

EFEITO DO LIPOPOLISSACARÍDIO BACTERIANO SOBRE O ESVAZIAMENTO GÁSTRICO DE RATOS: avaliação do pré-tratamento com N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)

Edgard Ferro COLLARES¹ e Adriana Mendes VINAGRE²

RESUMO – *Racional* - Há evidências de que o óxido nítrico participa do mecanismo de retardo do esvaziamento gástrico determinado pelo lipopolissacarídeo bacteriano. *Objetivo* - Avaliar o efeito do pré-tratamento com N^w-nitro-L-arginine methyl ester, um inibidor competitivo das óxido nítrico-sintetases, sobre o fenômeno. *Material e métodos* – Utilizaram-se ratos, Wistar, machos, SPF (“specific-pathogen free”), adultos, adaptados às condições do laboratório, que após 24 horas de jejum alimentar foram pré-tratados endovenosamente com veículo (salina) ou N^w-nitro-L-arginine methyl ester nas doses de 0,5, 1, 2,5 e 5 mg/kg. No tratamento, administraram-se endovenosamente veículo (salina) ou lipopolissacarídeo (50 µg/kg). O intervalo entre o pré-tratamento e o tratamento foi de 10 minutos, e entre este e a avaliação do esvaziamento gástrico foi de 60 minutos. O esvaziamento gástrico foi avaliado indiretamente através da determinação da retenção gástrica da solução salina marcada com fenol vermelho 10 minutos após administração por via orogástrica. *Resultados* - Entre os animais pré-tratados com veículo, o tratamento com lipopolissacarídeo determinou elevação significativa da retenção gástrica (média = 57%) em relação aos tratados com veículo (38,1%). O pré-tratamento com as diferentes doses de N^w-nitro-L-arginine methyl ester não modificou a retenção gástrica nos animais controles do tratamento. O pré-tratamento com N^w-nitro-L-arginine methyl ester com a dose de 1 mg/kg determinou redução discreta, mas significativa, na retenção gástrica (52%) nos animais tratados com lipopolissacarídeo, em relação ao observado naqueles com pré-tratamento e tratamento com veículo (35,9%). Nos animais pré-tratados com 2,5 e 5 mg/kg de N^w-nitro-L-arginine methyl ester e tratados com lipopolissacarídeo, houve aumento significativo da retenção gástrica (74,7% e 80,5%, respectivamente) em relação aos seus controles pré-tratados com as mesmas doses do inibidor das óxido nítrico-sintetases e tratados com veículo (40,5% e 38,7%, respectivamente) e àqueles pré-tratados com veículo e tratados com a mesma toxina. *Conclusão*: O pré-tratamento com N^w-nitro-L-arginine methyl ester numa dose baixa (1 mg/kg) determinou redução discreta no efeito de retardo do esvaziamento gástrico determinado pelo lipopolissacarídeo in vivo e aumento significativo do retardo com doses mais elevadas (2,5 e 5 mg/kg), doses estas que, per se, não interferem no esvaziamento.

DESCRIPTORIOS – Esvaziamento gástrico. Lipopolissacarídeos. Óxido nítrico sintase. N^w-nitro-L-arginine metil ester L-NAME. Ratos.

INTRODUÇÃO

O esvaziamento gástrico (EG) é um processo complexo de transferência ordenada do conteúdo gástrico para o intestino delgado, resultante da ação de mecanismos estimuladores e inibitórios que controlam a atividade motora do estômago, piloro e duodeno⁽¹⁶⁾.

O lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, por via intravenosa, determina retardo do EG de uma refeição líquida em ratos. Este fenômeno guarda relação com a dose da endotoxina,

ocorre precocemente e há evidências da participação do nervo vago no mesmo⁽⁹⁾. Foi também observado que o pré-tratamento com o próprio LPS aboliu este efeito, reproduzindo o fenômeno de tolerância precoce, já descrito para outras alterações produzidas pela endotoxina⁽¹⁰⁾. Mais recentemente, foi verificado, in vivo, que o pré-tratamento intravenoso (iv) com azul de metileno ou com a dexametasona bloqueou o retardo do EG precoce e tardio, respectivamente, determinado pela toxina⁽¹¹⁾. Estas observações sugerem a participação do óxido nítrico (ON) no fenômeno, visto que o azul de metileno

Trabalho realizado no ¹ Departamento de Pediatria, ² Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental e Centro de Investigação em Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, SP.
Endereço para correspondência: Dr. Edgard Ferro Collares - Departamento de Pediatria - Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP - Cidade Universitária Zeferino Vaz - Barão Geraldo - 13083-970 - Campinas, SP. E-mail: efcollares@hotmail.com

bloqueia a guanilato-ciclase, inativa o ON e inibe as ON sintetases (ONS)⁽¹⁸⁾. A síntese do ON, a partir de L-arginina, depende da ação das ONS constitutivas, nc-ONS (ou ONS I), e ec-ONS (ou ONS III), no sistema nervoso e endotélio vascular, respectivamente, e da i-ONS (ou ONS II), induzida pela endotoxina ou citocinas^(13,21). A dexametasona bloqueia a indução da i-ONS^(11,13,21).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do bloqueio da produção do ON pelo uso de N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), um inibidor competitivo das ONS, sobre a ação do LPS no esvaziamento gástrico em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos Wistar, machos, SPS ("specific pathogen free"), com 8-10 semanas de vida, pesando entre 220-280 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas. Antes do estudo, os animais permaneceram pelo menos 2 semanas adaptando-se às condições do laboratório, com temperatura entre 22-26°C, ritmo de luz/penumbra de 12/12 horas, recebendo água e ração (Labina, Purina) ad libitum. O estudo foi realizado obedecendo às recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

As drogas utilizadas foram o LPS de *E. coli* 055:B5 (Sigma) na concentração de 50 µg/mL e N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Sigma) nas concentrações 0,5, 1, 2,5 e 5 mg/mL. Foi utilizada como veículo a solução salina estéril e livre de pirogênio. Em todos estudos os volumes administrados iv, utilizando uma das veias da cauda do animal, foram equivalentes para cada animal e para cada aplicação (0,1 mL/100 g de peso do animal).

No pré-tratamento, os animais foram divididos em quatro grupos definidos pelas doses de 0 (veículo), 0,5, 1, 2,5 e 5 mg/kg de peso de L-NAME, administradas 10 minutos (min) antes do tratamento com veículo (C) ou LPS (50 µg/kg de peso). O EG foi avaliado 60 min após o término da injeção do tratamento.

Os estudos foram realizados entre 14-17 h do dia, após 24 horas de jejum alimentar, com livre acesso à água, o qual era suspenso no momento da prova.

Para o estudo do EG, a refeição de prova (RP) consistiu de 2 mL/100 g peso de rato de uma solução aquosa de NaCl a 0,9% (p/v), contendo 6 mg/dL de fenol vermelho como marcador. Em todos experimentos, a avaliação do EG foi feita indiretamente, com os animais acordados, através da determinação da porcentagem (%) de retenção gástrica (RG) do fenol vermelho da RP recuperado do conteúdo gástrico 10 min após sua administração orogástrica, utilizando técnica padronizada^(3,5).

Na análise estatística foi empregada ANOVA, seguida quando indicado, do teste de Tukey para comparação entre os pares ($\alpha=0,05$, para ambos testes).

RESULTADOS

Os resultados são apresentados na Figura 1. No grupo pré-tratado com veículo e tratado com LPS, os animais apresentam RG (média = 57%) significativamente mais elevada em relação aos seus controles, que receberam veículo nas duas ocasiões (38,1%), confirmando estudos anteriores sobre o efeito da

endotoxina no EG^(9,10,11). O pré-tratamento com as diferentes doses de L-NAME não modificou a RG nos animais controles do tratamento.

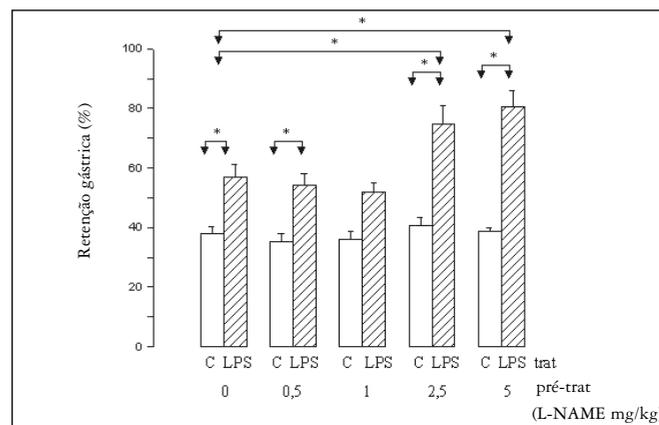


FIGURA 1 – Retenção gástrica (%) em média ± SEM de uma refeição de prova salina, 10 minutos (min) após administração orogástrica a ratos. Os animais foram pré-tratados (pré-trat), por via intravenosa (iv), com veículo (0) e quantidades variáveis de L-NAME (0,5, 1, 2,5 e 5 mg/kg), para cada grupo. No tratamento (trat) de cada grupo, os animais receberam veículo (C) ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 50 µg/kg, também iv. O intervalo entre o pré-tratamento e o tratamento foi de 10 min e a determinação da retenção gástrica foi realizada 60 min após o término do tratamento. n = 8; * = P < 0,05 (teste de Tukey)

O grupo pré-tratado com L-NAME, na dose de 1 mg/kg, apresentou redução discreta no efeito do LPS sobre a RG (52%), contudo, suficiente para que a RG não diferisse significativamente do seu controle tratado com veículo (35,9%).

O pré-tratamento com doses mais elevadas de L-NAME (2,5 e 5 mg/kg) determinou aumento significativo da RG nos animais que receberam endotoxina (74,7% e 80,5%, respectivamente), em relação aos seus controles (40,5% e 38,7%, respectivamente) e àqueles pré-tratados com salina e que receberam a mesma toxina como tratamento.

DISCUSSÃO

Há consenso na literatura de que o EG está retardado durante a endotoxemia induzida por LPS. Como o estômago proximal, que inclui o fundo gástrico, participa do EG de líquidos⁽²²⁾, o efeito do LPS poderia ser devido à liberação de ON neste segmento. Em condições inflamatórias induzidas por LPS, o relaxamento que ocorre no fundo gástrico parece estar relacionado com a produção local ON⁽⁷⁾. Em estudo anterior, apresentaram-se evidências da participação do ON no retardo, determinado pelo LPS, do EG de uma refeição líquida em ratos⁽¹¹⁾.

Na presente observação, a redução discreta do efeito no EG determinada pela endotoxina, em consequência do pré-tratamento com L-NAME na dose de 1 mg/kg, é uma indicação adicional da participação do ON no fenômeno. Contudo, a razão da acentuação do retardo do esvaziamento, observada

com doses maiores do inibidor da ONS em animais tratados com LPS, é desconhecida.

Possível explicação poderia estar na atividade da região antrodoenal, que é crucial na regulação do EG, onde o ON é o neurotransmissor não-colinérgico não-adrenérgico, que exerce ação inibitória tônica na região pilórica⁽¹⁾. Estudo in vitro sugere que o LPS no esfíncter pilórico, de forma diferente do que ocorre nos esfíncteres esofágico inferior e anal, determina atenuação do relaxamento não-colinérgico não-adrenérgico com aumento da contração da musculatura lisa pela ativação de receptores colinérgicos muscarínicos, contribuindo assim, para o retardo do EG induzido pela toxina⁽¹²⁾. Sendo assim, o pré-tratamento com doses elevadas de um inibidor potente da ONS, como o L-NAME, poderia determinar em consequência, diminuição local de ON e acentuação do retardo do EG nos animais tratados com LPS, pelo aumento da resistência ao fluxo da refeição através deste esfíncter.

Tornando mais complexa a interpretação dos resultados deste estudo, tem sido proposto que administração de um inibidor de ONS na primeira fase da exposição ao LPS, como no presente caso, inibe o ON produzido pela ativação das ecONS, agravando o efeito deletério da toxina sobre o sistema vascular intestinal⁽⁴⁾. Este fenômeno seria consequência da liberação concomitante, induzida pela toxina, de fatores no endotélio (endotelinas) que, pelo bloqueio do ON, predominariam com consequente vasoconstrição^(19, 20, 21). O LPS, em ratos, determina diminuição da pressão arterial e do fluxo sanguíneo mesentérico, fenômenos atenuados pelo pré-tratamento com L-NAME^(2, 14). Contudo, foi constatado que há também, com a administração do L-NAME, diminuição do fluxo sanguíneo capilar na mucosa do

sistema digestório, aumentado pela administração de LPS^(4, 15, 17). Assim, é possível admitir que, nas condições experimentais a que os animais foram submetidos no presente estudo, haja comprometimento da microcirculação das camadas musculares do sistema digestório.

Por outro lado, redução acentuada do fluxo sanguíneo no mesentério modifica a atividade motora gastrointestinal de forma bifásica, ocorrendo inicialmente aumento, com duração de alguns minutos, seguido posteriormente de redução^(8, 24). Adicionalmente, em leitões recém-nascidos, a hipoxemia e redução do fluxo sanguíneo gástrico resultaram em retardo do EG⁽²³⁾. Também foi descrita alteração bifásica, característica do trânsito gastrointestinal, na endotoxemia induzida pelo LPS, que é acelerado na fase inicial (aos 90 minutos após a administração) seguido de diminuição posterior, fatos atribuídos às alterações na motilidade intestinal. Estes fenômenos ocorrem concomitantes com o retardo do EG⁽⁶⁾.

Desta forma, em termos especulativos, o comprometimento da microcirculação da víscera, com o incremento da dose do inibidor da ONS, em animais tratados com LPS, poderia ser um dos fatores que determinou o aumento da RG neste estudo. Para definir se isto atuaria isoladamente ou em associação com a disfunção pilórica, seriam necessários outros experimentos, utilizando métodos adequados para avaliar essas hipóteses.

Em conclusão, o pré-tratamento com L-NAME com dose baixa (1 mg/kg) determinou redução discreta no efeito de retardo do EG determinado pelo LPS in vivo e aumento significativo do retardo com doses mais elevadas (2,5 e 5 mg/kg), doses estas que, per se, não interferem no esvaziamento.

Collares EF, Vinagre AM. The effect of bacterial lipopolysaccharide on the gastric emptying of rats: a pretreatment evaluation using N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). *Arq Gastroenterol*. 2006;43(3): 229-31.

ABSTRACT – Background - There is evidence that nitric oxide plays a role in the decrease in gastric emptying induced by bacterial lipopolysaccharide. **Aim** - To evaluate the effect of pretreatment with N^w-nitro-L-arginine methyl to ester, one competitive inhibitor of the nitric oxide synthases, on the gastric emptying delay induced by lipopolysaccharide. **Material and Methods** - Male Wistar rats, SPF, were used after 24 h fast and 1 h-water withdrawn. The pretreatment was done intravenously with vehicle (saline) or N^w-nitro-L-arginine methyl to ester in the doses of 0.5, 1, 2.5 e 5 mg/kg. After 10 min, the animals were treated iv with lipopolysaccharide (50 µg/kg) or received vehicle (saline). The gastric emptying was evaluated 1 h after the lipopolysaccharide administration. A saline solution containing phenol red was used as the test meal. The gastric emptying was indirectly assessed by the determination of percent gastric retention of the test meal 10 min after orogastric administration. **Results** - The animals pretreated with vehicle and treatment with lipopolysaccharide have significant rise of the gastric retention (average = 57%) in comparison with the controls receiving only vehicle (38.1%). The pretreatment with the different doses of N^w-nitro-L-arginine methyl to ester did not modify per se the gastric retention in comparison with the animals pretreated with vehicle. Pretreatment with N^w-nitro-L-arginine methyl to ester with the dose of 1 mg/kg determined a discrete but significant reduction in the gastric retention (52%) of animals treated with lipopolysaccharide in comparison with vehicle-pretreated rats. Paradoxically, animals pretreated with 2.5 or 5 mg of N^w-nitro-L-arginine methyl to ester/kg followed by treatment with lipopolysaccharide displayed a significantly higher gastric retention (74.7% and 80.5%, respectively) as compared to their controls, pretreated with the same doses of the inhibitor and treated with vehicle (40.5% and 38.7%, respectively) and to those pretreated with vehicle and treated with the same toxin. **Conclusion** - The pretreatment with N^w-nitro-L-arginine methyl to ester at low dose (1 mg/kg) resulted in a discrete inhibition of the gastric emptying delay induced by lipopolysaccharide. Nevertheless, N^w-nitro-L-arginine methyl to ester at higher doses (2.5 and 5 mg/kg) induced an enhancement of the lipopolysaccharide effect on gastric emptying, despite not interfering with the gastric emptying per se.

HEADINGS – Gastric emptying. Lipopolysaccharides. Nitric oxide synthase. N^w-nitro-L-arginine methyl ester L-NAME. Rats.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allescher H-D, Daniel EE. Role of NO in pyloric, antral, and duodenal motility and its interaction with other inhibitory mediators. *Dig Dis Sci*. 1994;39:73s-5s.
2. Baykal A, Kavuklu B, Iskit AB, Guc MO, Hascelik G, Sayek I. Experimental study of the effect of nitric oxide inhibition on mesenteric blood flow and interleukin-10 levels with lipopolysaccharide challenge. *World J Surg*. 2000;24:1116-20.
3. Belangero VMS, Collares EF. Esvaziamento gástrico e acidose metabólica. I Estudo de um modelo experimental em ratos, empregando uma solução de cloreto de amônio por via orogástrica. *Arq Gastroenterol*. 1991;28:145-50.
4. Boughton-Smith NK, Evans SM, Laszlo F, Whittle BJR, Moncada S. The induction of nitric oxide synthase and intestinal vascular permeability by endotoxin in rat. *Br J Pharmacol*. 1993;110:1189-95.
5. Bucarechi F, Collares EF. Effect of *Phonotria nigriventer* spider venom on gastric emptying in rats. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29:205-11.
6. Ceregrzyn M, Kamata T, Yajima T, Kuwahara A. Biphasic alterations in gastrointestinal transit following endotoxaemia in mice. *Neurogastroenterol Mot*. 2001;13:605-13.
7. Ceregrzyn M, Kuwahara A. Involvement of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced gastric relaxation in mice. *Biomed Res*. 2002;23:263-72.
8. Chou CC. Relationship between intestinal blood flow and motility. *Ann Rev Physiol*. 1982;44:29-42.
9. Collares EF. Effect of bacterial lipopolysaccharide on gastric emptying of liquids in rats. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30:207-11.
10. Collares EF. Effect of tolerance to bacterial lipopolysaccharide on gastric emptying in rats. *Arq Gastroenterol*. 1997;34:227-30.
11. Collares EF, Vinagre AM. Efeito do lipopolissacarídeo bacteriano sobre o esvaziamento gástrico de ratos: avaliação do pré-tratamento com dexametasona e azul de metileno. *Arq Gastroenterol*. 2003;40:104-9.
12. Fan Y-P, Chakder S, Gao F, Rattan S. Inducible and neuronal nitric oxide synthase involvement in lipopolysaccharide-induced sphincteric dysfunction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;280:G32-G42.
13. Förstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expression control. *Biochem Pharmacol*. 1995;50:1321-32.
14. Hayes JK, Havaleshko DM, Plachinta RV, Rich GF. Isoflurane pretreatment supports hemodynamics and leukocyte rolling velocities in rat mesentery during lipopolysaccharide-induced inflammation. *Anesth Analg*. 2004;98:999-1006.
15. Helmer KS, West SD, Shipley GL, Ghang L, Cui Y, Mailman D, Mercer DW. Gastric nitric oxide synthase expression during endotoxemia: implications in mucosal defense in rats. *Gastroenterology*. 2002;123:173-86.
16. Hunt JN. Mechanisms and disorders of gastric emptying. *Ann Rev Med*. 1983;34:219-29.
17. Hutcheson IR, Whittle BJR, Boughton-Smith NK. Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Br J Pharmacol*. 1990;101:815-20.
18. Lohse MJ, Förstermann U, Schmidt HHHW. Pharmacology of NO: cGMP signal transduction. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1998;358:111-2.
19. Martin MJ, Jiménez MD, Motilva V. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des*. 2001;7:881-908.
20. Mateo AO, De-Artiñano AA. Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol Res*. 1997;36:339-51.
21. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329:2002-12.
22. Read NW, Houghton LA. Physiology of gastric emptying and pathophysiology of gastroparesis. *Gastroenterol Clin North Am*. 1989;18:359-404.
23. Szabo JS, Stonestreet BS, Oh W. Effects of hypoxemia on gastrointestinal blood flow and gastric emptying in the newborn piglet. *Pediatr Res*. 1985;19:466-71.
24. Walus, KM, Jacobson ED. Relation between small intestinal motility and circulation. *Am J Physiol*. 1981;241:G1-G15.

Recebido em 3/6/2005.
Aprovado em 8/8/2005.