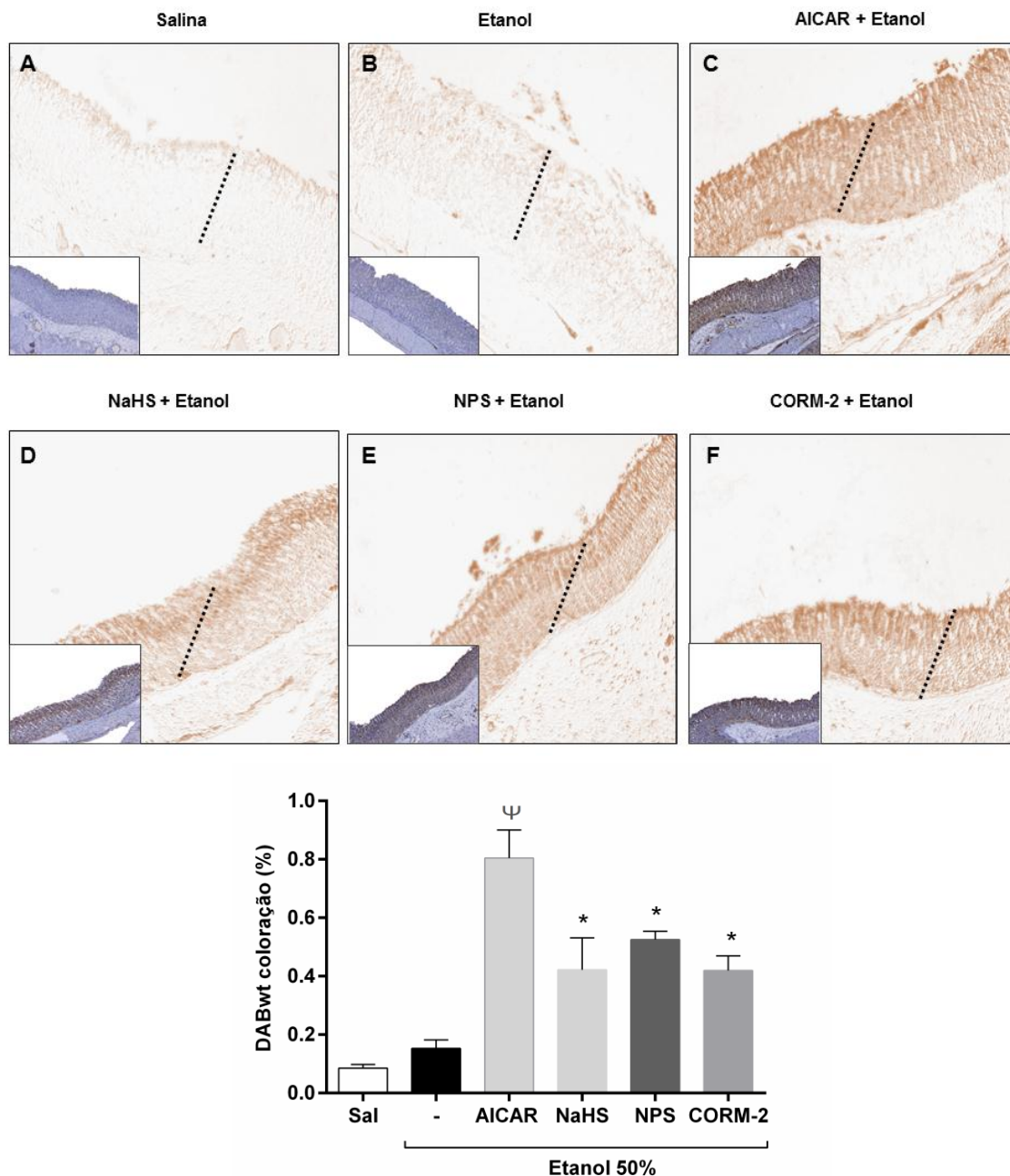


Legenda: Imagem A: Fotomicrografias do tecido gástrico de camundongos (Magnificação, x100, escala de 50 µm) demonstrando baixa imunoreatividade para a enzima p-AMPK na mucosa gástrica de camundongos tratados com salina ou etanol (imagem B). Entretanto, na imagem C observa-se elevada imunoreatividade para a enzima AMPK fosforilada, confirmando a sua ativação pelo AICAR. Além disso, nas imagens D, E e F também observa-se elevada imunomarcção nas células epiteliais do tecido gástrico e no endotélio vascular de camundongos 1 hora após a administração de etanol 50%, quando comparado com os grupos salina e etanol. (Anticorpo contra p-AMPK, diluição 1/100). As setas indicam as áreas com maior imunomarcção.

4.5.3. NaHS, NPS ou CORM-2 aumentam a coloração DAB para AMPK fosforilada na mucosa gástrica de camundongos.

A figura 25 demonstra os tecidos gástricos de camundongos que foram avaliados por meio de imunohistoquímica para quantificar a intensidade da coloração DAB para AMPK fosforilada na mucosa gástrica. Nota-se que a imunorreatividade para essa enzima foi discreta na mucosa gástrica dos animais tratados com salina ($0,085 \pm 0,009$ %DABwt) ou com etanol 50% ($0,153 \pm 0,020$ %DABwt). Entretanto, a imunomarcção foi mais evidente após o tratamento com AICAR ($0,804 \pm 0,067$ %DABwt). Além disso, a coloração mais intensa para AMPK fosforilada na mucosa gástrica de camundongos também foi demonstrada nas amostras de animais que receberam NaHS ($0,422 \pm 0,077$ %DABwt), NPS ($0,525 \pm 0,020$ %DABwt) ou CORM-2 ($0,419 \pm 0,035$ %DABwt), sendo ambas estatisticamente significativas ($P < 0,05$) quando comparadas com os grupos etanol ou salina.

Figura 25: Análise de imunohistoquímica demonstrando a quantificação da intensidade da coloração DAB para AMPK fosforilada na mucosa gástrica camundongos.



Legenda: Imagens da imunohistoquímica para p-AMPK na mucosa gástrica de camundongos (A-F). As fotomicrografias sofreram processo de deconvolução de cor para evidenciar a coloração com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Magnificação, x100). Nas imagens A (salina) e B (etanol) observa-se discreta imunorreatividade para p-AMPK. Entretanto, na imagem C nota-se aumento significativo da imunomarcagem para essa enzima no grupo tratado com AICAR. As imagens D, E e F também evidenciam elevada imunomarcagem da p-AMPK na mucosa gástrica dos animais quando comparados com os grupos salina ou etanol. Gráfico: Ψ P <0,05 versus o grupo salina ou etanol; * P <0,01 versus o grupo AICAR. Análise de variância e teste de Newman-Keuls foram utilizados para a avaliação. As setas tracejadas indicam as áreas com maior imunomarcagem.

Discussão

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos pela primeira vez que a ativação da AMPK promove e interage mutuamente com a gastroproteção mediada por H₂S, NO e CO contra lesões gástricas induzidas por etanol. Usando ferramentas farmacológicas, mostramos que a ativação da AMPK ou doadores e substratos para a síntese de H₂S, NO e CO protegeram o tecido gástrico dos animais contra lesões ocasionadas pela administração de etanol. A ativação da AMPK elevou os níveis gástricos de H₂S e de bilirrubina, mas não os níveis de NO₃⁻ / NO₂⁻ na mucosa gástrica dos animais. Além disso, o bloqueio da síntese desses mediadores gasosos reverteu o efeito gastroprotetor da ativação da AMPK. Sequencialmente, mostramos também que a inibição da AMPK não potencializou o dano gástrico induzido pelo etanol, mas aboliu a proteção gástrica mediada por H₂S, NO e CO.

A administração de etanol promove lesões gástricas caracterizadas por intensa produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e depleção de sistemas antioxidantes, como a glutatona reduzida (GSH), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), que são fatores fundamentais para a manutenção da integridade da mucosa gástrica (KWIECIEŃ et al., 2002; DAS; VASUDEVAN, 2007). Neste contexto, estudos mostram que a AMPK é um sensor biológico importante na manutenção da homeostase intracelular durante condições de estresse oxidativo (TOYODA et al., 2004; RABINOVITCH et al., 2017).

Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com AICAR impediu o dano gástrico e manteve a integridade da mucosa contra a gastropatia induzida por etanol. Da mesma forma, um estudo mostrou que a ativação da AMPK inibiu a produção de ROS e apresentou papel protetor na homeostase vascular contra o estresse oxidativo (TAKEUCHI et al., 2013). No entanto, utilizando cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs), Colombo e Moncada (2009) mostraram que a inibição da AMPK α 1 diminuiu a expressão de genes antioxidantes, incluindo a γ -glutamylcisteína sintase (γ -GS), CAT e SOD, que culminou em estresse oxidativo e apoptose (COLOMBO; MONCADA, 2009). Com base nesses achados, os resultados do nosso estudo sugerem que o efeito gastroprotetor da AMPK é devido, pelo menos em parte, à inibição do estresse oxidativo e da resposta inflamatória que é induzida por etanol.

Os mediadores gasosos H₂S, NO e CO são amplamente conhecidos como segundos mensageiros que estão envolvidos em muitos processos fisiológicos que ocorrem em mamíferos, incluindo a proteção contra condições de intenso estresse oxidativo (SMITH JR et al., 2005; GOMES et al., 2010; KIMURA, 2014). . Estudos mostraram que a AMPK funciona como um mediador chave nos efeitos protetores desses mediadores gasosos em diferentes sistemas biológicos (ZHANG et al., 2008; NIZAMUTDINOVA et al., 2009; XIE et al., 2015). Com base nisso, o passo posterior do nosso estudo foi avaliar se o efeito gastroprotetor da AMPK poderia depender do H₂S, NO e CO. Para isso, os camundongos foram pré-tratados com antagonistas enzimáticos (PAG, L-NAME ou ZnPP IX) antes da administração do ativador da AMPK.

Está bem descrito na literatura que o PAG (inibidor irreversível da CSE), o L-NAME (inibidor da síntese de óxido nítrico) ou o ZnPP IX (inibidor da HO-1), quando administrados nas mesmas doses que foram usadas neste estudo e na presença do etanol, não alteraram os efeitos desse agente lesivo (MEDEIROS et al., 2008; MEDEIROS et al., 2009; GOMES et al., 2010; COSTA et al., 2013). Além disso, o tratamento com esses inibidores na ausência do etanol também não ocasionou lesões gástricas (MEDEIROS et al., 2008; COSTA et al., 2013). Nossos resultados demonstraram que os antagonistas enzimáticos reverteram a proteção gástrica promovida pelo ativador da AMPK contra lesões induzidas por etanol. Assim, sugerimos que o efeito gastroprotetor mediado por AMPK depende, pelo menos em parte, dos produtos enzimáticos da CSE, da NO sintase (NOS) e da HO-1. Para testar essa hipótese, nós avaliamos o efeito da ativação da AMPK na produção de H₂S, NO₃⁻ / NO₂⁻ e de bilirrubina na mucosa gástrica dos animais.

Como resultados, vimos que a ativação da AMPK aumentou os níveis de H₂S e de bilirrubina, mas não os níveis de NO₃⁻ / NO₂⁻ no tecido gástrico dos animais. Do mesmo modo, em um estudo realizado por Yang e colaboradores (2017) a ativação da AMPK aumentou os níveis séricos de H₂S e apresentou cardioproteção tanto em estudo *in vivo* quanto *in vitro*. Além disso, Carrasco-Chaumel e colaboradores (2005) demonstraram que a ativação da AMPK induziu a síntese de NO em ratos submetidos a lesão hepática por isquemia / reperfusão. Os resultados obtidos por esses autores, referentes a elevação dos níveis de NO, parecem contraditórios aos achados do nosso estudo, entretanto, essas diferenças são possíveis devido a diferentes condições ou modelos experimentais bem como pela dose utilizada do

ativador da AMPK, por exemplo: utilizamos uma dose considerada relativamente baixa (20 mg / Kg) quando comparada com a dose utilizada por Carrasco-Chaumel e colaboradores (2005) que foi de 100 mg / Kg intravenosa e isso pode ter sido um dos motivos pelos quais os níveis de NO₃⁻ / NO₂⁻ não foram aumentados após a administração do AICAR.

Neste estudo, também confirmamos que o tratamento com doadores de H₂S (NaHS ou o reagente de Lawesson) reverteu as lesões gástricas ocasionadas por etanol (MEDEIROS et al., 2009), e esse feito gastroprotetor foi acompanhado pelo aumento da produção de sulfeto de hidrogênio no tecido gástrico dos camundongos. Corroborando com os nossos resultados, estudos demonstraram que a AMPK, ativada por H₂S, protegeu células osteoblásticas contra o dano induzido por dexametasona (YANG et al., 2014) e atenuou a lesão miocárdica induzida por isquemia / reperfusão (XIE et al., 2015). A AMPK também foi atribuída aos efeitos cardioprotetores do H₂S na disfunção cardíaca induzida por dieta hiperlipídica ou por tabagismo (ZHOU et al., 2014a; BARR et al., 2015). Assim, sugerimos que a ativação da AMPK seja necessária para o efeito gastroprotetor do H₂S contra lesões induzidas por etanol.

Também investigamos o papel da AMPK no efeito gastroprotetor do NO. Corroborando com a literatura, mostramos que tanto o doador quanto o substrato da NOS aboliu de forma macroscópica e microscópica a lesão gástrica causada por etanol (SILVA et al., 2015; MEDEIROS et al., 2008), com elevação dos níveis de NO₃⁻ / NO₂⁻ na mucosa gástrica dos animais. Além disso, o inibidor da AMPK reverteu essa proteção gástrica mediada pelo NO. De maneira análoga, estudos relataram que a AMPK exerce ações biológicas através de diferentes vias de sinalização, incluindo a fosforilação e a ativação da eNOS, culminando com a produção de NO (CHEN et al., 2009). Mutuamente, o NO também atua como um ativador endógeno da AMPK (ZHANG et al., 2008). Com base nessas evidências, os nossos dados sugerem que o efeito gastroprotetor do NO contra a lesão gástrica induzida por etanol pode ser dependente da ativação da AMPK.

Assim como visto para outros mediadores gasosos, no nosso trabalho, mostramos que o CORM-2 (doador de CO) ou a hemina (substrato para a síntese de CO) reverteram o dano gástrico causado por etanol. Resultados semelhantes também foram encontrados por Gomes e colaboradores (2010) no modelo de lesão gástrica por etanol, bem como por Magierowska e colaboradores (2016) no modelo

de lesão gástrica por estresse em ratos. No presente estudo, o pré-tratamento com hemina aumentou significativamente os níveis gástricos de bilirrubina, que é um marcador indireto para a produção de CO. Nos nossos experimentos, a administração de etanol 50% também aumentou consideravelmente o nível gástrico de bilirrubina, provavelmente como um mecanismo de autodefesa fisiológico contra a ação lesiva do etanol, pois esse pigmento tem ação antioxidante e a sua produção é estimulada diante do estresse oxidativo (GOMES et al., 2010). Entretanto, a inibição da AMPK, pelo composto C, aboliu o efeito gastroprotetor e a elevação dos níveis de bilirrubina promovidos pela produção de CO.

A ativação da HO-1 desempenha um mecanismo de proteção importante, pois os seus produtos, isto é, a bilirrubina e o CO, exercem potentes efeitos anti-apoptóticos, anti-inflamatórios e angiogênicos (BROUARD et al., 2000; DESHANE et al., 2007). Neste contexto, Liu e colaboradores (2011) relataram que a AMPK, ativada, induziu o aumento da expressão gênica da HO-1 em células endoteliais humanas e em artérias de ratos. Do mesmo modo, o aumento da expressão da HO-1 resultou na fosforilação da AMPK em queratinócitos humanos (PARK et al., 2017). Com base na literatura e de acordo com os resultados encontrados no nosso estudo, sugerimos que o efeito gastroprotetor do CO pode ser dependente da AMPK.

Haja vista que os nossos resultados tenham sugerido fortemente que a AMPK modula o efeito gastroprotetor dos mediadores gasosos, a etapa seguinte do nosso estudo foi avaliar a expressão da AMPK α ou da AMPK fosforilada (ativada) na mucosa gástrica dos camundongos tratados com doadores de H₂S, NO e CO. A literatura demonstra que a AMPK é ativada quando ocorre a fosforilação no resíduo de treonina 183 da subunidade α -1 ou no resíduo de treonina 172 da subunidade α -2 (MOORE et al., 1991; HARDIE et al., 1998). A ativação acontece quando há uma alteração no estado energético da célula, assim, quando a relação AMP:ATP está aumentada ocorre uma alteração conformacional na proteína, deixando-a suscetível a fosforilação e a ativação (HARDIE et al., 2014).

Os nossos resultados mostraram uma baixa expressão endógena da AMPK α nos tecidos gástricos dos animais que foram tratados com salina. Resultados semelhantes foram anteriormente demonstrados por Sidani e colaboradores (2009), que identificaram a expressão da AMPK α em células parietais de camundongos após o tratamento com AICAR, sugerindo que essa enzima desempenha um importante papel fisiológico, atuando na inibição da secreção ácida gástrica.

Além da imunomarcagem da AMPK α nas células parietais, identificamos também a expressão endógena dessa enzima com maior frequência nas porções inferiores das glândulas gástricas. Nesses locais há muitas células principais ou pépticas, que são produtoras de pepsinogênio (um precursor da pepsina). Entretanto, para que ocorra a conversão de pepsinogênio em pepsina, faz-se necessária a presença do ácido clorídrico (CHOI et al., 2014), que por sua vez tem a secreção inibida quando a AMPK é ativada nas células parietais (SIDANI et al., 2009). A partir desses resultados, sugerimos que a gastroproteção mediada pela ativação da AMPK pode ocorrer também via modulação da secreção de muco e de ácido gástrico, que são fatores fundamentais para a homeostase e a manutenção da integridade gástrica (SIDANI et al., 2009; CORNICK et al., 2015).

Demonstramos também que o tratamento com o etanol ocasionou uma extensa imunomarcagem para AMPK α no tecido gástrico dos animais, sendo mais evidente tanto nas porções inferiores quanto nas superfícies das glândulas gástricas. Isso pode ter ocorrido como um mecanismo de autodefesa fisiológico, no qual ocorreu um aumento da expressão gênica da AMPK α , para proteger a mucosa gástrica da ação lesiva do etanol. Sabe-se também que durante o metabolismo do etanol são produzidas espécies reativas de oxigênio (BAILEY et al., 1999) e a expressão da AMPK também pode ocorrer em resposta ao estresse oxidativo (HWANG et al., 2004; TOYODA et al., 2004; RABINOVITCH et al., 2017). Assim, pode-se, em parte, justificar a elevada imunorreatividade da AMPK α nesse tecido lesionado. Sugerimos, portanto, que o etanol na concentração utilizada não foi capaz de ativar a AMPK, pois verificamos também a expressão da AMPK fosforilada e encontramos uma imunomarcagem bastante diminuída nas amostras de tecido gástrico dos animais que foram tratados apenas com esse agente lesivo. A literatura demonstra que um dos mecanismos pelos quais o etanol pode inibir a fosforilação da AMPK é por meio da inibição da PKC, uma cinase que fosforila a LKB1, sendo essa última uma ativadora da AMPK. O etanol também pode estimular a produção de fosfatases 2A, que causam a desfosforilação da AMPK (LIANGPUNSAKUL et al., 2008).

De modo semelhante, demonstramos que o tratamento com os doadores gasosos de H₂S, NO e CO aumentou a imunorreatividade da AMPK no tecido gástrico dos animais. Este efeito também foi anteriormente descrito em outros estudos envolvendo células epiteliais glomerulares, músculo esquelético e células

endoteliais de roedores, nos quais o NaHS, o NPS e o CORM-2 aumentaram a expressão da AMPK (NIZAMUTDINOVA et al., 2009; HIGAKI et al., 2001; LEE et al., 2012), entretanto, o nosso estudo é o primeiro a demonstrar que esses doadores gasosos também aumentam a expressão dessa enzima no tecido gástrico de camundongos. Além disso, observamos que nos animais que foram tratados com CORM-2 a imunorreatividade da AMPK foi mais baixa. Isso pode ser justificado, em parte, pelo fato da expressão da HO-1 ser relativamente baixa no lúmen do TGI (NAIK et al, 2003).

Avaliamos também o efeito dos doadores gasosos sobre a expressão da AMPK fosforilada, pois estudos anteriores demonstraram que a AMPK pode ser fosforilada após tratamento com doadores de H₂S, de NO e também com a hemina e, uma vez ativada, essa enzima contribui para muitos efeitos benéficos, incluindo a inibição da resposta inflamatória (HATTORI et al, 2008; BESS et al, 2011; CHEN et al., 2017; PARK et al., 2017). Os nossos resultados mostraram que o tratamento com AICAR, bem como com o NaHS, o NPS e o CORM-2 aumentaram consideravelmente a imunomarcagem da AMPK fosforilada no tecido gástrico dos animais, quando comparado com os grupos controle (etanol e salina), que apresentaram baixa expressão dessa enzima. Esses resultados foram estatisticamente significativos na análise de quantificação da intensidade da coloração DAB para AMPK no tecido gástrico dos animais.

As principais limitações deste estudo foram ligadas a questões metodológicas. Em primeiro lugar uma das dificuldades presentes foi a de recursos financeiros insuficientes para a compra de anticorpos, visto que, inicialmente almejava-se avaliar a expressão da CSE, eNOS e HO-1 para verificar se a ativação da AMPK seria capaz de aumentar a expressão dessas enzimas no tecido gástrico dos animais. Outra dificuldade foi referente à técnica de *western blotting*, a qual foi realizada por várias vezes para verificar se os doadores de mediadores gasosos (NaHS, NPS ou CORM-2) seriam capazes de elevar a expressão da p-AMPK. Entretanto, todas as tentativas experimentais falharam, provavelmente por conta da instabilidade dos anticorpos.

Além disso, pretendeu-se também verificar o efeito da ativação da AMPK sobre os níveis de MDA e de GSH. Todavia, as amostras foram insuficientes para essas análises, visto que outras avaliações eram mais urgentes, como a quantificação dos níveis de H₂S, de nitrato/nitrito e de bilirrubina. Essas foram

algumas lacunas que ficaram por serem preenchidas durante a execução deste trabalho e que podem ser vistas como propostas para investigações futuras.

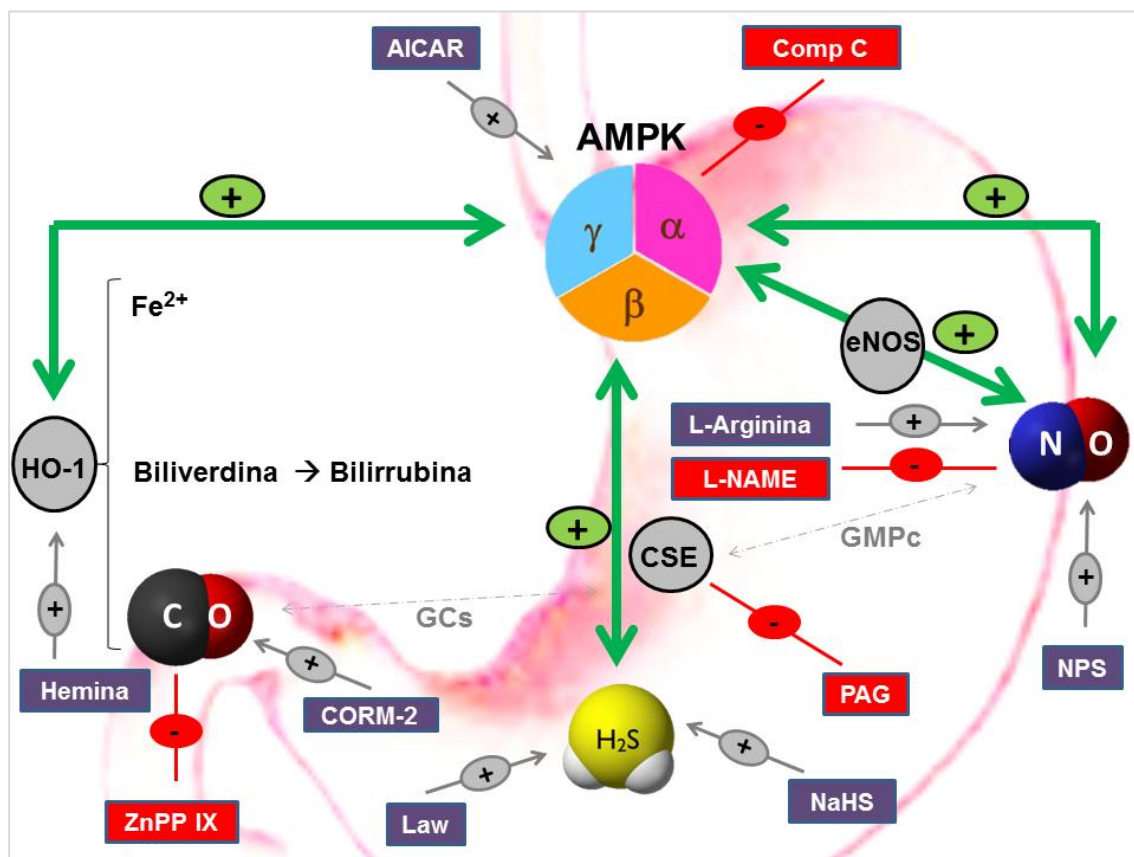
Portanto, os resultados encontrados neste estudo demonstraram que a ativação da AMPK apresenta efeito gastroprotetor contra a lesão induzida por etanol, por interação mútua com os mediadores gasosos H₂S, NO e CO. Assim, a capacidade da AMPK para modular o efeito desses mediadores gasosos fornece um mecanismo relevante pelo qual esta cinase protege a mucosa gástrica contra os efeitos nocivos do etanol e poderá se tornar um alvo terapêutico importante para o tratamento de disfunções gástricas.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- A ativação da AMPK no tecido gástrico de camundongos apresentou efeito gastroprotetor contra lesões macroscópicas e microscópicas induzidas por etanol, mas a inibição dessa enzima não potencializou as lesões;
- A ativação da AMPK aumentou significativamente os níveis de H₂S e de bilirrubina, mas não aumentou os níveis de NO₃⁻ / NO₂⁻ em homogenatos de tecido gástrico de camundongos submetidos ou não a lesão induzida por etanol;
- Os inibidores enzimáticos da síntese de H₂S, NO e CO reverteram o efeito gastroprotetor mediado pela ativação da AMPK contra lesões induzidas por etanol em camundongos;
- A inibição da AMPK reverteu a proteção gástrica mediada por H₂S, NO e CO no modelo de lesão induzida por etanol em camundongos;
- A inibição da AMPK reduziu os níveis gástricos de H₂S, de NO₃⁻ / NO₂⁻ e de bilirrubina produzidos, respectivamente, por NaHS, NPS e hemina na lesão causada por etanol em camundongos;
- A análise de imunohistoquímica demonstrou que os doadores de H₂S, de NO e de CO aumentaram a expressão e a ativação da AMPK em células epiteliais gástricas de camundongos submetidos à lesão por etanol;
- Com todos os resultados obtidos neste estudo e baseado em dados da literatura, propõe-se o seguinte desenho esquemático (**Figura 26**) acerca do mecanismo de ação da AMPK no efeito gastroprotetor dos mediadores gasosos: H₂S, NO e CO contra lesões gástricas induzidas por etanol.

Figura 26: Diagrama esquemático representativo da possível interação entre AMPK e os mediadores gasosos: sulfeto de hidrogênio, óxido nítrico e monóxido de carbono.



Legenda: Este diagrama foi esquematizado a partir de resultados demonstrados por outros pesquisadores em diferentes sistemas biológicos, bem como através dos resultados encontrados no nosso estudo referente ao envolvimento da AMPK no efeito gastroprotetor dos mediadores gasosos. Um estudo mostrou que a elevação dos níveis de H₂S, pelo NaHS, foi capaz de reduzir o estresse oxidativo por meio da ativação da AMPK (CHEN et al., 2017), do mesmo modo, no nosso estudo, demonstramos que a ativação da AMPK, pelo AICAR, aumenta os níveis de H₂S em homogenatos gástricos de camundongos. Semelhantemente foi visto que a AMPK estimula a produção de NO através da fosforilação da eNOS (CHEN et al., 1999) e por sua vez, o óxido nítrico também conduz a ativação da AMPK (BESS et al., 2011). Foi também mostrado que o aumento da expressão da HO-1, pela hemeina, induziu a fosforilação da AMPK (PARK et al., 2017), além disso, a AMPK induziu a expressão gênica da HO-1 em células endoteliais (LIU et al., 2011). Essas evidências indicam que os mecanismos pelos quais a AMPK está envolvida nos efeitos biológicos dos mediadores gasosos parece ser uma via de mão dupla. Além do mais, foi relatado também que esses mediadores gasosos interagem entre si ao modular as suas funções farmacológicas (COLETTA et al., 2012; TAKEUCHI et al. 2015; LICETTI et al. 2016) (setas cinza tracejadas). Na figura, as setas verdes indicam ativação

REFERÊNCIAS

- ABOUBAKR, E.M.; TAYE, A.; EL-MOSELHY, M.A.; HASSAN, M.K. Protective effect of hydrogen sulfide against cold restraint stress-induced gastric mucosal injury in rats. **Archives of Pharmacal Research**. v.36, p.1507–1515. 2013.
- AHMAD, A.; GERÖ, D.; OLAH, G.; SZABO, C. Effect of endotoxemia in mice genetically deficient in cystathionine-g-lyase, cystathionine-b-synthase or 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. **International Journal of Molecular Medicine**. v.38, p.1683–1692. 2016.
- ARAB, H.H.; SALAMA, S.A.; OMAR, H.A.; ARAFA, E.A., MAGHRABI, I.A. Diosmin protects against ethanol-induced gastric injury in rats: novel anti-ulcer actions. **Plos One**. v.10, n.3, p.e0122417. 2015.
- ASMARI, A.A.; SHAHRANI, H.A.; MASR, N.A. et al. Vanillin abrogates ethanol induced gastric injury in rats via modulation of gastric secretion, oxidative stress and inflammation. **Toxicology Reports**. v. 3, p.105-113. 2016.
- BAILEY, S.M.; PIETSCH, E.C.; CUNNINGHAM, C.C. Ethanol stimulates the production of reactive oxygen species at mitochondrial complexes I and III. **Free Radical Biology & Medicine**. v.27, p.891-900. 1999.
- BARAKA; DEIF. Role of Activation of 5`-Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase in Gastric Ulcer Healing in Diabetic Rats. **Pharmacology**, v.88, n.5-6, p.275–283. 2011.
- BARR, L. A.; SHIMIZU, Y.; LAMBERT, J. P.; NICHOLSON, C. K.; CALVERT, J. W. Hydrogen sulfide attenuates high fat diet-induced cardiac dysfunction via the suppression of endoplasmic reticulum stress. **Nitric Oxide**. v.46, p.145–156. 2015.
- BATTISH, R.; CAO, G.Y.; LYNN, R.B. et al. Heme oxygenase-2 distribution in anorectum: colocalization with neuronal nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology*. **Gastrointestinal and Liver Physiology**. v.278, p.G148–G155. 2000.
- BEAZELL, J.M., IVY, A.C. The influence of alcohol on the digestive tract. **Quarterly Journal of Studies on Alcohol**.v.1, p.45–73, 1940.
- BESS, E.; FISSALTHALER, B.; FRO¨MEL, T.; FLEMING, I. Nitric oxide-induced activation of the AMP-activated protein kinase a2 subunit attenuates IκB kinase activity and inflammatory responses in endothelial cells. **PLOS ONE**, v.6, p. e20848, 2011.
- BIAN, K.; MURAD, F. sGC-cGMP signaling: Target for anticancer therapy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v.814, p.5–13. 2014.
- BIJLAND, S.; MANCINI, S. J.; SALT, I. P. Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. **Clinical Science**. v.124, p.491. 2013.
- BODE, C.; BODE, J. C. Alcohol's role in gastrointestinal tract disorders. **Gastrointestinal Tract Disorders**. v.21, n.1, p.76-83. 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Manual do Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Brasília, DF. p. 10-15.2012.

BROUARD, S.; OTTERBEIN, L.E.; ANRATHER, J. et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 192, p.1015–1026, 2000.

BROWN, G.C.; COOPER, C.E. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. **FEBS Lett.** v.356, p.295–298. 1994.

BRZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; DROZDOWICZ, D. et al. Grapefruit-seed extract attenuates ethanol- and stress-induced gastric lesions via activation of prostaglandin, nitric oxide and sensory nerve pathways. **World Journal of Gastroenterology**. v.11, p.6450–6458. 2005.

BUENO JÚNIOR, C.R.; PANTALEÃO, L.C.; VOLTARELLI, V.A.; BOZI, L.H.; BRUM, P.C.; ZATZ, M.. Combined effect of AMPK/PPAR agonists and exercise training in mdx mice functional performance. **Plos One**. v.7, n.9, p.e45699PL. 2012.

BYUN, S.J.; SON, Y.; PAE, H.-O. Cytoprotective effect of β-lapachone by inducing heme oxygenase-1 expression and AMP-activated protein kinase activation in human endothelial cells. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. v. 18, n.7, p. 949-958. 2014.

CALVERT, J. W.; GUNDEWAR, S.; JHA, S et al. Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. **Diabetes**, v.57, p.696-705. 2008.

CAMERON, K.O.; KURUMBAIL, R.G. Recent progress in the identification of adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) activators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p.5139–5148. 2016.

CARRASCO-CHAUMEL, E.; ROSELLO´-CATAFAU, J.; BARTRONS, R.; et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase and nitric oxide in rat steatotic liver transplantation. **Journal of Hepatology**, v.43, p.997–1006. 2005.

CHANG, A.Y.; CHAN, J.Y.; CHENG, H.L. et al. Hypoxia-inducible factor 1/heme oxygenase 1 cascade as upstream signals in the prolife role of heat shock protein 70 at rostral ventrolateral medulla during experimental brain stem death. **Shock**. v.32, p.651–658. 2009.

CHEN, L.; XIN, F. J.; WANG, J.; et al. Conserved regulatory elements in AMPK. **Nature**. v.498, n.7453, p. E8-10, 2013.

CHEN, X.; ZHAO, X.; CAI, H. et al. The role of sodium hydrosulfide in attenuating the aging process via PI3K/AKT and CaMKKb/AMPK pathways. **Redox Biology**. v.12, p.987–1003. 2017.

CHEN, Z.; PENG, C.I.; SUN, W. et al. AMP-activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase ser633. **Circulation Research**, v.104, p.496–505, 2009.

CHEN, Z.P., MITCHELHILL, K.I., MICHELL, B.J., et al. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. **FEBS Letters**. v.443, p.285–289, 1999.

CHOI, E.; ROLAND, J.T.; BARLOW, B.J. et al. Cell lineage distribution atlas of the human stomach reveals heterogeneous gland populations in the gastric antrum. **Gut**. v. 63, p. 1711–1720, 2014.

COLETTA, C.; PAPAPETROPOULOS, A.; ERDELYI, K. et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 109, p.9161–9166. 2012.

COLOMBO, S. L.; MONCADA, S. AMPK α 1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells. **Biochemical Journal**. v.421, p.163–169. 2009.

CORNICK, S.; TAWIAH, A.; CHADEE, K. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. **Tissue Barriers**. v.3, p.e982426. 2015.

COSTA, N.R.D.; SILVA, R.O.; NICOLAU, L.A.D, et al. Role of soluble guanylate cyclase activation in the gastroprotective effect of the HO-1/CO pathway against alendronate-induced gastric damage in rats. **European Journal of Pharmacology**. v.700, p.51-59. 2013.

DAS, S.K.; VASUDEVAN, D.M. Alcohol-induced oxidative stress. **Life Sciences**. v.81, p.177-187. 2007.

DAVIS, B.J., XIE, Z., VIOLLET, B., ZOU, M.H. Activation of the AMP-Activated Kinase by Antidiabetes Drug Metformin Stimulates Nitric Oxide Synthesis In Vivo by Promoting the Association of Heat Shock Protein 90 and Endothelial Nitric Oxide Synthase. **Diabetes**. v.55, p.496-505. 2006.

DECLEVES, A. E.; ZOLKIPLI, Z.; SATRIANO, et al. Regulation of lipid accumulation by AMK-activated kinase in high fat diet-induced kidney injury. **Kidney International**. v.85, p.611. 2014.

DESHANE, J.; CHEN, S.; CABALLERO, S. et al. Stromal cell factor-1 promotes vascular angiogenesis via a heme oxygenase-1-dependent mechanism. **The Journal of Experimental Medicine**. v.204, p.605–618, 2007.

FARRUGIA, G.; SZURSZEWSKI, J.H. Carbon monoxide, hydrogen sulfide, and nitric oxide as signaling molecules in the gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, v.147, p.303–313, 2014.

FARRUGIA, G.; SZURSZEWSKI, J.H. Heme oxygenase, carbon monoxide, and interstitial cells of Cajal. **Microscopy Research and Technique**; v.47, p.321–324. 1999.

FELIERS, D., LEE, H. J., KASINATH, B. S. Hydrogen sulfide in renal physiology and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**. v.25, p.720–731. 2016.

FIORUCCI, S.; DISTRUTTI, E.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. **Gastroenterology**. v.131, p.259–271. 2006.

FORESTI, R., HOQUE, M., BAINS, S., GREEN, C.J, MOTTERLINI, R. Haem and nitric oxide: synergism in the modulation of the endothelial haem oxygenase-1 pathway. **Biochemical Journal**, v.372, p.381-390, 2003.

FORETZ, M.; HÉBRARD, S.; LECLERC, J.; et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. **The Journal of Clinical Investigation**. v.120, p.2355. 2010.

FRIEDRICHSEN, M.; MORTENSEN, B.; PEHMØLLER, C.; et al. Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: Role in glucose uptake and insulin sensitivity. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.366, p.204. 2013.

GOMES, A.S., GADELHA, G.G., LIMA, S.J et al. Gastroprotective effect of heme-oxygenase 1/biliverdin/CO pathway in ethanol-induced gastric damage in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 642, p.140–145. 2010.

GREEN, L.C., WAGNER, D.A., GLOGOWSKI, J., et al. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p.131-138. 1982.

GU, Q.; WANG, B.; ZHANG, X. F.; MA, Y. P.; LIU, J. D.; WANG, X. Z. Contribution of hydrogen sulfide and nitric oxide to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 375, n. 1/2, p. 199–206, 2013.

GUOQIANG, LV.; HUANHUAN, Z.; FENG, Z. et al. AMP-activated protein kinase activation protects gastric epithelial cells from *Helicobacter pylori*-induced apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, p.13–18. 2014.

HARDIE, D. G. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole body energy homeostasis. **Current Opinion in Cell Biology**, v.33, p.1-7, 2014.

HARDIE, D.G. Regulation of AMP-activated protein kinase by natural and synthetic activators. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v.6, n.1, p.1–19. 2016.

HARDIE, D.G., CARLING, D., CARLSON, M: The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? **Annual Review of Biochemistry**. v.67, p.821– 855.1998.

HARFORD-WRIGHT, E.; LEWIS, K.M.; GHABRIEL,M.N.; VINK, R. Treatment with the NK1 antagonist emend reduces blood brain barrier dysfunction and edema formation in an experimental model of brain tumors. **PloS one**. v.9, n.5, p.e97002. 2014.

HATTORI, Y.; NAKANO, Y.; HATTORI, S.; TOMIZAWA, A.; INUKAI, K.; KASAI, K. High molecular weight adiponectin activates AMPK and suppresses cytokine induced NF-κB activation in vascular endothelial cells. **FEBS Letters**, v.582, p.1724. 2008.

HE, L.; HUANG, N.; LI, H et al. —AMPK/α-Ketoglutarate Axis Regulates Intestinal Water and Ion Homeostasis in Young PigsII. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.65, n.11, p.2287-2298. 2017.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MONTIEL-RUÍZ, C.; VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, O. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. **Laboratory Investigation- Nature**. v.80, n.8, p.1161-9. 2000.

HERRERO-MARTIN, G.; HOYER-HANSEN, M.; GARCIA-GARCIA, C. et al. TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. **The EMBO Journal**. v.28, p.677–685. 2009.

HIGAKI, Y.; HIRSHMAN, M.F.; FUJII, N.; GOODYEAR, L.J. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. **Diabetes**. v.50, p.241-247. 2001.

HU, L. F., WONG, P. T. H., MOORE, P. K., BIAN, J. S. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. **Journal of Neurochemistry**. v.100, p.1121-1128. 2007.

HWANG, J.T.; LEE, M.; JUNG, S. N. et al. AMP-activated protein kinase activity is required for vanadate-induced hypoxia-inducible factor 1alpha expression in DU145 cells. **Carcinogenesis**. v.25, p.2497-2507. 2004.

IMMENSCHUH, S.; TAN, M.; RAMADORI, G. Nitric oxide mediates the lipopolysaccharide dependent upregulation of the heme oxygenase-1 gene expression in cultured rat Kupffer cells. **Journal of Hepatology**. v. 30, p.61-69. 1999.

JENSEN, T.E.; ROSE, A.J.; JORGENSEN, S.B et al. Possible CaMKK-dependent regulation of AMPK phosphorylation and glucose uptake at the onset of mild tetanic skeletal muscle contraction. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**. v.292, p.E1308-E1317. 2007.

KABIL, O.; BANERJEE, R. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. **The Journal of Biological Chemistry**, v.285, p.21903-21907, 2010.

KIM, T. T.; DYCK, J. R. Is AMPK the savior of the failing heart? **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v.26, p.40. 2015.

KIMURA, H. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. **Neurochemistry International**. v. 63, p.492-497. 2013.

KIMURA, H. Production and physiological effects of hydrogen sulfide. **Antioxidants & Redox Signaling**. v.20, p.783-793. 2014.

KIMURA, H.; SHIBUYA, N.; KIMURA, Y. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant. **Antioxidants & Redox Signaling**. v.17,p.45-57, 2012.

KONGSUPHOL, P.; CASSIDY, D.; HIEKE B et al. Mechanistic insight into control of CFTR by AMPK. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 284, p.5645-5653. 2009.

KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; MEIXNER, H.; PTAK, A.; HAHN, E.G.; KONTUREK, S.J. Central and peripheral neural aspects of gastroprotective and ulcer healing effects of lipopolysaccharides. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 52, p.611-623. 2001.

KOPIC, S. CORRADINI, S.SIDANI, M. MUREK, et al, —Ethanol Inhibits Gastric Acid Secretion in Rats Through Increased AMP-Kinase Activityll. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 25, p.195-202, 2010.

KWIECIEŃ, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v.53, p.39-50. 2002.

- KWIECIEN, S.; MAGIEROWSKA, K.; MAGIEROWSKI, M. et al. Role of sensory afferent nerves, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in the carbon monoxide-induced gastroprotection against stress ulcerogenesis. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v.67, p.717–729. 2016.
- LAINE, L., WEINSTEIN, W.M. Histology of alcoholic hemorrhagic —gastritisII: A prospective evaluation. **Gastroenterology**, v.94, n.6, p.1254-1262. 1988.
- LEE, H.J.; MARIAPPAN, M.M.; FELIERS, D. et al. Hydrogen sulfide inhibits high glucose-induced matrix protein synthesis by activating AMP-activated protein kinase in renal epithelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v.287, p.4451-4461. 2012.
- LEVINE, Y. C.; LI, G. K.; MICHEL, T. Agonist-modulated regulation of AMP activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK—Rac1—Akt- endothelial nitric-oxide synthase pathway. **The Journal of Biological Chemistry**. v.282, p.20351- 20364. 2007.
- LIANGPUNSAKUL, S.; WOU, S.E.; ZENG, Y.; ROSS, R.A.; JAYARAM, H.N.; CRABB, D.W. Effect of ethanol on hydrogen peroxide-induced AMPK phosphorylation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 295, n.6, p.G1173–G1181. 2008.
- LIU, X., PEYTON, K.J., SHEBIB, A.R et al. Activation of AMPK stimulates heme oxygenase-1 gene expression and human endothelial cell survival. **Heart and Circulatory Physiology**, v.300, n.1, p.H84–H93, 2011.
- LOU, L.X.; GENG, B.; DU, J.B.; TANG, C.S. Hydrogen sulfide-induced hypothermia attenuates stress-related ulceration in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v.35, p.223–228. 2008.
- LUCETTI; L.T.; SILVA; R.O.; SANTANA; A.P.M. et al. Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide Interact When Modulating Gastric Physiological Functions in Rodents. **Digestive Diseases and Sciences**, v.62, n.1, p.93-104. 2016.
- LUO, X.J.; LIU, B.; DAI, Z, et al. Expression of apoptosis-associated microRNAs in ethanol-induced acute gastric mucosal injury via JNK pathway. **Alcohol**. v.47, n.6, p.481–493. 2013.
- MAGIEROWSKA, K.; MAGIEROWSKI, M.; HUBALEWSKA-MAZGAJ, M. et al. Carbon monoxide (CO) released from tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer (CORM-2) in gastroprotection against experimental ethanol-induced gastric damage. **PLOS ONE**. v.10, e0140493. 2015.
- MAGIEROWSKA, K.; MAGIEROWSKI, M.; SURMIAK, M.; et al. The Protective Role of Carbon Monoxide (CO) Produced by Heme Oxygenases and Derived from the CO-Releasing Molecule CORM-2 in the Pathogenesis of Stress-Induced Gastric Lesions: Evidence for Non-Involvement of Nitric Oxide (NO). **International Journal of Molecular Sciences**. v.17, p.442. 2016.
- MAGIEROWSKI M, MAGIEROWSKA K, HUBALEWSKA-MAZGAJ M, et al. Interaction between endogenous carbon monoxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastroprotection against acute aspirin-induced gastric damage. **Pharmacological Research**. v.114, p.235–250. 2016.

MAGIEROWSKI, M.; MAGIEROWSKA, K.; KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T. Gaseous Mediators Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in the Mechanism of Gastrointestinal Integrity, Protection and Ulcer Healing. **Molecules**. v. 20, p. 9099-9123. 2015.

MAGIEROWSKI, M.; MAGIEROWSKA, K.; HUBALEWSKA-MAZGAJ, M. et al. Carbon monoxide released from its pharmacological donor, tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer, accelerates the healing of pre-existing gastric ulcers. **British Journal of Pharmacology**. v.174, n.20, p.3654-3668. 2017.

MARD, S.A.; NEISI, N.; SOLGI, G. et al. Gastroprotective effect of NaHS against mucosal lesions induced by ischemia-reperfusion injury in rat. **Digestive Diseases and Sciences**. v.57, p.1496–1503. 2012.

MASUDA, E.; KAWANO, S.; NAGANO, K. et al., Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Gastroenterology**. v. 108, n.1, p.58-64. 1995.

MEDEIROS J.V.; BEZERRA, V.H.; GOMES, A.S. et al. Hydrogen sulphide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of KATP channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**.v.330,p.764–770. 2009.

MEDEIROS, J.V.R., GADELHA, G. G; LIMA, S.J et al., Role of the NO/cGMP/KATP pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats, **British Journal of Pharmacology**, v.153, p.721-727. 2008.

MITCHELL, M.C.; TEIGEN, E.L.; RAMCHANDANI, V.A. Absorption and peak blood alcohol concentration after drinking beer, wine, or spirits. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v.38, n.5, p.1200-4. 2014.

MOORE, F.; WEEKES, J.; HARDIE, D.G. Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion. **European Journal of Biochemistry**. v.199, p.691–7. 1991.

MORROW VA, FOUFELLE F, CONNELL JMC, et al. Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric oxide synthesis in human aortic endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.31629–31639, 2003.

MOUNIER, R.; THÉRET, M.; LANTIER, L.; et al. Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 6, p.275-86, 2015.

MUANPRASAT, C.; WONGKRASANT, P.; SATITSRI, S.; et al. Activation of AMPK by chitosan oligosaccharide in intestinal epithelial cells: Mechanism of action and potential applications in intestinal disorders. **Biochemical Pharmacology**, v. 96, n. 3, p. 225–236, 2015.

MUSCARA, M.N.; WALLACE, J.L. Nitric oxide V. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **American Journal of Physiology**, v.276, p.G1313-G1316. 1999.

NAIK, J.S.; O'DONAUGHY, T.L.; WALKER, B.R. Endogenous carbon monoxide is an endothelial-derived vasodilator factor in the mesenteric circulation. **Heart and Circulatory Physiology**. v.284, p.H838–H845. 2003.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. **Archives of Pharmacal Research**. v.32, n.8, p.1103–1108. 2009.

NASSINI, R.; ANDRE, E.; GAZZIERI, D. et al., A bicarbonate-alkaline mineral water protects from ethanol-induced hemorrhagic gastric lesions in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v.33, p.1319–1323. 2010.

NICOLAU, L.A.; SILVA, R.O.; DAMASCENO, S.R.; et al. The hydrogen sulfide donor, Lawesson's reagent prevents alendronate-induced gastric damage in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 46, p.708–714. 2013.

NIZAMUTDINOVA, I.T.; KIM, Y.M.; KIM, H.J. et al. Carbon monoxide (from CORM-2) inhibits high glucose-induced ICAM-1 expression via AMP-activated protein kinase and PPAR-gamma activations in endothelial cells. **Atherosclerosis**. v.207, n.2, p.405-11. 2009.

NUNES, A.K.S.; RAPÔSO, C.; ROCHA, S.W.S. Involvement of AMPK, IK β -NF κ B and Enos in the sildenafil anti-inflammatory mechanism in a demyelination model. **Brain Research**, v.16, 119 -133. 2015.

O'NEILL, L. A.; HARDIE, D.G. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. **Nature**, v.493, p.346. 2013.

PARK, E.J.; KIM, Y.; CHANG, K.C Hemin Reduces HMGB1 release by UVB in an AMPK/HO-1-dependent pathway in human keratinocytes HaCaT cells. **Archives of Medical Research**. v.48, p.423-431. 2017.

PEERS, C., STEELE, D. S. Carbon monoxide: a vital signalling molecule and potent toxin in the myocardium. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.52, p.359–365. 2012.

PESKAR, B. M.; HOPPE, U.; LANGE, K.; PESKAR, B. A. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on rat gastric mucosal leukotriene C₄ and prostanoid release: relation to ethanol-induced injury. **British Journal of Pharmacology**, v. 93, n. 4, p. 937-943, 1988.

POLEKHINA, G.; GUPTA, A.; MICHELL, BJ, et al. AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. **Current Biology**. v.13, n.10, p.867-71. 2003.

POLHEMUS, D. J.; LEFER, D. J. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. **Circulation Research**. v.114,p.730–737. 2014.

QIANG, M. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 53, p.401–426. 2013.

RABINOVITCH, R.C.; SAMBORSKA, B.; FAUBERT, B. et al. AMPK Maintains Cellular Metabolic Homeostasis through Regulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. **Cell Reports**. v. 21, p.1-9. 2017.

REHM, J.; BALIUNAS, D.; BORGES, G.L. et al. The relation between different dimensions of alcohol consumption and burden of disease: an overview. **Addiction**. v.105, n.5, p.817-43. 2010.

REIHILL, J. A.; EWART, M. A.; HARDIE, D. G.; SALT, I. P. AMP-activated protein kinase mediates VEGF-stimulated endothelial NO production. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.354, p.1084-1088. 2007.

RIOS, M.; FORETZ, M.; VIOLLET, B. et al. AMPK activation by oncogenesis is required to maintain cancer cell proliferation in astrocytic tumors. **Cancer Research**.v.73, n.8, p.2628-38. 2013.

ROGERS. A.C.; HUETTER., L.; HOEKSTRA, N et al. Activation of AMPK Inhibits Cholera Toxin Stimulated Chloride Secretion in Human and Murine Intestine. **PLOS ONE**. v. 8, n.7, p.69050, 2013.

RUIFROK, A.C.; JOHNSTON, D.A. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**. v.23,n.4, p.291-299.2001.

SALGA, M.S., ALI, H.M., ABDULLA, M.A., ABDELWAHAB, S.I. Gastroprotective activity and mechanism of novel dichlorido-zinc(II)-4-(2-(5-methoxybenzylideneamino) ethyl)piperazin-1-iumphenolate complex on ethanol-induced gastric ulceration. **Chemico-Biological Interactions**. v.195, p.144–153. 2012.

SANTANA, A.P.M.; TAVARES, B.M.; LUCETTI, L.T. et al. The nitric oxide donor cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)NO](PF₆) increases gastric mucosa protection in mice – Involvement of the soluble guanylate cyclase/KATP pathway. **Nitric Oxide**. v.45, p. 35-42. 2015.

SHIBUYA, N.; KIMURA, H. Production of hydrogen sulfide from D-cysteine and its therapeutic potential. **Frontiers in Endocrinology**, v.4, p.87. 2013.

SHIBUYA, N.; TANAKA, M.; YOSHIDA, M. et al. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. **Antioxidants & Redox Signaling**. v.11, p.703–714. 2009.

SHIRWANY,N.A.; ZOU, M.H. AMPK: a cellular metabolic and redox sensor. A minireview. **Frontiers in Bioscience**. v.19, p.447–474. 2014.

SIDANI, S.; KOPIC, S.; SOCRATES, T. et al. AMP-activated protein kinase: a physiological off switch for murine gastric acid secretion. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v.459, p.39–46, 2009.

SILVA, R.O.; BINGANA, R.D.; SOARES, P.M.G. et al. The role of nitric oxide in alendronate-mediated acceleration of gastric emptying and gastrointestinal transit in rats. **African Journal Pharmacology**. v.9, n.10, p.307-312. 2015.

SILVA, R.O.; LUCETTI, L.T.; WONG, D.V. et al. Alendronate induces gastric damage by reducing nitric oxide synthase expression and NO/cGMP/K(ATP) signaling pathway. **Nitric Oxide**. v.40, p. 22-30. 2014.

SMITH JR, R.S.; AGATA, J.; XIA, C.F. et al. Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery protects against cardiac remodeling and reduces oxidative stress after myocardial infarction. **Life Sciences**. v.76, p.2457-2471. 2005.

SONG, K.; WANG, F.; LI, Q. et al. Hydrogen sulfide inhibits the renal fibrosis of obstructive nephropathy. **Kidney International**. v.85,p.1318–1329. 2014.

SOUZA, L.K.M.; ARAÚJO, T.S.L.; SOUSA, N.A et al. Evidence that D-cysteine protects mice from gastric damage via hydrogen sulfide produced by D-amino acid oxidase. **Nitric Oxide**, v. 64, p.1- 6. 2017.

TAKEUCHI K, ISE F, TAKAHASHI K, AIHARA E, HAYASHI S. H₂S induced HCO₃⁻ secretion in the rat stomach-involvement of nitric oxide, prostaglandins, and capsaicin-sensitive sensory neurons. **Nitric Oxide**, v.30, p.157–164. 2015.

TAKEUCHI, K.; MORIZANE, Y.; C. KAMAMI-LEVY, C. et al. AMPK inhibits oxidative stress induced caveolin-1 phosphorylation and endocytosis by suppressing the dissociation between c-Abl and prdx1 in endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v.288, n.28, p.20581-91. 2013.

TOYODA, T.; HAYASHI, T.; YONEMITSU, S. et al. Possible involvement of the alpha1 isoform of 5'AMP-activated protein kinase in oxidative stress-stimulated glucose transport in skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**. v.287, p.166-173. 2004.

WALKER, J.; JIJON, H.B.; CHURCHILL, T et al. M. Activation of AMP-activated protein kinase reduces cAMP-mediated epithelial chloride secretion. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**. v.285: p.G850–G860, 2003.

WALLACE, J.L.; DICAY, M.; MCKNIGHT, W.; MARTIN, G.R. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. **The FASEB Journal**. v.21, p.4070–4076. 2007.

WHITEMAN, M.; LI, L., ROSE, P.; TAN, C.-H.; PARKINSON, D. B.; MOORE, P. K. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. **Antioxidants & Redox Signaling**. v.12, p.1147–1154.2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on alcohol and health. 2011. Disponível em: <
http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf>
. Acesso em 10 jan.2018.

WU, D.; CEDERBAUM, A.I. Oxidative stress and alcoholic liver disease. **Seminars in Liver Disease**. v.29, p.141–154. 2009.

XIE H, XU Q, JIA J, et al. Hydrogen sulfide protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by activating AMP-activated protein kinase to restore autophagic flux. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.458, n.3, p.632-638. 2015.

XIE, Z., DONG, Y.; ZHANG, M.; et al. Activation of protein kinase C zeta by peroxynitrite regulates LKB1-dependent AMP-activated protein kinase in cultured endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v.281, p.6366-6375. 2006.

YANG M, HUANG Y, CHEN J, CHEN YL, et al. Activation of AMPK participates hydrogen sulfide-induced cyto-protective effect against dexamethasone in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.454, n.1, 42–47. 2014.

YANG, F.; ZHANG, L.; GAO, Z. et al. Exogenous H₂S Protects Against Diabetic Cardiomyopathy by Activating Autophagy via the AMPK/mTOR Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v.43, p.1168-1187. 2017.

YOUNG, M. E.; RADDI, G. K.; LEIGHTON, B. Activation of glycogen phosphorylase and glycogenolysis in rat skeletal muscle by AICAR--an activator of AMP-activated protein kinase. **FEBS Letters**. v.382, n.1-2, p.43-7. 1996.

ZHANG, J.; XIE, Z.; DONG, Y.; WANG, S.; LIU, C.; ZOU, M. H. Identification of nitric oxide as an endogenous activator of the AMP-activated protein kinase in vascular endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v.283, p.27452-27461. 2008.

ZHANG, Y.; LEE, T.S.; KOLB, E.M. et al. AMP-activated protein kinase is involved in endothelial NO synthase activation in response to shear stress. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.26, n.6, p.1281-7. 2006.

ZHOU, X.; AN, G.; CHEN, J. Hydrogen sulfide improves left ventricular function in smoking rats via regulation of apoptosis and autophagy. **Apoptosis**. v.19, p.998–1005. 2014(a).

ZHOU, X.; CAO, Y.; AO, G. et al. CaMKKb-dependent activation of AMP-activated protein kinase is critical to suppressive effects of hydrogen sulfide on neuroinflammation. **Antioxidants & Redox Signaling**. v.21, p.1741–1758. 2014(b).

ZIMMERMANN, K.; BALDINGER, J.; MAYERHOFER, B. et al. Activated AMPK boosts the Nrf2/HO-1 signaling axis—A role for the unfolded protein response. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 88, p.417–426. 2015.

ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CEEA/UFPI



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Estudo do papel da Proteína Cinase Ativada por AMP (AMPK) no efeito gastroprotetor do H₂S, NO e CO em modelos de úlceras gástricas induzidas por etanol ou indometacina em camundongos”, registrada nº 228/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. JAND VENES ROLIM MEDEIROS– Farmacologia_ Campus Ministro Reis Veloso/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **04/11/2016**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Novembro/2016 à Dezembro/ 2017
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo isogênico/Swiss
Nº de Animais	276
Peso/ Idade	20-35g/ 1 mês
Sexo	Machos ou Fêmeas
Origem	Biotério de Manutenção de Animais destinados a Experimentação do Departamento de Morfofisiologia Veterinária-CCA/UFPI.

Teresina, 04 de Novembro de 2016.


Prof. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora