

Candidato(a): INÊS APARECIDA BUSCARIOLO.

Titulo da Dissertação: Efeito da melatonina sobre a úlcera gástrica induzida por antiinflamatórios não-esteroidais (piroxicam e fenilbutazona).

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da
Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a
03 / 07 / 97, considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

1) Examinador(a) 

2) Examinador(a) 

3) Presidente 

INÊS APARECIDA BUSCARIOLO

**EFEITO DA MELATONINA SOBRE A ÚLCERA
GÁSTRICA INDUZIDA POR
ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS
(PIROXICAM E FENILBUTAZONA)**

**Dissertação apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do título de
Mestre em Farmacologia**

**Área de concentração :
Farmacologia**

**Orientadora :
Profa. Dra. Lia Siguemi Sudo-Hayashi**

**São Paulo
1997**



FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

T. ICB
BMF
B976e
1997

Buscariolo, Inês Aparecida.

Efeito da melatonina sobre a úlcera gástrica induzida por antiinflamatórios não-esteroidais (piroxicam e fenilbutazona) / Inês Aparecida Buscariolo. -- São Paulo, 1997.

Dissertação (mestrado)--Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Sudo-Hayashi, Lia Siguemi.

Descritores: 1. Lesão gástrica 2. AINEs 3. Piroxicam 4. Melatonina
5. PGE₂

ICB/SBIB.048/97

“ O IMPORTANTE É A BUSCA DA FELICIDADE ”

Dedido este trabalho a toda minha família (Sandra Helena, Márcio Atos, Jorge Nei, Maristela Regina, Sônia Leni, Lucas João Filho, Sebastião, Luís Inácio e Maria José) e seus familiares.

Aos meus pais (*in memoriam*), especialmente à minha mãe, D. Santa, que partiu sem ver essa etapa concluída, deixando grandes recordações e ensinamentos....

Meus agradecimentos :

- à Profa. Dra. Lia S. Sudo-Hayashi, meus agradecimentos especiais pela orientação prestimosa desse trabalho;
- à Profa. Dra. Regina Pekelman Markus pela co-orientação e dedicação nessa etapa;
- à Pesquisadora Dra. Catarina P. Teixeira, pelos ensaios, ensinamentos e descontração proporcionados em seu laboratório;
- ao Prof. Dr. Jaime Sertié por ceder seu laboratório, além de seus conhecimentos e à Profa. Dra. Eliana Parisi por alguns empréstimos materiais;
- à Inês Pedroso e a Dona Cida, pelos cuidados indispensáveis no laboratório e no biotério;
- às meninas da biblioteca (Isabel, Delza, Elza, Valmira e Carminha), enfim ao quadro de funcionários da biblioteca do ICB, pela paciência e colaboração;
- ao laboratório Pfizer, pela doação do piroxicam para esse estudo;
- ao Prof. Dr. Ricardo Martins de Oliveira-Filho pelas oportunidades, amizade, ajuda, esclarecimentos acadêmico-didáticos;
- ao Prof. Dr. Roberto de Lucia pela amizade e opiniões;
- aos Pós-Graduandos e Pós-Doutorandos do ICB, que oriundos de diversos lugares, buscam num mesmo local um objetivo comum;
- ofereço não só este trabalho, mas esta etapa da minha vida, especialmente àqueles indivíduos que tiveram a coragem de escolher a carreira acadêmico-científica em detrimento a outras oportunidades mais fáceis, realizáveis, recompensáveis e até certo ponto menos árduas. E àqueles, que ao contrário dos anteriores, pela falta de coragem e oportunidades, acidental e ocasionalmente escolheram essa carreira, cuja maior função é questionar sempre que lhe é oportuno (até para testar os anteriores) porque estes fizeram essa escolha quando tiveram e têm a oportunidade de outras realizações. Então, estes com o passar do tempo não mais perguntam e superam suas frustrações e se levantam em busca da verdade. E não esquecendo de oferecer àqueles que ainda não sabem de onde vieram, porque fazem ou fizeram, o que são, o que farão e para onde vão;

- àqueles que fazem o ICB existir, desde o indivíduo que mantém o chão brilhando até aquele que o administra e ao cidadão que paga seus impostos para manter e sustentar essa máquina acadêmico-científica chamada USP, minha estima e agradecimento;
- à todos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, os responsáveis pela minha graduação e formação como um todo e pelo privilégio de ter pertencido a esse lar;
- ao Prof. Dr. Tetuo Okamoto e a Profa. Dra. Maria Cristina Rosifini Alves-Resende e a FAPESP que viabilizaram logo nos primórdios da graduação meu interesse acadêmico- científico; minha gratidão, respeito e amizade;
- ao Prof. Dr. Sebastião Hetem que permitiu testar minhas perguntas científicas, não acabadas mas começadas;
- à Profa. Dra. Maria Tereza Barbieri Bedran Lima de Castro (*in memoriam*) pela sua empolgação, dedicação a carreira acadêmico-científica, conselhos e incentivos, não pôde comprovar os resultados, quem sabe...
- aos meus respeitosos amigos-companheiros-irmãos, da XXXIV turma de graduação, que haviam pré-estabelecido meus caminhos na carreira acadêmico-científica, afinal eram tantas as indagações;
- finalmente à todos com os quais caminhei, ou quem sabe só esbarrei, cruzei, evitei ou ainda só observei, analisei sem nenhuma aproximação, mas que com certeza em alguma coisa contribuiu, às vezes até mais que o esperado. Ao meu ver a vida é uma estrada, que tem início, meio e fim e é durante este percurso (período de vida) que reside o privilégio de podermos melhorar ou piorar nosso espírito, nossa compreensão e paciência. Assim como, nossa capacidade de perdoar, de corrigir falhas, de ajudar o semelhante e finalmente de contribuir para melhorar a natureza humana, preservando e aperfeiçoando essa estrada para que gerações futuras usufruam dessa viagem em melhores condições que as anteriores.

ABREVIATURAS

AA.....	ácido araquidônico
AINE.....	antiinflamatório não-esteroidal
AINES.....	antiinflamatórios não-esteroidais
AMPc.....	monofosfato de adenosina cíclico
ATP.....	trifosfato de adenosina
ATPase.....	adenosina trifosfatase
COX.....	ciclooxigenase
DAG.....	diacilglicerol
EIA.....	enzima imuno-ensaio
GHT.....	trato geniculohipotalâmico
GMPC.....	fosfato de guanosina cíclico
HIOMT.....	Hidroxil-Indol-O-Metil-Transferase
LPOX.....	lipoxigenase
LPOX.....	lipoxigenase
MEL.....	melatonina
NAT.....	N-acetiltransferase
NE.....	norepinefrina
NO.....	óxido nítrico
NOS.....	óxido nítrico sintetase
PAF.....	fator ativador de plaqueta

PG.....	prostaglandina
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGH ₂	prostaglandina H ₂
PGI ₂	prostaciclina
PKA.....	proteína quinase A
PKC.....	proteína quinase C
PLA ₁	fosfolipase A ₁
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PLC.....	fosfolipase C
PLD.....	fosfolipase D
PUFA.....	ácidos graxos poliinsaturados
RHT.....	trato retinohipotalômico
TGI.....	trato gastrointestinal
TXA ₂	tromboxana A ₂
VIP.....	peptídeo intestinal vasoativo

CONTEÚDO :**LISTA DE ABREVIATURAS****RESUMO****INTRODUÇÃO**

1. Farmacologia dos antiinflamatórios não-esteroidais	01
2. Fisiologia da mucosa gástrica e fisiopatologia da úlcera gástrica por AINEs	07
2.1. Secreção ácida	08
2.2. Secreção de muco e bicarbonato	08
2.3. Fluxo sanguíneo	10
2.4. Reparação tecidual	12
3. Cronofarmacologia da atividade antiinflamatória e ulcerogênica dos AINEs	13
4. Melatonina	14
OBJETIVOS	18

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais	19
2. Tratamentos farmacológicos	19
2.1. Melatonina	19
2.2. Piroxicam e / fenilbutazona	19
3. Modelo de estudo da inflamação aguda: edema de pata em rato induzido pela carragenina	20

4. Modelos de estudo da lesão gástrica	21
4.1. Ulceração gástrica induzida pelo piroxicam	21
4.2. Ulceração gástrica induzida pela fenilbutazona	22
4.3. Ulceração gástrica pelo estresse	23
5. Pinealectomia	24
6. Quantificação de PGE ₂	25
7. Análise estatística	26
8. Drogas e reagentes	26
RESULTADOS	
1. Melatonina exógena e o efeito antiinflamatório do piroxicam	27
2. Melatonina exógena e a lesão gástrica induzida pelo piroxicam	27
3. Melatonina exógena e a lesão gástrica induzida pela fenilbutazona	28
4. Melatonina exógena e a lesão gástrica induzida pelo estresse	29
5. Melatonina endógena e a lesão gástrica induzida pelo piroxicam	29
6. Melatonina e a síntese de PGE ₂ pela mucosa gástrica	31
DISCUSSÃO	38
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ABSTRACT	

RESUMO

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) constituem um grupo de medicamentos de uso rotineiro na terapêutica clínica, principalmente no tratamento do processo inflamatório e doloroso. O efeito colateral mais comum constatado pelo seu uso é a irritação da mucosa gástrica. A atividade ulcerogênica dos AINES tem variabilidade diária, uma vez que quando administrados à noite, são melhor tolerados que durante o dia. Tal observação chama a atenção para a possível ação do hormônio pineal, melatonina, sintetizado no período de escuro, tanto por animais de hábitos noturnos como diurnos. No presente estudo foram investigados os efeitos da administração de melatonina sobre a atividade antiinflamatória e lesão gástrica induzida pelo piroxicam e o efeito da melatonina e do piroxicam sobre a síntese de PGE₂ pela mucosa gástrica, testando esse hormônio nos seguintes modelos: edema de pata de rato induzido pela carragenina, lesão da mucosa gástrica induzida pelo piroxicam e determinação da síntese de PGE₂ por enzima-imunoensaio (EIA). Administração intragástrica de melatonina não alterou o efeito antiinflamatório do piroxicam, mas inibiu o efeito colateral ulcerogênico. O efeito antiulcerogênico da melatonina foi observado após administração intragástrica, mas não após administração subcutânea. As diferenças observadas entre as duas vias de administração sugere um efeito local desse hormônio sobre a mucosa gástrica. O efeito antiulcerogênico da melatonina intragástrica esta relacionada à prevenção da inibição da produção de PGE₂ da mucosa gástrica pelo piroxicam. A pinealectomia aumentou o efeito ulcerogênico da administração noturna de piroxicam. Mesmo utilizando fenilbutazona, que é um AINE ulcerogenicamente mais potente, no período da manhã, quando o efeito ulcerogênico dos AINEs parece ser mais acentuado, a melatonina

administrada intragastricamente promoveu proteção da mucosa gástrica. Por outro lado, a melatonina administrada intragastricamente não interferiu com a ulceração induzida pelo estresse, sugerindo que o efeito antiulcerogênico da melatonina está relacionado mais especificamente com fatores importantes na patogênese da lesão gástrica induzida por AINEs. Estes dados sugerem que a melatonina pode atenuar a severidade da lesão gástrica induzida pelos AINEs (piroxicam e fenilbutazona) em ratos, prevenindo a inibição da síntese de PGE₂ da mucosa gástrica induzida pelo piroxicam, sem afetar a ação antiinflamatória.

INTRODUÇÃO

1. FARMACOLOGIA DOS ANTINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) constituem um grupo de medicamentos amplamente utilizados com ação principalmente antiinflamatória, analgésica e antipirética. Frequentemente, causam também efeitos colaterais, tais como lesão gástrica e renal (FRÖLICH, 1997).

O provável mecanismo de ação dos AINEs tanto para o efeito antiinflamatório como para o ulcerogênico, é a inibição da síntese de prostanóides, através da inibição da ciclooxigenase (VANE, 1971). A aparente inseparabilidade dos efeitos dos AINEs sobre a síntese de prostaglandinas no sítio de inflamação e na mucosa gástrica tem sido o maior obstáculo no uso terapêutico destes medicamentos.

Os AINEs do grupo dos salicilatos, cujo principal exemplo é a aspirina, induzem a inibição irreversível da ciclooxigenase (COX), ou seja, mesmo removendo a droga não ocorre a síntese de prostaglandinas, havendo a necessidade de produção de uma nova enzima através da síntese protéica. A grande maioria dos outros AINEs, como o piroxicam, inibem a COX por competição reversível. A duração da ação da aspirina é determinada pela taxa de síntese de novas enzimas ciclooxigenase, já o piroxicam tem a duração do seu efeito dependente da depuração farmacocinética (LANDS, 1981, RANG & DALE, 1989 e GODMAN & GILMAN, 1996).

O ácido araquidônico (AA), presente na grande maioria das membranas celulares de mamíferos (WILLIS & SMITH, 1994), é liberado quando as fosfolipases A₂, C e D são ativadas. A fosfolipase A₂, principal enzima liberadora, depende de cálcio para ser ativada. Uma vez liberado, o ácido araquidônico pode ser metabolizado por duas vias enzimáticas: pela via

da ciclooxigenase e pela via da lipoxigenase. A via da COX dá origem às prostaglandinas, tromboxanas e prostaciclina e a via da LPOX aos leucotrienos.

O AA é convertido pela ciclooxigenase a prostaglandina G₂ (PGG₂), a qual por sua vez, é metabolizada pela hidroperoxidase a prostaglandina H₂ (PGH₂) e esta sob a ação de outras sintases origina as prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂) e tromboxana (TXA₂). A ciclooxigenase se apresenta em pelo menos duas isoformas com peso molecular semelhante (~ 70 kDa): COX-1 e COX-2 (MITCHELL *et alii*, 1993).

A COX-1 é a ciclooxigenase constitutiva, fisiológica, encontrada principalmente nas plaquetas, onde é essencial para síntese de TXA₂. A ativação de COX-1 leva à produção de prostaciclina, que quando liberada pelo endotélio tem ação antitrombogênica e na mucosa gástrica constitui fator citoprotetor. A atividade da COX-1 também tem participação importante na síntese de prostaglandinas renais.

A COX-2 é a ciclooxigenase induzida, patológica liberada em processos inflamatórios, quando as células são expostas a agentes pró-inflamatórios, citocinas, mitógenos e endotoxinas (MITCHELL *et alii*, 1993).

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) na tentativa de inibir a COX-2 num processo inflamatório, suprimem também a COX-1, mostrando, inclusive em alguns casos maior seletividade para COX-1 que para COX-2. Os AINEs atualmente utilizados na terapêutica, tais como piroxicam, inibem ambas, sendo a inibição da COX-1 frequentemente a causa responsável pelos efeitos gástricos e renais indesejáveis na terapêutica com AINEs (VANE & BOTTING, 1995).

Na reação inflamatória, a prostaglandina E_2 induz vasodilatação em arteríolas, contribuindo para o edema inflamatório, quando associada a substâncias que aumentam a permeabilidade vascular (MONCADA *et alii*, 1973; WILLIAMNS & PECK, 1977; FLOWER, 1978). A prostaglandina E_2 aumenta a dor induzida por outros mediadores, tais como a histamina, diminuindo o limiar dos receptores álgicos (FERREIRA, 1972; HIGGS *et alii*, 1978 e FERREIRA *et alii*, 1978). É potente indutora de febre, principalmente em infecções viróticas, onde há a participação de IL-1 (SAXENA *et alii*, 1979).

Outro grupo de eicosanóides são os leucotrienos, que derivam da metabolização do AA pela enzima 5-lipoxigenase (5-LPOX). O AA é convertido em ácido hidroperoxieicosatetraenóico (HPETE) e a seguir para leucotrieno A_4 (LTA_4). O LTA_4 sofre a ação da hidrolase citosólica formando o leucotrieno B_4 (LTB_4). Por outro lado, LTA_4 pode ser conjugado à glutathiona reduzida e sob a ação da GSH-transferase presente nos microssomas formar o LTC_4 . O LTC_4 através de reação de remoção de glutamina, e da glicina pela gama glutamil-transferase e LTD-dipeptidase dá origem aos LTD_4 e LTE_4 , respectivamente (DENNIS & KRELL, 1994).

LTB_4 é um potente estimulador da secreção, agregação, aderência e migração neutrofílica. Aumenta a liberação de enzimas lisossomais, produção de ânions superóxidos, aderência de neutrófilos ao endotélio e aumenta a permeabilidade vascular quando associado à substâncias vasoativas (FORD-HUTCHINSON, 1990). Este leucotrieno é um indutor de injúria tecidual mediada por neutrófilos e lhe é atribuído papel na patogênese de doenças inflamatórias e lesões gastrintestinais. Os leucotrienos peptídicos (LTC_4 , LTD_4 e LTE_4) exercem potente efeito constritor em vasos e aumentam a permeabilidade vascular em vênulas pós-capilares e estimulam a secreção de muco (SAMUELSSON, 1983).

Os AINEs além de promoverem lesões do trato digestivo pela remoção da citoproteção da mucosa gástrica via prostaglandinas, podem também irritar diretamente a mucosa (WYNNE & RAWLINS, 1993). As formas tamponantes ou com revestimento entérico de AINEs reduzem a hemorragia do trato gastrintestinal (TGI), mas não evitam a inibição da PGE₂ e não suprimem níveis séricos de TXA₂ (HAWTHORNE *et alii*, 1991). TXA₂ é considerada um potente agente ulcerogênico, devido à sua atividade vasoconstrictora (WHITE *et alii*, 1981).

A supressão na síntese de PGE₂ e PGI₂ é considerada, em parte um fator determinante da injúria gastrointestinal induzida pelos AINEs. PGE₂ e PGI₂ exercem funções citoprotetoras sobre a mucosa gástrica, inibem a secreção ácida, estimulam a secreção de muco e bicarbonato e elevam o fluxo sanguíneo da mucosa. Inibem a aderência de leucócitos ao endotélio vascular e aceleram a reparação de úlceras (WALLACE & GRANGER, 1996).

A interação leucócito-endotélio via moléculas de adesão, parece também contribuir para o desenvolvimento de úlcera pelos AINEs. Ratos neutropênicos tratados com AINEs mostram uma diminuição da injúria gástrica. Prevenção de aderência neutrofilica ao endotélio com o uso de anticorpos específicos para moléculas de adesão resulta em proteção da mucosa contra os efeitos da indometacina (WALLACE *et alii*, 1990).

O piroxicam, 4-hidroxi-2-metil-N-(2-piridil)-2H-1,2-benzoatiazina-3-carboxamida-1,1-dióxido, é agente antiinflamatório não-esteroidal, de longa duração (t_{1/2} de 45 h em humanos e de 6 h em ratos), de grande uso terapêutico, sendo indicado no tratamento da dor do pós-parto, dor de dente, dismenorréia e doenças reumáticas como a artrite reumatóide e a osteoartrite

(WISEMAN, 1985, COMBES & HEIRINCH, 1990). Piroxicam tem sido associado com efeitos colaterais tais como, ulceração e hemorragia gastrintestinal (SAVAGE *et alii*, 1993). Estes efeitos colaterais parecem estar relacionados à idade, com aumentada incidência em idosos (BOUDINOT *et alii*, 1993). Piroxicam provoca lesões hemorrágicas que podem ser observadas 3 horas após sua administração (AVILA *et alii*, 1996).

O caráter ácido e lipofílico do piroxicam permite boa absorção pelo sistema gastrintestinal (RAINSFORD, 1985). Sua concentração plasmática máxima é atingida em média em 2 horas, podendo ocorrer um segundo pico plasmático cerca de 6 horas depois. Sua prescrição pode ser realizada em dose única diária, sendo esta uma das suas grandes vantagens. Liga-se a proteínas plasmáticas em cerca de 99% e se distribui bem pela área sinovial e inflamada, a citocromo P450 do fígado é a principal via de metabolização, sendo excretado pela urina.

O piroxicam inibe "*in vitro*" a formação de ânion superóxido, a liberação de enzima lisossômica induzida pelo agente quimiotático FMLP (f-met-leu-phe), e a migração dos PMNs e, em menor extensão, dos monócitos (BIEMOND *et alii*, 1990).

A fenilbutazona, 1,2-difenil-3,5-dioxo-4-*n*-butilpirazolidina, é agente antiinflamatório não-esteroidal, potencialmente tóxico de uso limitado. As formas mais graves de efeitos adversos incluem ulcerações gastrintestinais (ou a sua reativação com hemorragia e perfuração), leucopenia, agranulocitose e trombocitopenia (RAINSFORD, 1985).

Há décadas a indústria farmacêutica tem como prioridade a síntese de um antiinflamatório que resulte em maiores benefícios para o paciente, ou seja, com poucos efeitos adversos ou quase nenhum. Sabemos que o contingente de indivíduos idosos vem aumentando paulatinamente na população mundial e estes constituem os maiores usuários desse grupo de medicamento.

Os idosos representam o grupo de maior susceptibilidade a úlcera gástrica (CRYER *et alii*, 1992) A síntese de prostaglandina da mucosa gástrica está diminuída em animais velhos (LEE & FELDMAN, 1994), o que contribui para que estes sejam os prováveis portadores de injúria gástrica por AINEs. Considerando que as prostaglandinas endógenas da mucosa gastroduodenal são importantes na proteção e prevenção da úlcera gástrica e duodenal, então o uso de fármacos, tais como piroxicam e fenilbutazona dentre outros AINEs, que reduzem a síntese de prostaglandinas, pode ser de grande risco em idosos.

2. FISIOLOGIA DA MUCOSA GÁSTRICA E FISIOPATOLOGIA DA ÚLCERA GÁSTRICA POR AINEs

O estômago pode ser anatomicamente dividido em corpo, fundo, antro e piloro. Funcionalmente, a mucosa do estômago pode ser dividido em duas regiões glandulares: a antral e a oxíntica. A região antral (sítio de secreção não-ácida) sintetiza gastrina. A mucosa oxíntica é o sítio de secreção ácida, o principal tipo celular é a célula oxíntica ou parietal que secreta ácido clorídrico. Além das células parietais na mucosa oxíntica são encontradas também células principais que sintetizam e secretam pepsinogênio (KENT LLOYD & DEBAS, 1994).

A integridade da mucosa gástrica é mantida pelo equilíbrio entre forças destrutivas e fatores protetores. Enquanto o lúmen gástrico contém um fluido altamente ácido com enzimas digestivas ativas que podem rapidamente destruir tecidos, a mucosa gástrica apresenta uma barreira para a difusão de ácido.

Uma série de fatores defensivos têm sido estudados e associados à fisiologia do trato gastrointestinal, incluindo o muco e a secreção de bicarbonato, fluxo sanguíneo local e reparação tecidual.

Prostanóides, principalmente PGI_2 e PGE_2 , NO endógeno e neuropeptídeos sensoriais, todos parecem exercer uma função modulatória na regulação da integridade da mucosa gástrica.

2.1. SECREÇÃO ÁCIDA

A secreção ácida pelas células parietais é estimulada pela gastrina, acetilcolina, via receptores muscarínicos M_3 e histamina, via receptores H_2 . O receptor H_2 aumenta o AMPc intracelular. AMPc e Ca^{2+} agem via proteína quinase, aumentando a secreção de H^+ , através da ativação da enzima H^+,K^+ -ATPase. Esta enzima catalisa a troca de H^+ intracelular por K^+ extracelular. A PGE_2 age diminuindo a atividade da adenilato ciclase e do AMPc intracelular. A célula parietal possui subunidades regulatórias G_s e G_i , mas parece existir outros tipos de subunidades (CHEW, 1989).

A síntese de prostaglandinas (PGs) pode ser demonstrada em toda parte do trato gastrointestinal. *In vivo*, prostaglandinas inibem a função secretória ácida em resposta a histamina, pentagastrina e estimulação de alimento.

A ativação do receptor EP_3 para prostaglandina na célula parietal gástrica, suprime a atividade da adenilato ciclase inibindo a secreção ácida estimulada pela histamina (WATSON & ABBOTT, 1991).

2.2. SECREÇÃO DE MUCO E BICARBONATO

O trato gastrintestinal, como todas as superfícies epiteliais internas de mamíferos, é coberto por uma camada de um géll polimérico viscoelástico lubrificante que é o muco. O muco, secretado pelas células epiteliais superficiais, é constituído de glicoproteínas denominadas mucinas. As mucinas desempenham diversas funções, como: lubrificante da superfície epitelial; constituintes de barreiras para a difusão de nutrientes, drogas, íons, toxinas e macromoléculas; ligantes de bactérias, vírus, parasitas; detoxificante quando se liga a metais pesados; protetora da mucosa contra proteases e interagindo com o sistema imune.

A mucina constitui uma camada que recobre a mucosa. As células da superfície da mucosa também sintetizam bicarbonato. O bicarbonato é utilizado na constituição do muco, para estabelecer um pH adequado para os diversos compartimentos do sistema digestivo. A estimulação da secreção ácida também acentua a secreção de muco e de bicarbonato, que servem para proteger a mucosa gástrica. Esta função citoprotetora é, em grande parte, mediada pela síntese de prostaglandinas, como a PGE₂. Essa resposta é inibida por bloqueadores da ciclooxigenase como os AINEs. A administração intragástrica de PGE₂ em humanos estimula a liberação de muco. O muco gástrico, protetor da mucosa, forma uma barreira ao criar uma camada para o bicarbonato secretado neutralizar íons hidrogênio. A estimulação de muco e bicarbonato por prostanóides é importante no processo de reparação epitelial.

A alcalinização luminal do estômago necessária para receber a camada de muco é modulada pela PGE₂, em diversas espécies de animais e no homem (REES *et alii*, 1983; JOHANSSON *et alii*, 1983, KAUFFMAN *et alii*, 1980; WHITLLE *et alii*, 1984, FELDMAN *et alii*, 1982, 1983 e 1985).

Estudos com ratos em jejum demonstraram a existência de ritmos circadianos na secreção gástrica de H⁺, HCO₃⁻ e muco. As secreções de H⁺ e HCO₃⁻ possuem picos em diferentes horários do dia, sendo que no final do período de atividade (4:45 a.m.), tem-se o pico da secreção ácida e no meio do período de repouso (11:41 a.m.), o pico da secreção de bicarbonato (LARSEN *et alii*, 1991).

2.3. FLUXO SANGUÍNEO

A superfície epitelial do estômago é uma densa área de capilares. A microcirculação tem função de fornecer nutrientes e oxigênio para o epitélio, remover, diluir e neutralizar substâncias tóxicas que se difundem entre a mucosa e o lúmen. Quando o epitélio é danificado, a microcirculação tem papel importante no processo de reparação (WALLACE *et alii*, 1996). PGE₂, PGI₂ e seus análogos sintéticos são potentes vasodilatadores da circulação gástrica, aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, podendo ser benéficos para a manutenção da integridade funcional do tecido gástrico (WHITLLE, 1980 e WHITLLE & VANE, 1987).

A PGI₂, vasodilatador local formado pelas células endoteliais, tem sua síntese suprimida por inibidores da ciclooxigenase como os AINEs. Assim a inibição da formação de prostaglandinas endógenas e a redução do fluxo sanguíneo da mucosa tem relação direta com a ulcerogenicidade dos AINEs.

A formação de NO fisiológico tem função modulatória sobre o fluxo sanguíneo e integridade tecidual. Entretanto, uma liberação inadequada de NO e uso de altas doses de doadores espontâneos de NO podem levar a extensa lesão tecidual. Isto pode resultar na toxicidade direta de radicais NO ou metabólitos como o radical peroxinitrito, que gera os radicais reativos hidroxil (BECKMAN *et alii*, 1990; LIPTON, 1993). A redução na formação de NO pode comprometer a integridade gástrica e a excessiva formação de NO pode também participar da patologia da lesão da mucosa gastrintestinal (LOPEZ-BELMONTE *et alii*, 1993; WHITTLE *et alii*, 1990).

O pré-tratamento com inibidores da síntese de NO reduz a elevação do fluxo sanguíneo em 65%, não alterando a proporção de secreção ácida induzida pela pentagastrina e atenuando os efeitos hiperêmicos.

O NO está envolvido no aumento do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica. NO e neuropeptídeos sensoriais parecem estar envolvidos no processo de vasodilatação que acompanha a ativação de nervos sensoriais por intermédio da difusão ácida na mucosa. Enfim, a interação entre NO endógeno, neuropeptídeos sensoriais e prostanóides parece modular a integridade da mucosa gástrica (WHITTLE, 1994)

Neurônios sensíveis a capsaicina, modulam o fluxo sanguíneo pela liberação de peptídeos vasodilatadores, como o CGRP, o VIP e a substância P. A estimulação desses neurônios ocasiona a proteção da mucosa contra danos induzidos pelo etanol ou aspirina, provavelmente pelo aumento do fluxo sanguíneo na mucosa (TEPPERMAN & JACOBSON, 1994).

Serotonina liberada pelos nervos entéricos promove constrição de inúmeros leitos vasculares, incluindo a microcirculação gástrica. No modelo de estresse, níveis gástricos elevados de serotonina parecem estar associados a ulceração da mucosa gástrica (KITAJIMA *et alii*, 1988, 1991), pela diminuição do fluxo sanguíneo gástrico (WONG *et alii*, 1990)

Outro mediador da mucosa gástrica é a TXA₂, que é metabólito do ácido araquidônico. TXA₂ é potente ulcerogênico, cujos efeitos lesivos são decorrentes da vasoconstrição da microvasculatura da mucosa gástrica. Seus efeitos são reduzidos com o uso de inibidores, essa ação protetora pode ser devido a elevação da síntese de prostaglandina gástrica (WALLACE, 1993).

Endotelinas, peptídeos com 21 aminoácidos derivados das células endoteliais, são potentes agentes vasoconstritores que mimetizam a tromboxana. Os níveis de endotelina aumentam com a diminuição do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica de ratos submetidos ao estresse experimental por imersão em água (TEPPERMAN & JACOBSON, 1994).

O fluxo sanguíneo adequado é essencial para a manutenção da integridade da mucosa gástrica (TEPPERMAN & JACOBSON, 1994).

2.4. REPARAÇÃO TECIDUAL

Depois do epitélio ter sido comprometido por agentes injuriosos, sua integridade e funcionalidade são rapidamente restaurados. A rápida regeneração da camada de células epiteliais ocorre em cerca de 5 horas, isso porque muito pouco tempo é requerido para a divisão celular. A reepitelização ocorre por migração de células viáveis para áreas adjacentes ou para as lesões que necessitam ser recobertas. Durante o processo de reparo essas áreas são protegidas por uma camada muco-fibrínica. Um ambiente alcalino é importante para a reepitelização, ácidos podem degradar a lâmina basal e nesse caso não permitir a reparação (HIRST, 1989).

Quando todos os níveis de defesa da mucosa são vencidos, ulcerações no estômago podem ocorrer. O nível final de defesa nestas circunstâncias é o processo de reparo. Uma inflamação aguda é uma resposta crítica para a remoção de tecido necrótico. O tecido de granulação serve como um arcabouço para novamente as células dividirem, migrarem e iniciarem a reforma da arquitetura da mucosa. O processo de angiogênese resulta no desenvolvimento de novos vasos como no tecido de granulação. A revascularização das áreas danificadas é um pré-requisito para o restabelecimento das glândulas gástrica. Este processo de reparação tecidual começa nas margens da úlcera e gradualmente é direcionado para todos os lados e para o centro do tecido ulcerado. A restituição epitelial requer um tempo muito curto para estimular a divisão e proliferação celular e isto ocorre horas após a ocorrência da injúria. A camada de muco cobrindo o epitélio possui células que estão em vários estágios de degeneração (KVIETYS *et alii*, 1991 e GÖKE *et alii*, 1996).

A inibição da proliferação celular observada na mucosa oxíntica de ratos tratados com indometacina indica que as prostaglandinas endógenas tem papel importante na manutenção da atividade proliferativa do epitélio (URIBE, 1993).

3. CRONOFARMACOLOGIA DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ULCEROGÊNICA DOS AINES

Vários relatos indicam que, tanto o efeito antiinflamatório como a susceptibilidade à lesão gástrica induzida por AINES mostram uma variação circadiana (LABRECQUE, 1994, MOORE, 1994)

Ritmo circadiano da ação antiinflamatória dos AINES tem sido descrito em modelos experimentais de inflamação e em estudos clínicos. Entretanto, os dados encontrados na literatura são bastante contraditórios. Alguns estudos mostram que a efetividade máxima da ação antiinflamatória de indometacina, fenilbutazona ou flubiprofeno é obtida quando administrados durante período de repouso do animal (LABRECQUE, 1994). Por outro lado, LOUBARIS *et alii*, (1984) relatam que o efeito antiinflamatório máximo da fenilbutazona é obtido quando administrado durante o período de atividade dos ratos (20:00 h), enquanto o efeito mínimo é observado no período de repouso dos animais (8:00 h). E ainda, estudos de cronofarmacologia de AINES em pacientes com osteoartrite mostram que a efetividade de AINES depende do ritmo biológico da doença inflamatória (LEVI *et alii*, 1985). Os dados sobre a analgesia induzida por indometacina indicam que a efetividade aumenta significativamente quando a administração da indometacina é feita horas antes do aparecimento do pico do processo doloroso. A administração de indometacina à noite é mais efetiva em pacientes com dor predominantemente no período noturno ou no início da manhã, enquanto que a administração de manhã é mais efetiva em pacientes, cujo pico do processo doloroso ocorre à tarde. Assim, a função do ritmo circadiano na atividade antiinflamatória dos AINES permanece incerta e não esclarecida.

O ritmo circadiano na atividade ulcerogênica dos AINEs é um fenômeno mais regular e reproduzível, como tem sido mostrado em vários estudos. Em humanos, a administração de AINEs à noite é melhor tolerado do que a administração de manhã (LEVI *et alii*, 1984, MOORE & GOO, 1987, PFEIFFER *et alii*, 1990). Em ratos, a aspirina acidificada causa significativamente menos lesão da mucosa gástrica quando administrada no início da fase de escuro do que no início da fase de claro (OLSON, 1987, OLSON *et alii*, 1986). Assim, a ulceração gástrica induzida por AINEs em humanos e em ratos é menor à noite (fase de escuro) do que de manhã (fase de claro), apesar do ciclo atividade-reposo ser inverso. Estes fatos sugerem que a susceptibilidade circadiana da mucosa gástrica a AINEs não está diretamente relacionada ao ciclo de atividade ou de secreção ácida, mas não descarta a possibilidade da influência do ciclo claro-escuro.

4. MELATONINA

A melatonina, principal hormônio da glândula pineal, é secretada à noite (período de escuro) tanto em animais de hábitos noturnos como diurnos. No sangue, o ritmo da melatonina é de aproximadamente 24 horas, um ciclo de melatonina similar é encontrado em outros fluídos orgânicos de vertebrados, inclusive no homem. Em mamíferos, a conexão neural entre os olhos e a glândula pineal está agora bem definida e podem ser resumidas da seguinte maneira: o sistema nervoso central recebe sinal visual via RHT (trato retinohipotalâmico) ou via GHT (trato geniculohipotalâmico), transmitindo então o sinal integrado para a glândula pineal, via corda torácica superior e gânglio cervical superior do sistema nervoso simpático.

A formação da melatonina noturna é primariamente resultante da liberação da norepinefrina (NE) das terminações neuronais pós-ganglionares simpáticas na glândula pineal. Uma vez liberada, NE interage com receptores β -adrenérgicos, via proteína G estimulatória para adenilil ciclase, na membrana dos pinealócitos. A ativação da adenilato ciclase aumenta a

produção de AMPc intracelular, que leva à indução da N-acetiltransferase (NAT), a enzima limitante da síntese de melatonina. Assim, esta indolamina é sintetizada pela acetilação da serotonina, mediada pela NAT e por uma metilação da N-acetil-5-hidroxitriptamina pela Hidroxi-Indol-O-Metiltransferase (HIOMT) (PRESLOCK, 1984, EBALDI, 1984). O ritmo de síntese da melatonina é progressivamente atenuado durante o envelhecimento, presumivelmente devido a redução no número de receptores β -adrenérgicos nas membranas dos pinealócitos (REITER, 1991).

Uma vez sintetizada na glândula pineal, a melatonina é imediatamente liberada na corrente sanguínea. Receptores da melatonina têm sido classificados em dois subtipos, ML-1 e ML-2, de acordo com sua cinética e propriedades farmacológicas. Parece existir uma ritmicidade circadiana na densidade de receptores da melatonina. Na fase tardia do período claro foi encontrada uma alta densidade de sítio de ligação da [125 I]iodomelatonina no hipotálamo de rato (SAARELA & REITER, 1994). Classicamente considera-se que os receptores de melatonina estão associados a membrana, entretanto, a localização imunohistoquímica de melatonina indica sua ligação no núcleo das células do parênquima da pineal e células da retina de rato (MENNENGA *et alii.*, 1991). Achados mais recentes mostram acúmulo nuclear de melatonina no núcleo de células de muitos órgãos (MENENDEZ-PELAEZ & REITER, 1993). Os autores sugerem que a melatonina pode proteger o DNA nuclear dos efeitos lesivos de radicais livres (REITER, 1993) ou pode inibir a expressão da 5-lipoxigenase em linfócitos B (CALBERG & WIESENBERG, 1995, STEINHILBER, 1995).

Por causa da sua natureza lipofílica, a melatonina do sangue distribui-se facilmente para os fluídos orgânicos e células do organismo, onde pode atuar como sequestrador de radicais livres, cuja ação não requer receptor. Assim, todas as células expostas à melatonina podem responder às alterações nos seus níveis circulantes.

A melatonina está envolvida em muitos processos fisiológicos (REITER, 1991). Tem efeito sobre a regulação da temperatura, modulação da secreção de insulina e de hormônios gastrintestinais e recentemente parece estimular o sistema imune e ter ação na oncostase (ARENDDT, 1995).

Melatonina e seus sítios de ligação foram demonstrados no TGI (HUETHER, 1994, LEE & PANG, 1993). O uso de [¹²⁵I]iodomelatonina como radioligante possibilitou a identificação e caracterização em preparações de jejuno de rato, de sítios de ligação estável, saturável, reversível e de alta afinidade para melatonina (VAKKURI *et alii*, 1984).

Tem sido relatado que a melatonina provoca efeitos antagônicos sobre as contrações induzidas pela serotonina em duodeno isolado de rato (QUASTEL & RAHAMIMOFF, 1965). As propriedades relaxantes da melatonina sobre os tecidos intestinais são mais potentes nos segmentos isolados do duodeno e cólon de rato, enquanto que efeitos mínimos são detectados nas preparações de íleo e jejuno (HERLOW & WEEKLEY, 1986). Além disso, os efeitos diferenciais da melatonina sobre os músculos intestinais estão diretamente relacionados com os níveis de melatonina ao longo do trato digestivo. Tem sido sugerida a possibilidade de interações antagônicas competitivas entre melatonina e serotonina (FIORETTI *et alii*, 1974; HOLLOWAY *et alii*, 1980; HARLOW & WEEKLY, 1986; BUBENIK, 1986, BUBENIK & DHANVATARI, 1989).

Melatonina também é capaz de reduzir a severidade da colite induzida por dextrana sulfato em camundongos (PENTNEY & BUBENIK, 1995), de aliviar as lesões gástricas induzidas por etanol em ratos e reverter parcialmente reduções no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica glandular induzida pela serotonina (CHO *et alii*, 1989).

Os sítios de ligação da melatonina no intestino exibem variações diurnas com Bmax à noite significativamente menor do que durante o dia. Uma possível explicação para tal variação circadiana pode ser atribuída à modulação do sítio de ligação pela melatonina. Assim, o elevado nível de melatonina à noite pode exercer uma ação regulatória sobre estes sítios de ligação e subseqüentemente diminuir sua afinidade de ligação (HOLLOWAY *et alii*, 1980). Considerando a captação de melatonina sistêmica pelos tecidos gastrintestinais (BUBENIK, 1980), o nível elevado de melatonina à noite no soro pode exercer ação regulatória sobre os sítios de ligação intestinal e conseqüentemente modificar suas características.

Foi levantada a hipótese da existência de síntese de melatonina por uma via extra-pineal independente de luz. Nesse caso, o intestino constituiria um desses tecidos aptos à síntese hormonal. A grande quantidade de triptofano precursor da melatonina, aminoácido essencial armazenado no trato gastrintestinal e a provável existência da maquinaria enzimática necessária à síntese reforçaram essa teoria (BRAMMER, 1994).

Os idosos apresentam uma queda na síntese de melatonina (ARENDETT, 1995) e constituem o grupo mais susceptível a ulceração gástrica (CRYER *et alii*, 1992). Os relatos da literatura sugerem que a concentração de prostaglandina gástrica e duodenal declina com idade em humanos e que esta diminuição na prostaglandina da mucosa está associada com um aumento na secreção ácida gástrica (CRYER *et alii*, 1992). Assim, os pacientes idosos apresentam comprometimento da capacidade de proteção da mucosa, representando um grupo de alto risco para o desenvolvimento de úlcera induzida por AINEs. Entretanto, não existe nenhuma informação a respeito da possível participação da melatonina na ulceração gástrica induzida por AINEs, desse modo, surgiu o interesse em estudar a influência da melatonina sobre a lesão gástrica induzida por AINEs (piroxicam e fenilbutazona), bem como do estresse.

OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi determinar a influência da melatonina sobre a lesão gástrica induzida por AINEs e o possível mecanismo de ação. Para isso estudamos :

1) o efeito da pré-administração de melatonina sobre o efeito antiinflamatório e ulcerogênico do piroxicam nos seguintes modelos: edema de pata de rato induzido por carragenina e lesão da mucosa gástrica induzida por piroxicam intragástrico;

2) o efeito da administração exógena de melatonina sobre lesão da mucosa gástrica induzida por fenilbutazona;

3) o efeito da administração exógena de melatonina sobre lesão gástrica induzida por estresse;

4) o efeito ulcerogênico do piroxicam quando administrado, no período noturno, à ratos pinealectomizados e falso-operados;

5) a capacidade de síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) pela mucosa gástrica após o tratamento com MEL + piroxicam.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar, machos com peso de 220 - 280 gramas, provenientes do Instituto de Ciências Biomédicas, USP, mantidos em ciclo claro-escuro controlado 12/12 horas.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em número de 6 animais por gaiola, receberam ração e água *ad libitum*, até atingir peso e idade ideais para uso experimental. A luz era acendida às 06: hs e apagada às 18:00 hs.

2. TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

2.1. MELATONINA

A melatonina (Sigma) foi dissolvida em etanol e diluída em óleo de oliva de forma a atingir concentração final de 2% de álcool. Foram utilizadas as doses de 10^{-10} , 10^{-8} ; 10^{-5} ; 10^{-3} ; 10^{-1} ; 1,0, 3,0; 7,5 mg/kg que foram administradas, às 16:00 hs, por via intragástrica. Este método de preparação foi utilizado em todos os experimentos em que a melatonina foi administrada intragástricamente.

A melatonina administrada subcutâneamente foi dissolvida em etanol e diluída em salina, até atingir concentração final de 5% de álcool. Foram utilizadas doses de 1,0, 3,0 e 7,5 mg/kg.

Em todos os ensaios, os animais controles receberam os veículos utilizados nas diluições dos fármacos. O volume administrado de melatonina intragástrica e seus veículos foi de 0,5 mL para cada 100 g de peso corpóreo. Na via subcutânea, foi injetado volume de 0,2 mL / 100 g de peso corpóreo.

2.2. PIROXICAM E FENILBUTAZONA

No estudo de ulcerogenicidade, a dose utilizada de piroxicam dissolvido em carboximetilcelulose (CMC) 0,5%, foi de 10 mg/kg e no estudo da atividade antiinflamatória, dose de 5 mg/kg. Em ambos os ensaios a administração foi intragástrica.

Empregou-se fenilbutazona na dose de 120 mg/kg, num volume de 0,06 mL/100 g de rato, administrada por via intraperitoneal.

3. MODELO DE ESTUDO DA INFLAMAÇÃO AGUDA : EDEMA DE PATA DE RATO INDUZIDO PELA CARRAGENINA

A melatonina, na dose de 3,0 mg/kg, foi administrada às 16:00 h, por via intragástrica.

O piroxicam, na dose de 5 mg/kg, foi administrado às 16:30 h, por via intragástrica.

A carragenina foi dissolvida em salina estéril (4mg/ml) e 0,1 ml dessa suspensão foi injetado na região subplantar de uma das patas posteriores de animais. Obedecendo-se aos cuidados de assepsia. A pata contralateral recebeu igual volume de salina. A administração foi realizada às 17:00 h.

O volume das patas até a articulação tíbio-társica foi medido em vários intervalos de tempo após a injeção podal de carragenina, com auxílio de pletismógrafo acoplado a transdutor e polígrafo Grass modelo 79, de acordo com o método de VAN ARMAN *et alli* (1965).

As medidas pletismográficas foram realizadas antes e 30 min, 1 hora, 2, 3, 4, 5 e 24 horas após injeção de carragenina.

O edema foi expresso em termos de porcentagem de aumento do volume da pata (VF), em relação ao volume inicial (VI).

$$\frac{VF - VI}{VI} \times 100 = \% \text{ de aumento do volume da pata (edema)}$$

VI

Os resultados foram expressos na forma de porcentagem de aumento do volume da pata após injeção da carragenina pela subtração do valor controle da pata contralateral que recebeu salina.

4. MODELOS DE ESTUDO DA LESÃO GÁSTRICA

4.1. ULCERAÇÃO GÁSTRICA PELO PIROXICAM

Os animais foram colocados em jejum em caixas de contenção (Bollman, 1948), 24 horas antes do tratamento e permaneceram nesta situação até o final do experimento. Os animais foram mantidos com água *ad libitum*.

A melatonina ou o veículo foram administrados intragastricamente ou subcutaneamente às 16:00 hs. Uma hora depois (17:00 hs) a lesão gástrica foi induzida pela administração intragástrica de piroxicam (10 mg/kg). Os animais controles receberam o veículo (CMC 0,5%).

Na manhã seguinte (08:00 h), os animais foram sacrificados com éter etílico, a cavidade abdominal aberta e o estômago retirado. O estômago foi então aberto ao longo da grande curvatura, a seguir lavado com solução fisiológica e afixado em disco de cortiça. As lesões foram examinadas em microscópio esteroscópico Nikon (modelo SMZ-10).

As lesões gástricas induzidas por piroxicam foram classificadas quanto à severidade, segundo BASILE *et alii* (1990):

- 1 — hiperemia e/ou hemorragia puntiforme,
- 2 — lesões hemorrágicas com erosões moderadas,
- 3 — botões hemorrágicos com lesão severa

O índice de lesão foi calculado somando-se o número total de lesões multiplicados pelos respectivos índices de severidade (LAMBRECHT *et alii*, 1993).

A mucosa do estômago, no rato, apresenta-se dividida em duas zonas, separadas nitidamente por um prega limitante, que é a zona córnea ou cutânea (não-glandular) e a mucosa oxíntica (fúndica, glandular) (JUNQUEIRA & MARTINS, 1947, HEBEL & STROMBERG, 1986). A zona córnea é de cor acinzentada, translúcida. A mucosa oxíntica, onde são encontradas as lesões gástricas, tem uma cor amarelo-parda e apresenta pregas longitudinais.

4.2. ULCERAÇÃO GÁSTRICA PELA FENILBUTAZONA

Esse experimento foi realizado tendo em vista algumas indagações :

I) Como a mucosa gástrica pré-tratada com melatonina se comportaria diante de um AINE potencialmente ulcerogênico administrado pela parenteral, portanto sem ser absorvido no TGI ? Sendo assim, utilizou-se a via intraperitoneal para administrar fenilbutazona.

II) Se a administração do AINE fosse realizado em outro horário diferente daquele utilizado para o piroxicam, será que a melatonina protegeria a mucosa gástrica ?

Os animais foram colocados em gaiolas metálicas às 10:00 hs e mantidos em jejum por 24 horas. No dia seguinte, às 10:00 h, os animais receberam melatonina (3,0 mg/kg) por via intragástrica e uma hora mais tarde, às 11:00 h, fenilbutazona (120 mg/kg) por via intraperitoneal. O sacrifício foi realizado às 16:00 h e conduziu-se a rotina descrita anteriormente para a obtenção dos índices de lesão gástrica.

4.3. ULCERAÇÃO GÁSTRICA PELO ESTRESSE

Os animais foram colocados em gaiolas metálicas às 08:00 h e mantidos em jejum por 32 horas.

No dia seguinte, às 16:00 h os animais receberam melatonina (3,0 mg/kg, v.o.) ou o veículo, e às 17:00 h foram colocados em banho de água a temperatura de 22^oC. No dia seguinte, por volta das 10:00 h, foram sacrificados e seguindo os procedimentos já citados anteriormente obteve-se os índices de lesão gástrica.

5. PINEALECTOMIA

A pinealectomia dos ratos foi realizada seguindo a metodologia de HOFFMAN & REITER, 1965. Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (70 mg/kg, i.p.), tricotomizados na porção posterior da cabeça, na região do lobo occipital. Essa região foi posteriormente incisionada e divulsionada até que se expusesse a calota crâniana para possibilitar a visualização do encontro das suturas lambdoidea e sagittalis que é denominado Y (ípsilon). Com o auxílio de broca cilíndrica odontológica acoplada a micromotor realizou-se a osteotomia de forma a se obter um disco ósseo de pequeno diâmetro, em que o Y estava centrado. Este disco foi removido com uma pinça e mantido em gaze embebida com solução salina. Expondo-se, então os seios venosos sagital e transversos, com uma pinça curva introduzida com suas hastas abertas dentro da dura-máter, chegou-se a confluência dos seios venosos e com fino movimento no sentido para frente pinçou-se e removeu-se a glândula pineal, identificada visualmente como uma estrutura uniforme redonda e clara. A seguir, recolocou-se o disco ósseo a sua posição na calota crâniana e efetuou-se a sutura do tecido mole.

Outros animais foram submetidos a mesma manipulação de forma a constituir o grupo controle (falso-operado). Em seguida, os animais operados permaneceram no biotério.

Decorridos 10 dias após a remoção da glândula pineal, os animais pinealectomizados e falso operados foram colocados em contenção e jejum, por 24 horas. No dia seguinte às 23:00 h, receberam piroxicam (10 mg/kg) e foram mantidos na situação anterior por mais 15 horas até o sacrifício. Seus estômagos foram removidos para determinação dos índices de lesão gástrica, seguindo metodologia descrita anteriormente.

6. QUANTIFICAÇÃO DE PGE₂

Foi utilizado Kit de enzima-imunoensaio (EIA) da Amersham (Canada) para dosagem de PGE₂.

Os ratos foram colocados em jejum, em caixas de contenção (BOLLMAN, 1948) e com água *ad libitum*, por 24 horas, a começar às 16 h. No dia seguinte às 16 h os animais foram tratados com melatonina (10⁻³ mg/kg, i.g.) e às 17 h receberam piroxicam (10 mg/Kg) e aos 30 minutos, 1 e 3 h após administração do piroxicam foram sacrificados.

Os horários de sacrificio foram estabelecidos segundo (LEE & FELDMAN, 1994; OLSON, 1982; CURTIS *et alii*, 1993).

Os animais foram sacrificados com éter etílico. A cavidade abdominal foi aberta e o estômago removido. O estômago foi aberto ao longo da grande curvatura e a seguir lavado com tampão fosfato (0,1M) gelado e então afixado em disco de cortiça.

Com uma espátula de lâmina fina retirou-se delicadamente amostras da mucosa do estômago que foram colocadas em eppendorfs previamente pesados com conteúdo de 1,0 mL de tampão fosfato (0,1M). O tampão e os eppendorfs foram mantidos no gelo.

A seguir, os eppendorfs contendo as amostras foram novamente pesados de modo a se obter o peso da amostra de tecido coletado.

O conteúdo do eppendorf foi homogenizado por 30 segundos. Em seguida, agitados a 37⁰C em agitador de eppendorf por 20 minutos. Posteriormente, foram centrifugados por 3 minutos a 16.000 g e o sobrenadante foi armazenado a -70⁰C.

As diluições utilizadas nesse ensaio foram 1:10, 1:25 e 1:50.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média \pm EPM. Para comparar mais do que dois grupos de dados paramétricos, a análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste de Tukey.

Para dados não-paramétricos, a análise estatística foi realizada através da análise de variância de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste de Mann-Whitney. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

8. DROGAS E REAGENTES

Melatonina- Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), Sigma USA; Piroxicam (Pfizer); Fenilbutazona (GEIGY); carragenina, sal sódico, PM 60.000- 100.000 (MARINE COLLOIDS); cloreto de cálcio (MERCK); cloreto de potássio (MERCK); cloreto de sódio (MERCK); éter etílico (ANALÍTICA); fosfato monobásico de sódio hidratado (MERCK), fosfato dibásico de sódio hidratado (MERCK), pentobarbital sódico (HYPNOL[®], CRISTÁLIA).

RESULTADOS

1. MELATONINA EXÓGENA E O EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DO PIROXICAM

Para determinar se a melatonina interfere com as propriedades antiinflamatórias do piroxicam, foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos. A carragenina induziu um aumento no volume da pata de aproximadamente 70% duas horas após sua administração na pata, retornando aos níveis normais em aproximadamente 24 horas. A **figura 1** mostra os efeitos antiinflamatórios do piroxicam (5 mg/kg, i.g.) quando administrado sozinho ou na presença de melatonina (3 mg/kg, i.g.). Administração intragástrica de piroxicam sozinho, 30 min. antes da injeção subplantar de carragenina, causou uma significativa inibição do edema. Administração intragástrica de melatonina, 30 min. antes da administração de piroxicam, não afetou as propriedades antiinflamatórias do piroxicam.

2. MELATONINA EXÓGENA E A LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA PELO PIROXICAM

A **figura 2** mostra os efeitos ulcerogênico do piroxicam (10mg/kg, i.g.) quando administrado sozinho e na presença de várias doses de melatonina (1,0; 3,0 ou 7,5 mg/kg) administradas intragastricamente (**Figura 2A**) ou subcutaneamente (**Figura 2B**). A administração de piroxicam causou extensa lesão na mucosa gástrica. Na presença de melatonina intragástrica (i.g.) a extensão da lesão gástrica estava significativamente diminuída (**Fig. 2A**). A melatonina (i.g.) reduziu índice de lesão gástrica para níveis de 50 a 70% dos valores controles. Por outro lado, administração subcutânea (s.c.) das mesmas doses de melatonina (1,0; 3,0 ou 7,5 mg/kg) não causou alterações significativas na lesão

gástrica induzida por piroxicam (**Fig. 2B**), portanto não produziu proteção da mucosa do estômago. Assim, as propriedades antiulcerogênicas observadas nos grupos que receberam doses intragástricas de melatonina podem ser atribuídas a um efeito local.

Os experimentos descritos acima foram realizados com doses muito maiores do que a concentração máxima de melatonina detectada à noite. Assim, uma ampla faixa de doses de melatonina (10^{-10} - 10^{-1} mg/kg) foi testada a fim de melhor caracterizar o efeito protetor da melatonina administrada intragastricamente (**Figura 3**). Uma redução significativa na lesão gástrica induzida por piroxicam foi observada no intervalo de dose de 10^{-8} até 10^{-1} mg/kg, enquanto melatonina 10^{-10} mg/kg não teve efeito.

3. MELATONINA EXÓGENA E A LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA PELA FENILBUTAZONA

A **figura 4** mostra os efeitos ulcerogênicos da fenilbutazona (120 mg/kg, i.p.) quando administrada sozinha e na presença de melatonina (3,0 mg/kg, i.g.). A administração intraperitoneal de fenilbutazona causou extensa lesão na mucosa gástrica, determinando índice de lesão pelo menos duas vezes maior que o obtido com o piroxicam. Na presença de melatonina (i.g.) a extensão da lesão gástrica estava significativamente diminuída. Melatonina (i.g.) reduz índice de lesão gástrica para níveis de 50% dos valores controles.

Estes resultados mostram que a melatonina é também capaz de proteger a mucosa gástrica de lesões induzidas por outros AINEs potencialmente ulcerogênicos, como fenilbutazona, administrada no período da manhã, onde segundo a literatura é o período de maior susceptibilidade a ulcera gástrica por AINEs.

4. MELATONINA EXÓGENA E A LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA PELO ESTRESSE

A administração intragástrica de melatonina (3,0 mg/kg, i.g.) não previne a ulceração gástrica induzida por estresse (**Figura 5**). A média do índice de lesão em animais tratados com melatonina e veículo foi de 569 ± 102 e $436 \pm 101,5$, respectivamente.

5. MELATONINA ENDÓGENA E A LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA PELO PIROXICAM

O efeito da melatonina endógena sobre a lesão da mucosa gástrica induzida por piroxicam foi avaliado pela análise do índice de lesão quando piroxicam (10 mg/kg, i.g.) foi administrado aos ratos controles (falso operados) ou pinealectomizados às 23:00 h, período de pico de melatonina no plasma. O índice de lesão foi significativamente menor quando piroxicam foi administrada ao animal controle (falso-operado) ($81,0 \pm 10,0$) se comparado com animais pinealectomizados ($133,0 \pm 14,5$) (**Figura 6**), sugerindo que o efeito ulcerogênico do piroxicam pode ser reduzido pela melatonina endógena.

6. MELATONINA E A SÍNTESE DE PGE₂ PELA MUCOSA GÁSTRICA

Piroxicam (10 mg/kg, i.g.) reduziu significativamente a síntese de PGE₂ da mucosa gástrica, de $55,4 \pm 8,1$ ng/g de tecido no grupo controle para $30,3 \pm 7,3$ ng/g de tecido e $34,8 \pm 3,4$ ng/g de tecido no grupo tratado com piroxicam 30 minutos e 1 hora, respectivamente. Esta redução foi transitória, a síntese de PGE₂ 3 horas após tratamento com piroxicam ($88,2 \pm 22,5$ ng/g de tecido) não foi significativamente diferente do controle, ou seja, as concentrações de PGE₂ estavam restabelecidas (**Figura 7A**).

Com o objetivo de verificar se o efeito protetor da melatonina estava relacionado com uma interferência na redução da síntese de PGE₂ na mucosa gástrica promovida pelo piroxicam, estudamos o efeito do hormônio pineal (1,0 µg/kg, i.g.) sobre a síntese de PGE₂ avaliado 1 hora após administração de piroxicam. A **figura 7B** mostra que na presença de melatonina, piroxicam não reduz as concentrações de PGE₂ na mucosa gástrica de ratos, sugerindo que a melatonina pode estar interferindo na redução das concentrações de PGE₂ induzida pelo piroxicam.

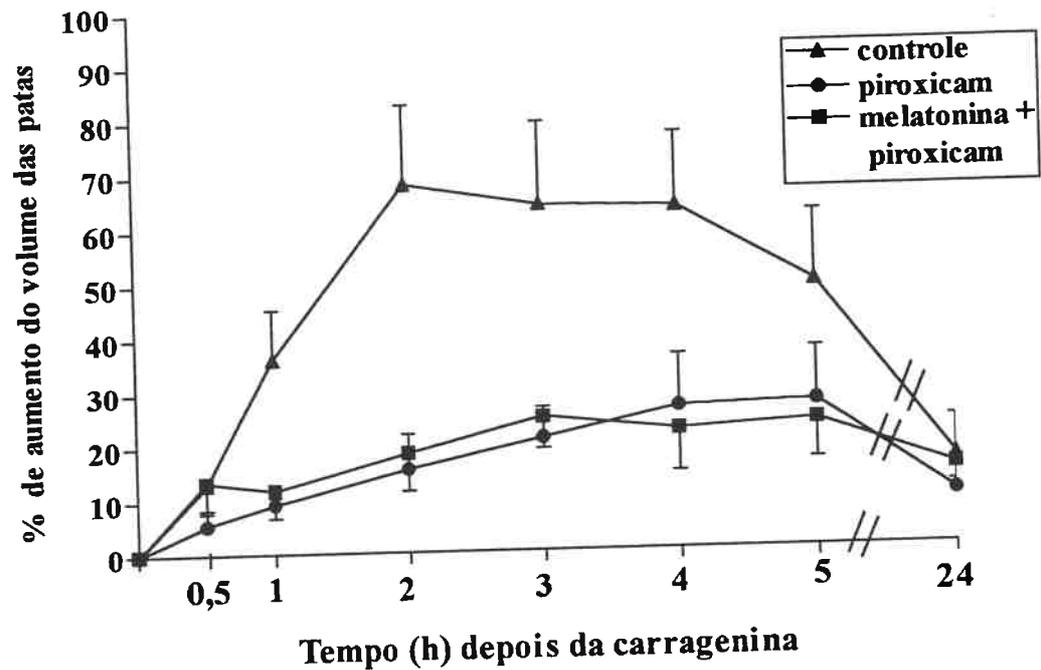


Figura 1. Melatonina exógena (3,0 mg/kg, i.g.) e o efeito antiinflamatório do piroxicam (5 mg/kg, i.g.) no edema de pata induzido pela carragenina (400 µg). Melatonina ou veículo foram administrados intragastricamente, às 16:00 h, trinta minutos mais tarde os ratos receberam piroxicam ou solução de CMC a 0,5% por via intragastrica. Trinta minutos mais tarde, às 17:00 h, o edema foi induzido pela injeção de carragenina na pata dos ratos. Volume das patas foi determinado em vários intervalos de tempo. Os resultados representam a média \pm EPM, com n de 5 animais para todos os grupos. *P < 0,05 significativamente diferente por comparação com o grupo controle.

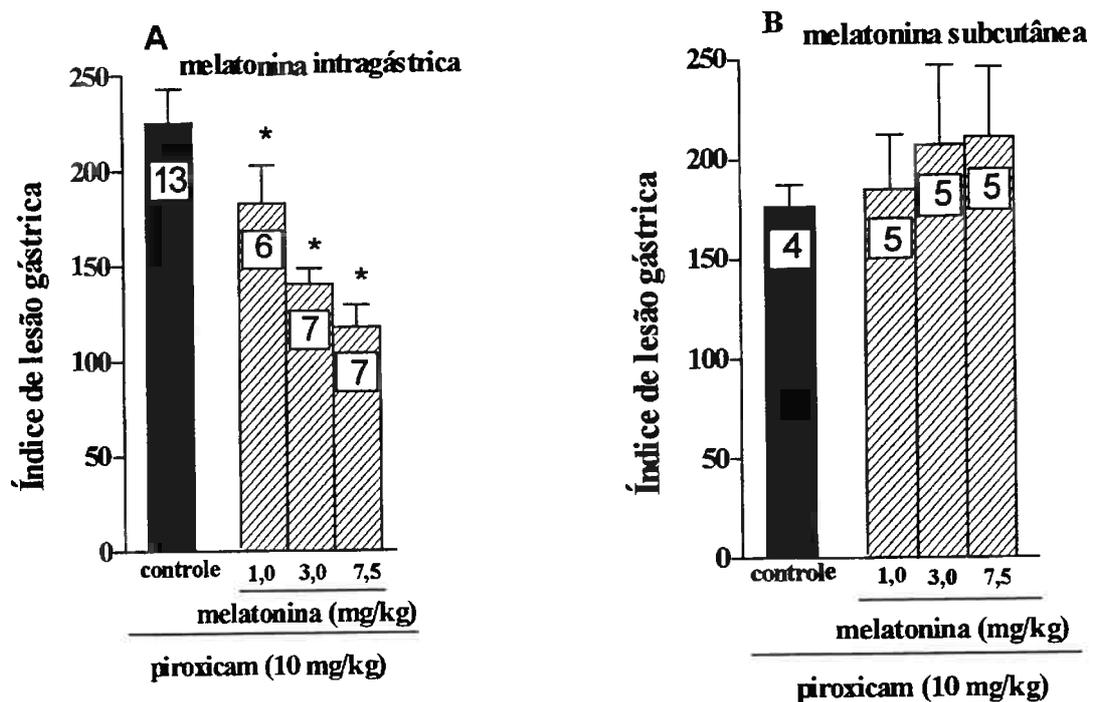


Figura 2. Efeito da melatonina exógena sobre a lesão gástrica induzida pelo piroxicam. Melatonina (1,0; 3,0 e 7,5 mg/kg) ou veículo foram administrados intragastricamente (A) ou subcutaneamente (B) às 16:00 h., em animais mantidos em contenção e jejum por 24 h. A lesão gástrica foi induzida por administração intragástrica de piroxicam (10 mg/kg, i.g.), às 17:00 h. Os animais controles receberam somente piroxicam. Quinze horas após a administração de piroxicam os animais foram sacrificados. A intensidade da lesão gástrica foi expresso com índice de lesão. Os resultados representam a média \pm EPM do número de animais mostrados dentro das colunas, *P < 0,05 significativamente diferente do grupo controle.

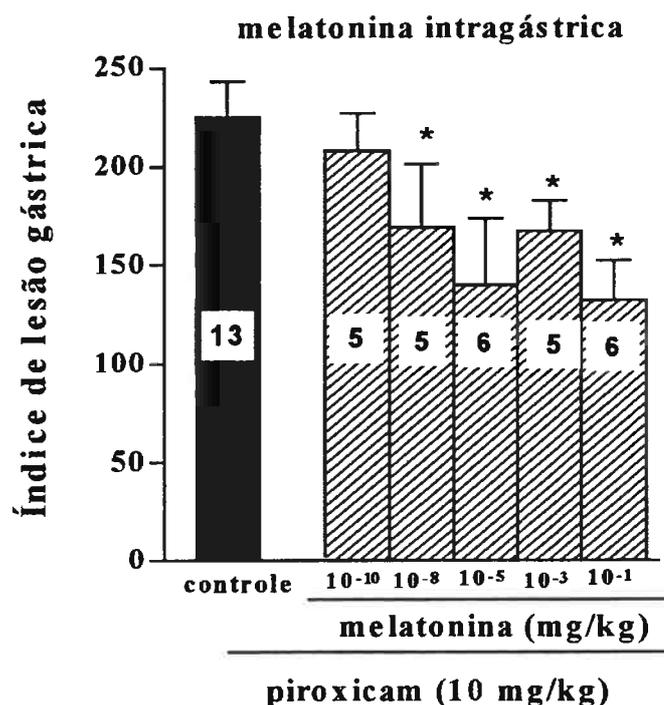


Figura 3. Efeito da melatonina exógena em baixas doses sobre a lesão gástrica induzida pelo piroxicam. Melatonina (10^{-10} - 10^{-1} mg/kg) ou veículo foram administrados intragastricamente às 16:00 h., em animais mantidos em contenção e jejum por 24 h. A lesão gástrica foi induzida pelo piroxicam (10 mg/kg, i.g.), administrado às 17:00 h. Os animais controles receberam somente piroxicam. Quinze horas após a administração de piroxicam os animais foram sacrificados. A intensidade da lesão gástrica foi expressa como índice de lesão. Os resultados representam a média \pm EPM do número de animais mostrados dentro das colunas, * $P < 0,05$ significativamente diferente do grupo controle.

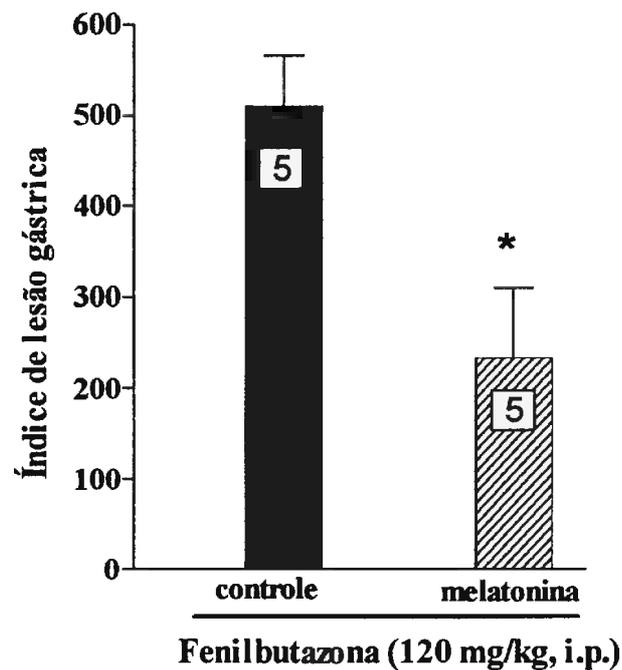


Figura 4. Efeito da melatonina exógena sobre a lesão gástrica induzida pela fenilbutazona. Melatonina (3,0 mg/kg) ou veículo foram administrados intragastricamente às 10:00 h., em animais mantidos em contenção e jejum por 24 h. A lesão gástrica foi induzida por administração intraperitoneal de fenilbutazona (120 mg/kg), às 11:00 h. Os animais controles receberam somente fenilbutazona. Cinco horas após a administração de fenilbutazona, os animais foram sacrificados. A intensidade da lesão gástrica foi expressa como índice de lesão. Os resultados representam a média \pm EPM do número de animais mostrados dentro das colunas, *P < 0,05 significativamente diferente do grupo controle.

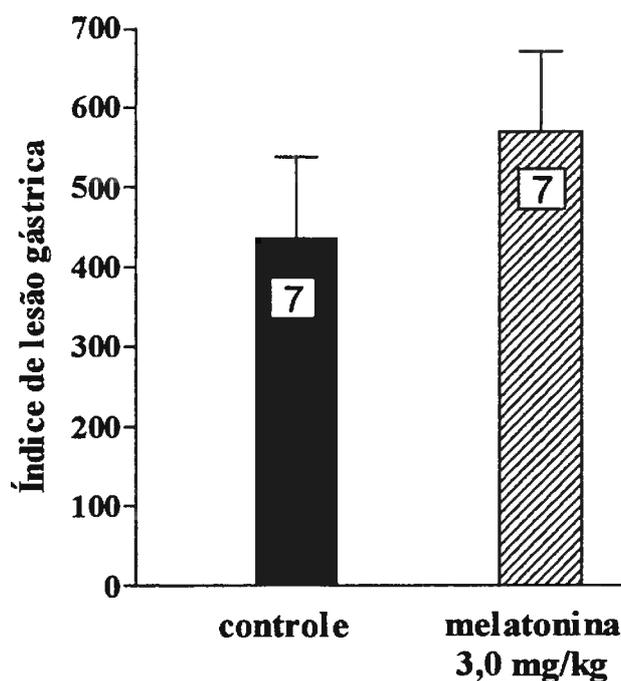


Figura 5. Efeito da melatonina exógena sobre a lesão gástrica induzida pelo estresse. Melatonina (3,0 mg/kg) ou veículo foram administrados intragastricamente às 16:00 h., em animais mantidos em jejum por 32 hs. A lesão gástrica foi induzida por modelo de estresse por imersão em água. Os animais controles receberam somente o veículo da melatonina e submetidos ao estresse. Quinze horas após a colocação em banho de água os animais foram sacrificados. A intensidade da lesão gástrica foi expressa como índice de lesão. Os resultados representam a média \pm EPM do número de animais mostrados dentro das colunas.

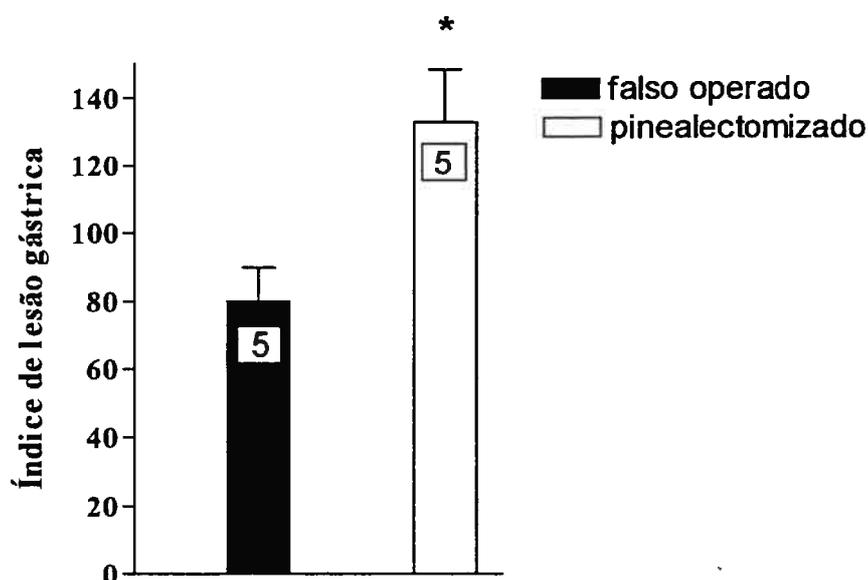


Figura 6. Efeito da melatonina endógena sobre a lesão gástrica induzida pelo piroxicam. Os animais pinealectomizados cirurgicamente e os controles (falso-operados) foram colocados, depois de completados 10 dias de pós-operatório, em contenção e jejum de 24 h. A lesão gástrica foi induzida por administração intragástrica de piroxicam (10 mg/kg) às 23:00 h. Quinze horas após a administração de piroxicam os animais foram sacrificados. A intensidade da lesão gástrica foi expressa como índice de lesão. Os resultados representam a média \pm EPM do número de animais mostrados dentro das colunas, *P < 0,05 significativamente diferente do grupo controle.

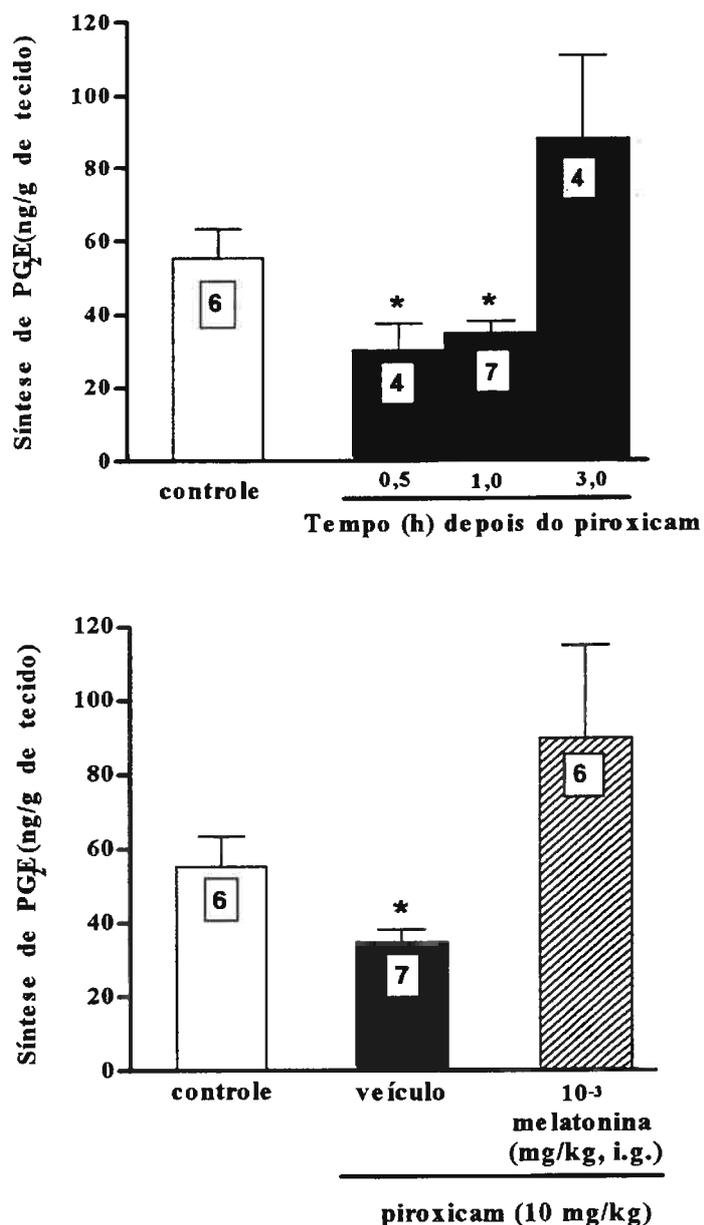


Figura 7. Efeito da melatonina sobre a inibição da síntese de PGE₂ induzida pelo piroxicam. Melatonina (1,0 µg/kg, i.g.) ou veículo foram administrados às 16:00 h, em animais mantidos em contenção e jejum por 24 h. Piroxicam (10 mg/kg, i.g.) foi administrado às 17:00 h. Os animais em (A) receberam somente piroxicam e sacrificados 0,5, 1 e 3 horas depois. Em (B) os animais receberam melatonina e piroxicam e sacrificados após 1 hora. A mucosa gástrica foi coletada e incubada por 20 minutos para avaliar a sua capacidade de sintetizar PGE₂. Os resultados representam a média ± EPM do número de animais mostrados dentro das colunas, * P < 0,05 por comparação com controle.

DISCUSSÃO

Os antiinflamatórios não-esteróides constituem uma classe de medicamentos amplamente utilizados no tratamento e controle de doenças inflamatórias. O efeito colateral mais comum constatado pelo seu uso é a irritação da mucosa gástrica (FRÖLICH, 1997). A descoberta das duas isoformas da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), que são capazes de catalizar a conversão do ácido araquidônico em prostanóides, possibilitou explicar, em parte, a origem dos efeitos adversos dos AINEs no trato gastrointestinal. Os prostanóides citoprotetores do estômago são sintetizados a partir do ácido araquidônico pela COX-1, enquanto que os prostanóides presentes no processo inflamatório são sintetizados pela COX-2. A inseparabilidade dos efeitos dos AINEs em inibir tanto COX-1 quanto COX-2 é determinante para a ocorrência de efeitos colaterais. Assim, muitos estudos estão sendo realizados na tentativa de descobrir novos AINEs com menos efeitos colaterais, principalmente lesão gástrica. Considerando que os AINEs são melhor tolerados à noite (fase de escuro) do que durante o dia (fase de claro), tanto em humanos como em ratos, outra maneira de tentar reduzir os efeitos colaterais seria fazer administração de fármacos, levando em consideração a variação circadiana da lesão gástrica induzida por AINEs (LABRECQUE, 1994).

Uma vez que a melatonina (o hormônio que marca a fase de escuro) e seus sítios de ligação são detectados em altas concentrações no trato gastrointestinal (HEUTHER, 1994, LEE & PANG, 1993), então seria interessante determinar a influência deste hormônio no efeito ulcerogênico dos AINEs. O presente trabalho mostrou que a melatonina, administrada intragastricamente não altera o efeito antiinflamatório do piroxicam, mas inibe o efeito colateral ulcerogênico. O efeito antiulcerogênico da melatonina foi observado após administração intragástrica, mas não pela via subcutânea.

As diferenças observadas entre as duas vias de administração sugerem um efeito local do hormônio sobre a mucosa gástrica. Isto está em concordância com trabalhos anteriores que mostram que a melatonina atua localmente no trato gastrintestinal, reduzindo tônus intestinal e antagonizando o efeito tônico da serotonina, tanto *in vitro* (BUBENICK & DHANVANTARI, 1989) como *in vivo* (BUBENICK, 1986) e trabalhos mais recentes mostrando que a melatonina administrada intragastricamente oferece proteção contra lesão gástrica induzida por isquemia-reperfusão em ratos (KONTUREK *et alii*, 1997).

Por outro lado, o presente trabalho mostrou também que a melatonina noturna endógena pode reduzir o efeito ulcerogênico do piroxicam. O aumento no efeito ulcerogênico do piroxicam induzido por pinealectomia sugeriu que melatonina derivada da glândula pineal é importante para proteção gástrica, embora alguns autores refiram a uma produção local de melatonina no trato gastrintestinal (HOLLOWAY *et alii*, 1980, HUETHER, 1994) independente do ciclo claro-escuro e que drogas antiinflamatórios não-esteroidais podem diminuir síntese de melatonina (MURPHY *et alii*, 1996). Os nossos resultados reforçam a possibilidade da melatonina, sintetizada pela glândula pineal, estar envolvida na variação circadiana da gastrotoxicidade induzida por AINEs. À noite, quando a produção circadiana de melatonina é máxima, tanto humanos como ratos são menos susceptíveis à lesão da mucosa gástrica por AINEs. Embora a melatonina administrada intragastricamente não tivesse alterado o efeito antiinflamatório do piroxicam, alguns relatos sugerem que a melatonina endógena tem efeito antiinflamatório. Quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares induzida por BCG (Bacilo Calmette-Guerin) em camundongos varia de acordo com período de estímulo, com acrofase às 17:00 h e nadir às 5:00 h (BUREAU *et alii*, 1986). Edema de pata e permeabilidade

vascular em processo inflamatório crônico induzido por BCG também apresenta uma variação circadiana (acrofase durante o dia e nadir à noite) que é perdida após a pinealectomia e restaurada pela administração noturna de melatonina (LOPES *et alii*, submetido a publicação).

No presente trabalho foi também demonstrado o efeito antiulcerogênico da melatonina intragástrica no modelo de úlcera induzido por fenilbutazona, um AINE potencialmente ulcerogênico, administrado no período da manhã, quando a ulcerogenicidade dos AINEs tem se mostrado máxima. Estes resultados mostraram que o efeito antiulcerogênico da melatonina não depende do período de sua administração, nem é específico do piroxicam.

Ulceração gástrica induzida por AINEs, inclusive piroxicam e fenilbutazona, está correlacionada com inibição da biossíntese de prostaglandina gástrica, principalmente PGI₂ e PGE₂, que constituem agentes citoprotetores da mucosa gástrica. Estes prostanóides inibem secreção ácida gástrica, aumentam fluxo sanguíneo da mucosa e promovem a secreção de muco citoprotetor no intestino. No presente trabalho foi demonstrado que a administração intragástrica de melatonina atua neutralizando a inibição da síntese de PGE₂ induzida por piroxicam na mucosa gástrica. O mecanismo pelo qual a melatonina influencia a inibição da síntese de PGE₂ induzida por piroxicam não está claro. É possível propor duas hipóteses: na primeira, podemos sugerir que a melatonina esteja neutralizando a inibição da COX induzida por piroxicam. É possível que o pré-tratamento intragástrico com melatonina atue no sítio de atividade da ciclooxigenase prevenindo a inibição da atividade da enzima COX pelo piroxicam. Esta hipótese é consistente com os estudos de LECOMTE *et alii* (1994) que demonstraram um mutante de COX-2 no resíduo de Ser-516 (resíduo homólogo ao sítio ativo Ser-530 da COX-1), que retém atividade enzimática, mas não é acetilada pela aspirina,

mostrando que é possível atuar no sítio ativo e obter enzimas com diferentes características. Esta nossa hipótese pode, à primeira vista, parecer contraditória com os relatos de que em plaquetas a melatonina inibe a síntese de prostaglandinas (MARTINUZZO *et alii*, 1991), entretanto, devemos ressaltar que: (1) na nossa proposta não estamos sugerindo que a melatonina estimule a síntese de PGE₂, (2) na nossa proposta a melatonina atua neutralizando o efeito do piroxicam sobre COX, daí neutralizando o efeito inibidor da síntese de PGE₂. Na segunda hipótese podemos sugerir que a melatonina atua inibindo a atividade da enzima lipoxigenase, uma vez que tem sido considerado que (1) os AINEs inibindo a via da ciclooxigenase provocam um deslocamento para a via da lipoxigenase, (2) a síntese de leucotrienos desempenha papel importante no desenvolvimento da injúria gástrica (SAMUELSSON *et alii*, 1987, FORD-HUTCHINSON *et alii*, 1994) e (3) inibidores da 5-lipoxigenase reduzem a severidade da lesão gástrica induzida por AINEs (RAINSFORD, 1987, PIHAN *et alii*, 1988, VAANANEN *et alii*, 1992). A expressão da 5-lipoxigenase parece ser regulada negativamente pela melatonina em linfócitos B, via receptor nuclear RZR α (receptor retinóide Z α) (STEINHILBER *et alii*, 1995, CARLBERG & WIESENBERG, 1995). Assim, essa regulação negativa na expressão do RNAm da 5-lipoxigenase pela melatonina poderia resultar em um decréscimo na atividade da 5-lipoxigenase.

Considerando os dados discutidos até agora, foi testado se a melatonina tem um efeito citoprotetor por si só, ou somente neutraliza o efeito ulcerogênico do piroxicam ou da fenilbutazona interferindo na redução dos níveis de PGE₂. A última hipótese deve ser considerada, uma vez que a melatonina não protegeu a mucosa do estômago contra úlcera induzida por estresse. É importante notar que embora o efeito citoprotetor do PGE₂ contra agentes lesivos seja bem estabelecido (ROBERT *et alii*, 1979, MORRIS,

et alii, 1983), a ulceração gástrica induzida por estresse é prevenida por drogas que não afetam os níveis de PGE₂ na mucosa gástrica (OGLE *et alii*, 1985) e que PGE₂ por via oral, que aumenta significativamente os níveis de PGE₂ na parede no estômago, não impede a ulceração gástrica induzida por estresse. Na verdade, tem sido sugerido que a úlcera do estômago induzida por estresse é pouco dependente de PGE₂ (OGLE *et alii*, 1985).

Um fator que tem sido constantemente associado com aumento de risco para complicações gástricas relacionadas aos AINEs é a idade. Em animais ou humanos senis ocorre (1) uma progressiva diminuição da produção circadiana de melatonina (ARENDR, 1995) e (2) um declínio na síntese de prostaglandina pela mucosa gástrica (CRYER *et alii*, 1992, LEE & FELDMAN, 1994). Assim, os nossos resultados permitem sugerir que o declínio do ritmo da melatonina em idosos poderia contribuir na iniciação e desenvolvimento de lesão gástrica induzida por AINEs.

Piroxicam é um antiinflamatório que tem uma meia-vida longa, que permite a administração de uma única dose diária, assim pode-se sugerir a possibilidade de administração noturna deste AINE, no sentido de poupar a mucosa gástrica dos efeitos adversos. Além disso, hipótese de um provável benefício terapêutico da administração conjunta de melatonina e AINEs, em alguns casos específicos pode ser sugerida.

Em conclusão, o presente trabalho mostra que (1) a melatonina administrada intragastricamente pode impedir o efeito ulcerogênico do piroxicam pela neutralização da inibição da síntese de PGE₂ induzido pelo piroxicam (por um mecanismo local) e não afeta o efeito antiinflamatório deste fármaco, (2) a melatonina, o hormônio sintetizado pela glândula pineal à noite, tem uma ação protetora contra efeito ulcerogênico do piroxicam e sugere a

existência de mecanismo de menor susceptibilidade à lesão gástrica quando os AINEs são administrados à noite, (3) a melatonina administrada intragastricamente pôde neutralizar o efeito ulcerogênico da fenilbutazona administrada no período matutino, quando o efeito ulcerogênico dos AINEs parece ser mais acentuado, (4) melatonina administrada intragastricamente não interfere com a úlcera induzida por estresse, sugerindo que o efeito antiulcerogênico da melatonina é mais específico para lesão gástrica induzida por antiinflamatórios não-esteroidais.

CONCLUSÕES

Os resultados desse trabalho, segundo os modelos experimentais utilizados, mostram que:

(1) a melatonina administrada intragastricamente pode impedir o efeito ulcerogênico do piroxicam pela neutralização da inibição da síntese de PGE₂ induzida pelo piroxicam (por um mecanismo local) não afetando o efeito antiinflamatório deste AINE,

(2) a melatonina, hormônio sintetizado pela glândula pineal à noite, tem uma ação protetora contra o efeito ulcerogênico do piroxicam e sugere a existência de um mecanismo de menor susceptibilidade à lesão gástrica quando os AINES são administrados à noite,

(3) a melatonina administrada intragastricamente pode neutralizar o efeito ulcerogênico da fenilbutazona administrada no período matutino, quando o efeito ulcerogênico dos AINES parece ser mais acentuado,

(4) melatonina administrada intragastricamente não interfere com a úlcera induzida por estresse, sugerindo que o efeito antiulcerogênico da melatonina é mais específico para lesão gástrica induzida por antiinflamatórios não-esteroidais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENDET, J. Role of the pineal gland and melatonin in circadian rhythms. In: Arendet, J. *MELATONIN AND THE MAMMALIAN PINEAL GLAND*, London, Chapman & Hall, 1995. pp.161-199.
- AVILA, J.R.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MARTÍN, M.J.; MOTILVA, V.; LUQUE, I.; DELGADO, D.; ESTEBAN, J.; HERRERIAS, J. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflamm. Res.*, **45**: 83-8, 1996.
- BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; PANIZA, S.; OSHIRO, T.T.; AZZOLINI, C.A. Pharmacological assay of *Casearia Sylvestris*. I. preventive antiulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. *J. Ethnopharmacol.*, **30**: 185-97, 1990.
- BIEMOND, P., HAN, N.H, SWAKK, A.J.G., KOSTER, J.F. Diminished superoxide production of synovial fluid neutrophils in patients with rheumatoid arthritis following piroxicam treatment. *Scand. J. Rheumatol. Oslo*, **19**: 151-56, 1990.
- BOLLMAN, J.L. A cage which limits the activity of rats. *J. Lab. Clin. Med.*, **33**: 1348, 1948.
- BOUDINOT, S.G., FUNDERBURGE, D.; BOUIDINOT, F.D. Effects of age on the pharmacokinetics of piroxicam in rats. *J. Pharmaceutical Sci.*, **82**: 254-57, 1993.
- BRAMMER, G.L. Duodenum is not consistent source of melatonin in rats. *Life Sci.*, **55**: 775-87, 1994.
- BUBENIK, G.A. Localization of melatonin in the digestive tract of the rat: effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy. *Horm. Res.*, **12**: 313-23, 1980.
- BUBENIK, G.A. The effect of serotonin, N-acetylserotonin, and melatonin on spontaneous contractions of isolated rat intestine. *J. Pineal Res.*, **3**: 41-54, 1986.

De acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas. Referências bibliográficas: NB- 66.

In: Normas ABNT sobre documentação, Rio de Janeiro, 1978, p. 13-20.

Serial sources for the BIOSIS data base. Philadelphia, BIOSIS, 1990

- BUBENIK, G.A. & DHANVANTARI, S. Influence of serotonin and melatonin on some parameters of gastrointestinal activity. *J. Pineal Res.*, **7**: 333-44, 1989.
- CARLBERG, C. & WISENBERG, I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: An unexpected relationship. *J. Pineal Res.*, **18**: 171-78, 1995.
- CHEW, C.S. Intracellular activation events for parietal cell hydrochloric acid secretion. In: Schultz, S.G. ed., *HANDBOOK OF PHYSIOLOGY : THE GASTROINTESTINAL SYSTEM*, Volume III, Maryland, Warvelly Press, 1989. pp.255-66,.
- CHO, C.H.; PANG, S.F.; CHEN, B.W.; PFEIFFER, C.J. Modulation action of melatonin on serotonin-induced aggravation of ethanol ulceration and changes of mucosal blood flow in rat stomachs. *J. Pineal Res.*, **6**: 89-97, 1989.
- COLEMAN, A.R. & HUMPREY, P.P.A. Prostanoid receptors: their function and classification. IN: Vane, J.R. *THERAPEUTICS APPLICATIONS OF PROSTAGLANDINS*, London, Edward Arnold, 1993. pp.15-36.
- COMBES, H.J. & HEINRICH, J. Treatment of primary dysmenorrhea with piroxicam. *Zentraibl. Gynaekol.*, **112**: 839-41, 1990.
- CRYER, B.; REDFERN, JS; GOLDSCHMIEDT, M; LEE, E.; FELDMAN, M. Effect of aging on gastric and duodenal mucosal prostaglandin concentrations in humans. *Gastroenterology*, **102**: 1118-23, 1992.
- CURTIS, G.H.; MACNAUGHTON, W.K.; GALL, D.G. Effect of cyclooxygenase inhibition on macromolecular transport in rat gastric mucosa. *Am. J. Physiol.*, **265**: G1135-40, 1993.
- DENNIS, E.A. & KRELL, R.D. Summary : The enzymes, accessory proteins, and receptors of leukotriene metabolism and their inhibition and antagonism. *ADV. PROSTAGLAND, THROMBOXANE LEUKOTRIENE RES.*, **22**: 63-67, 1994.

- EBALDI, M. Regulation of the synthesis of melatonin and its significance to neuroendocrinology. In: Reiter,R.J ed. *THE PINEAL GLAND, COMPRENSIVE ENDOCRINOLOGY*, New York, Raven Press, 1984. pp.1.
- FELDMAN, M. & SCHILLER, L.S. Effect of bethanechol (urecholine) on gastric acid and non-parietal secretion in normal subjects and duodenal ulcer patients. *Gastroenterology*, **83**: 262-66, 1982.
- FELDMAN,M. & BARNETT, C.C. Gastric bicarbonate secretion in humans. Effects of pentagastrin, bethanechol and 11,16,16-thimethyl prostaglandin E₂. *Clin. Invest.*, **72**: 295-303, 1983.
- FELDMAN, M. & BARNETT, C.C. Gastric bicarbonate secretion in patients with duodenal ulcer. *Gastroenterology*, **88**: 1205-08, 1985.
- FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature*, **240**: 200-03, 1972.
- FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M.; ABREU CASTRO, M.S. The hyperagesic effects of prostacyclin and PGE_s. *Prostaglandins*, **16**: 31-7, 1978.
- FIORETTI, M.C.; MENCONI, E.; RICCARDI, C. Mechanism of the in vitro 5-hydroxytryptamine (5-HT) antagonism exerted by pineal indole derivatives. *Rev. Farmacol. Ter.*, **5**: 43-9, 1974.
- FLOWER, R.J. Prostaglandins and related compounds. In: VANE, J.R. & FERREIRA, S.H. *Inflammation*. New York, Springer-Verlag, 1978. p.374-422.
- FORD-HUTCHINSON; A.W. Leukotriene B₄ in inflammation. *Crit. Rev. in Imunol.*, **10**: 1-12,1990.
- FORD-HUTCHINSON; A.W.; GRESSER, M.; YOUNG, R.N. 5-lipoxygenase. *Ann. Rev. Biochem.*, **63**: 383-417, 1994.

- FRÖLICH, J.C. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Tips*, **18**: 30-4, 1997.
- GANONG. F.W. Review of Medical Physiology : Regulation of Gastrointestinal Function, 17^a ed., London, Appleton & Lange, 1995. p.442-71.
- GARCIA LEME, J. Endocrine and nervous systems: pharmacological considerations. In: BONTA, I.L. ed. *HANDBOOK OF INFLAMMATION. THE PHARMACOLOGY OF INFLAMMATION*, Amsterdam, L.E. Glyn, 1989.195-234.
- GODMAN & GILMAN's. *THE PHARMACOLOGICAL BASES OF THERAPEUTICS*. 9.ed New York, MacGraw-Hill, 1996.
- GÖKE, M.; ZUK, A. & PODOLKY, D. Regulation and function of extracellular matrix in intestinal epithelial restitution in vitro. *Am. J. Physiol.*, **34**: G729-40, 1996.
- HARLOW, H.J. & WEEKLEY, B.L. Effect of melatonin on the force spontaneous contractions on in vitro rat small and large intestine. *J. Pineal Res.* **3**: 277-84, 1986.
- HAWKEY, C.J. & WHITTLE, B.J.R. Prostaglandins in the management of gastroduodenal ulceration. IN: Vane, J.R. ed. *THERAPEUTICS APPLICATIONS OF PROSTAGLANDINS*, London, Edward Arnold, 1993. pp.122-140.
- HAWTHORNE, A.B.; MAHIDA, Y.R.; COLE, A.T. & HAWKLEY, C.J. Aspirin-induced gastric mucosal damage: prevention by enteric-coating and relation to prostaglandin synthesis. *Br J. Clin. Pharmacol.*, **32**: 77-83, 1991.
- HEBEL, R. AND STROMBERG, M.W. *Anatomy and Embriology of the Laboratory Rat*. New York, Biomed. Verlag Worthese, 198. p.49-50.
- HIGGS, G.A.; PALMER, R.M.; EAKINS, K.E.; MONCADA, S. Arachidonic acid metabolism as a source of inflammatory mediators and its inhibition as a mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Molec. Aspects Med.*, **4**: 275-301, 1981.

- HIRST, B.H. The gastric mucosal barrier. In: Schultz, S.G. ed., *HANDBOOK OF PHYSIOLOGY : THE GASTROINTESTINAL SYSTEM*, Volume III, Maryland, Warvelly Press, 1989. pp.279-308.
- HOLLOWAY, W.; GROTA, L.; BROWN, G. Determination of immunoreactive melatonin in the colon of the rat by immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **28**: 255-62, 1980.
- HOFFMAN, R.; REITER, R.J. Rapid pinealectomy in hamster and other small rodents. *Anat. Rec.*, **153**: 19-22, 1965.
- HUETHER, G.; POEGGELER, B.; REIMER, A.; GEORGE, A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci.*, **51**: 945-53, 1992.
- HUETHER, G. Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact nutritional factors on circulating melatonin. *Ann. New York Acad. Sci.*, **719**: 146-58, 1994.
- HUETHER, G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia*, **49**: 665-70, 1993.
- ICHIKAWA, A.; SUGIMOTO, Y.; NEGISHI, M. Molecular aspects of the structures and functions of the prostaglandin E receptors. *J. Lipid Mediators Cell Signalling*, **14**: 83-87, 1996.
- JOHANSSON, C.; ALY, A.; NILSSON, E.; FLEMSTRÖM, G. Stimulation of gastric bicarbonate secretion by E₂ prostaglandins in man. *ADV. PROSTAGLANDIN THROMBOXANE LEUKOTRIENE RES.* **12**: 395-401, 1983.
- JUNQUEIRA, L.C.H. E MARTINS, E.O. *Atlas de Anatomia Microscópica do rato..*, São Paulo, EDUSP, 1947. p. 42-6.

- KAUFFMAN, G.L.,JR., REEVE, J.J., JR.; GROSSMAN, M.I. Gastric bicarbonate secretion: effect of topical and intravenous 16,16-dimethyl prostaglandin E₂. *Am. J. Physiol.*, **239**: G44-8, 1980.
- KENT, K.C. E DEBAS, H.T. Peripheral Regulation of Gastric Acid Secretion. In: Ed. Johnson, L.R. *PHYSIOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT*. 3rd Edition, New York, Raven Press, 1994. p. 1185-226.
- KITAJIMA, M.; OTSUKA, S. & SHIMIZU, A. Impairment of gastric microcirculation in stress. *J. Clin. Gastroenterol.*, **10**: S120-8, 1988.
- KITAJIMA, M.; SHIMIZU, A.; SAKAI, N. OTSUKA, S. *et alii*. Gastric microcirculation and its regulatory factor in stress. *J. Clin. Gastroenterol.*, **13**: 59-67, 1991.
- KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; MAJKA, J.; ZEMBALA, M.; HAHN, E.G. Melatonin affords protection against gastric lesions induced by ischemia-reperfusion possibly due to its antioxidant and mucosal microcirculation effects. *Eu. J. Pharmacol.*, **322**: 73-7, 1997.
- KVIETYS, P.R.; SPECIAN, R.D.; GRISHAM, M.B.; TSO, P. Jejunal mucosal injury and restitution: role of hydrolytic products of food digestion. *Am. J. Physiol.*, **24**: G384-91, 1991.
- LABRECQUE, G. & REINBERG, A.E. Chronopharmacology of Nonsteroid Anti-inflammatory Drugs. In: Lemmer, B. ed. *CHRONOPHARMACOLOGY: CELLULAR AND BIOCHEMICAL INTERACTIONS.*, New York. Marcel Dekker, 1989, pg.545-579.
- LABRECQUE, G. Inflammatory reactions and disease states. in: Touitou, E. H. ed. *BIOLOGIC RHYTHMS IN CLINICAL AND LABORATORY MEDICINE*, New York, Springer-Verlag, 1994. pp. 483-492.

- LAMBRECHT, N.; BURCHERT, M.; RESPONDEK, M.; MÜLLER, K-M.; PESKAR, B.M. Role of calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in the gastroprotective effect of capsaicin in the rat. *Gastroenterology*, **104**: 1371-89, 1993.
- LANDS, W.E.M. Actions of anti-inflammatory drugs. *TIPS*, **2**: 78-80, 1981.
- LARSEN, K.R.; MOORE, J.G.; DAYTON, M.T. Circadian rhythms of acid and bicarbonate efflux in fasting rat stomach. *Am. J. Physiol.*, **23**: G610-4, 1991.
- LECOMTE, M.; LANEUVILLE, O.; JI, C.; de WITT; D.L.; SMITH, W.L. Acetylation of human prostaglandin endoperoxidase synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *J. Biol. Chem.*, **269**: 13207-15, 1994.
- LEE, PP & PANG, SF. Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Biol-Signals*, **2**: 181-93, 1993.
- LEE, M. & FELDMAN, M. Age-related reductions in gastric mucosal prostaglandin levels increase susceptibility to aspirin-induced injury in rats. *Gastroenterology*, **107**: 1746-50, 1994.
- LEVI, F., LELOUARN C., REINBERG, A. Timing optimized sustained indomethacin treatment of osteoarthritis. *Clin. Pharmacol. Ther.* **37**: 77-84, 1985.
- LIPTON, S.A. Prospects or clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Tins*, **16**: 527-32, 1993.
- LOPEZ-BELMONTE, J., WHITTLE, B.J.R.; MONCADA, S. The actions of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the rat gastric mucosa. *Br. J. Pharmacol.*, **108**: 73-8, 1993.
- LOUBARIS, N., MICHEL, A., CROS, G., SERANO, J.J., KATZ, S.; BOUCARD, M. Circadian changes in carrageenan-induced edema: the anti-inflammatory effect and bioavailability of phenylbutazone in rats. *Life Sci.* **34**: 2379-2384, 1984.

- MARTINUZO, M.; DEL-ZAR, M.M.; CARDINALI, D.P.; CARRERAS, L.O.; VACAS, M.I. Melatonin effect on arachidonic acid metabolism to cyclooxygenase derivatives in human platelets. *J. Pineal Res.*, **11**: 111-5, 1991.
- MENENDEZ-PELAEZ, A. & REITER, R.J. Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytoplasmic receptors. *J. Pineal Res.*, **15**:59-69, 1993.
- MENNENGA, K; UECK, M; REITER, R.J. Immunological localization of melatonin in the pineal gland and retina of the rat. *J. Pineal Res.*, **10**: 159-64, 1991.
- MITCHELL, J.H., AKARASEREENONT, P., THIERMERMANN, C. FLOWER, R.J., VANE, J.R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 11693-7, 1993.
- MONCADA, S.; FERREIRA, S.H.; VANDE, J.R. Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. *Nature*, **246**: 217-9, 1973.
- MOORE, J. G. & GOO, R. H. Day and night aspirin-induced gastric mucosal damage and protection by ranitidine in man. *Chronobiol. Int.*, **4**: (Ulcerogenesis suppl.): 111-6, 1987.
- MOORE, G. Chronobiology of the gastrointestinal system. In: Touitou, E. H. ed. *BIOLOGIC RHYTHMS IN CLINICAL AND LABORATORY MEDICINE*, New York, Springer-Verlag, 1994. pp. 410-7.
- MORRIS, G.P.; WALLACE, J.L.; HARDING, P.L. Effects of prostaglandin E₂ on salicylate-induced damage to the rat gastric mucosa: cytoprotection is not associated with preservation of the gastric mucosa barrier. *Can. J. Physiol. Pharmac.*, **62**: 1065-9, 1983.

- MURPHY, P.J.; MEYER, B.L.; BADIA, P. Nonsteroidal antiinflammatory drugs alter body temperature and suppress melatonin in human. *Physiol. & Behavior*, **59**: 133-9, 1996.
- OGLE, C.W.; CHO, C.H.; DAI, S. Sulphalazine and experimental stress ulcers. *Agents Action*, **17**: 153-7, 1985.
- OLSON, C.E.; SOLL, A.H.; GUTH, P.H. Circadian variation of susceptibility to gastric mucosal injury by acidified aspirin or absolute ethanol in the rat. *Gastroenterology*, **91**: 1192-7, 1986.
- OLSON, C.E. A chronobiologic approach to ethanol and acidified aspirin injury of the gastric mucosa in the rat. *Chronobiol. Int.*, **4**: 19-29, 1987.
- PFEIFFER, A.; SCHUHBECK, F.; SCHIMIDT, T.; KAESS, H. Circadian variation of the effect of aspirin on gastric potential difference. *Ann. Rev. Chronopharmacology*, **7**: 87-90, 1990.
- PIHAN, G.; ROGERS, C. & SZABO, S. Vascular injury in acute gastric mucosal damage. Mediator role of leukotrienes. *Dig. Dis. Sci.*, **33**: 625-32, 1988.
- PRESLOCK, J.P. The pineal gland: Implications and chemical correlations. *Endoc. Rev.*, **5**: 282-308, 1984.
- QUASTEL, M.R. & RAHAMIMOFF, R. Effect of melatonin on spontaneous contractions and response to 5-hydroxytryptamine of rat isolated duodenum. *Br. J. Pharmacol.*, **24**: 455-61, 1965.
- RAINSFOR, K.D. *ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-RHEUMATIC DRUGS*, Florida, CRC Press, Boca Raton, 1985. Vol.I e II.
- RAINSFOR, K.D. The effects of 5-lipoxygenase inhibition and leukotriene antagonists on the development of gastric lesions induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs in mice. *Agents Actions*, **21**: 316-19, 1987.

- REES, W.D.W., GIBBONS, L.C.; TURNBERG, L.A. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on alkali secretion by rabbit gastric fundus in vitro. *Gut*, **24**: 84-789, 1983.
- REITER, R.J. Pineal Melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Rev.*, **12**: 151-180, 1991.
- REITER, R.J. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **26**: 1141-1155, 1993.
- ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A.J. Cytoprotection of prostaglandin in rats: prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterology*, **77**: 433-43, 1979.
- SAMUELSSON, B. Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, **220**: 568, 1983.
- SAMUELSSON, B.; DAHLEN, S.E.; LINDGREN, J.A.; ROUZER, C.A.; SERHAN, C.N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effect. *Science*, **237**: 1171-76, 1987.
- SAVAGE, R.L.; MOLLER, P.W.; BALLANTYNE, C.L.; WELLS, J.E. Variation in the risk of peptic ulcer complications with nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy. *Arthritis Rheum.*, **36**: 84-90, 1993.
- SAXENA, P.N.; BEG, M.M.A.; SINGHAL, K.C.; AHMAD, M. Prostaglandin-like activity in the cerebrospinal fluid of febrile patients. *Indian J. Med. Res.*, **79**: 495-8, 1979.
- SOLL, A.H. & BERGLINDH, T. Receptors that regulate gastric acid-secretory function. In Johnson, J.R. ed. *PHYSIOLOGY OF: THE GASTROINTESTINAL SYSTEM*, New York, Raven Press, 1994. V. II, pp.1139-1169.

- STEINHILBER, D.; BRUNGS, M.; WERZ, O.; WIESENBERG, I.; DANIELSSON, C.; KAHLEN, J-P.; NYERI, S.; SCHARÄDER, M.; CARLBERG, C. The nuclear receptor for melatonin repress 5-lipoxygenase gene expression in human lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, **270**: 7037-40, 1995.
- TEPPERMAN, B.L. & JACOBSON, E.D. Circulatory factors in gastric mucosal defense and repair. IN: Johnson, L.R. ed. *PHYSIOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT*, 3rd Edition, New York, Raven Press, 1994. pp. 1331-76.
- URIBE, A. Indomethacin inhibits cell proliferation in the oxyntic epithelium of the rat. *Prostaglandins*, **45**:15-26, 1993.
- VAANANEN, P.M.; KEENAN, C.M.; GRISHAN, M.B., WALLACE, J.L. Pharmacological investigation of the role of leukotrienes in the pathogenesis of experimental NSAID gastropathy. *Inflammation*, **16**: 227-40, 1992.
- VAKKURI, O., LÄMSÄ, E., RAHKAMAA, E., RUOTSALAINEN, H.; LEPPÄLUOTO, J. Iodinated melatonin: preparation and characterization of the molecular structure by mass and ¹H NMR spectroscopy. *Anal. Biochim.*, **142**: 248-89, 1984.
- VAN ARMAN, C.G.; BEGANY, A.J.; MILLER, L.M.; PLESS, H.H. Some details of the inflammations caused by yeast and carragenin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **150**: 328-33, 1965.
- VANE, JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.*, **231**: 232-39, 1971.
- VANE, J.R., BOTTING, R.M. New insights into the mode of action of antiinflammatory drugs. *Inflammation Res.*, **44**: 1-10, 1995.
- WALLACE, J.L. & GRANGER D.N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB J.* **10**: 731-740, 1996.

- WALLACE, J.L. Immunopharmacology of eicosanoids in the gastrointestinal tract. In: Page, C. ed. **Imunopharmacology of the Gastrointestinal System: THE HANDBOOK OF IMMUNOPHARMACOLOGY**, San Diego, Acad. Press, 1993, pp.137-54.
- WALLACE, J.L.; KEENAN, C.M.; GRANGER, D.N. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *Am. J. Physiol.*, **259**: G462-67, 1990.
- WHITTLE, B.J.R. Actions of prostaglandins on gastric mucosal blood flow. In: Fielding, L.P. **GASTRO-INTESTINAL MUCOSAL BLOOD FLOW**, New York, Churchill Livingstone, 1980. pp.180-91.
- WHITTLE, B.J.R., KAUFFMAN, G.L.; MONCADA, S. Vasoconstriction with thromboxana A₂ induces ulceration of the gastric mucosa. *Nature*, **292**: 472-4, 1981.
- WHITTLE, B.J.R.; KAUFFMAN, G.L.; BOUGHTON-SMITH. Stimulation of gastric alkaline secretion by stable prostacyclin analogues in rat and dog. *Eur. J. Pharmacol.* **100**: 277-83, 1984.
- WHITTLE, B.J.R. & VANE, J.R. Prostanoids as regulators of gastrointestinal function. In: Johnson, L.R. **PHYSIOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT**, 2 ed., Raven Press, 1987. pp.143-180.
- WHITTLE, B.J.R., LOPEZ-BELMONTE, J.; MONCADA, S. Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide : interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **99**: 607-11, 1990.
- WHITTLE, B.J.R.; LOPEZ-BELMONTE, J.; MONCADA, S. Nitric oxide mediates rat mucosal vasodilatation induced by intragastric capsaicin. *Eur. J. Pharmacol.*, **218**: 339-41, 1992.

- WHITTLE, B.J.R. Nitric Oxide in gastrointestinal Physiology and Pathology. In: Johnson, L.R *PHYSIOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT*, 2 Ed., New York, Raven Press, 1994. pp.267-95.
- WILLIAMS, T.J. & PECK, M.J. Role of prostaglandin-mediated vasodilation in inflammation. *Nature*, **270**: 30-2, 1977.
- WILLIS, A.L. & SMITH, D.L. Metabolism of arachidonic acid: an overview In: Cunningham, F. ed. *LIPID MEDIATORS : THE HANDBOOK OF IMMUNOPHARMACOLOGY*, London, Academic Press, 1994. p. 1-22.
- WISSEMAM, E.H. Piroxicam and related oxicams. In: Rainsford, K.D. *ANTIINFLAMMATORY AND ANTI-RHEUMATIC DRUGS*, Boca Raton, CRC Press, , 1985. p.210-248.
- WONG, S.H.; CHO, C.H. & OGLE, C.W. The role of serotonin in ethanol-induced gastric glandular damage in rats. *Digestion*, **45**: 52-60, 1990.
- WYNNE, E. & RAWLINS. Are systemic levels of non-steroidal anti inflammatory drugs relevant to acute upper gastrointestinal hemorrhage ? *Eur. J. Pharmacol.*, **44**: 309-13, 1993.

ABSTRACT

Non-steroidal anti-inflammatory drugs are, as a group, the most frequently consumed drugs worldwide. They also cause gastrointestinal adverse effects, like gastric ulceration and increased bleeding. Several reports indicate that, both the anti-inflammatory effect and the susceptibility to mucosal damage produced by NSAIDs in rats and humans show a circadian variation. Nighttime administration of NSAIDs is better tolerated than morning administration in human and rats. Melatonin, the principal hormone of the pineal gland is secreted at night both in nocturnal and diurnal animals. The purpose of this experiment was to study the effect of melatonin on the anti-inflammatory action and gastric mucosal damage induced by piroxicam and the effect of melatonin and piroxicam on the gastric mucosal prostaglandin E₂ (PGE₂) synthesis. Intragastric administration of melatonin significantly attenuated the gastric lesions induced by piroxicam, but, did not effect anti-inflammatory action accessed by measuring paw edema after carrageenin administration. Melatonin anti-ulcerogenic effect was observed after intragastric, but not subcutaneous administration. The differences observed between the two administration routes point to a local effect of the hormone on the stomach mucosa. Pinealectomy increases the ulcerogenic effect of nocturnal administered piroxicam. The anti-ulcerogenic effect of intragastric melatonin was related to prevention of the inhibition of gastric mucosal PGE₂ production induced by piroxicam. Indeed, intragastric administration of melatonin protect the gastric mucosa damage induced by phenylbutazone, another potent ulcerogenic NSAID, while melatonin has no effect on stress-induced gastric ulceration. These data suggest that melatonin may attenuate the severity of NSAID-induced gastric mucosal lesions in rats by preventing NSAID-induced inhibition of mucosal PGE₂ production, without affecting the anti-inflammatory action.

KEY WORDS: NSAIDs, NSAID-induced gastric mucosal lesions, mucosal PGE₂, melatonin