

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**KEFIR DE LEITE PREVINE LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS
PELO USO DE ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL**

LARISSA ZAMBOM CÔCO

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2021

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**KEFIR DE LEITE PREVINE LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS
PELO USO DE ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção do
grau de Mestra em Ciências
Farmacêuticas.

LARISSA ZAMBOM CÔCO

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2021

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C667k Coco, Larissa Zambom.

Kefir de leite previne lesões gástricas induzidas pelo uso de anti-inflamatório não esteroidal (2019-2021) / Larissa Zambom Coco. – 2021.

65 f. : il.

Orientadora: Bianca Prandi Campagnaro. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Vila Velha, 2021.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Estresse oxidativo. 3. Probióticos. 4. Óxido nítrico. I. Campagnaro, Bianca

Prandi.

II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**KEFIR DE LEITE PREVINE LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS
PELO USO DE ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL**

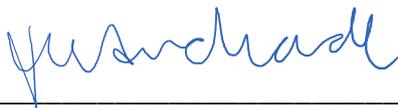
Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção do
grau de Mestra em Ciências
Farmacêuticas.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2021,

Banca Examinadora:



Dr. Fernanda Gobbi Amorim (Universidade de Liège - Bélgica)
Membro Externo



Dr. Tadeu Uggere de Andrade (Universidade Vila Velha)
Membro Interno



Dr. Bianca Prandi Campagnaro (Universidade Vila Velha)
Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos recebidas e por sempre estar presente em todos os momentos.

Aos meus pais, por serem meu ponto de equilíbrio, por me apoiarem e sempre me incentivarem a continuar nesta jornada.

A professora Dr^a. Bianca Prandi Campagnaro, pela orientação e por me incentivar na pesquisa desde a iniciação científica. Obrigada por toda a confiança e por todo o ensinamento.

Ao professor Dr. Thiago de Melo Costa Pereira por todo o ensinamento durante este período.

Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Translacional, em especial a Kelly Ribeiro e Alexandra Bicas.

As minhas amigas do mestrado, Glauceire Carvalho, Rafaela Aires e Ávila Iglesias por todo companheirismo, apoio e paciência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Vila Velha (PPGCF-UVV) pela oportunidade de estudo.

Aos professores do programa de PPGCF-UVV por todo o ensinamento durante estes anos.

Aos Laboratórios de Fisiologia Transnacional (LFT) e de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) pela colaboração permitindo a finalização do trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida. “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 Fisiologia do trato gastrointestinal | 16 |
| 1.2 Úlcera gástrica | 18 |
| 1.3 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) x lesão gástrica | 19 |
| 1.4 Estresse oxidativo x lesão gástrica | 21 |
| 1.5 Inibidores de bomba de prótons (IBPs) x úlcera gástrica | 22 |
| 1.6 Kefir de leite | 23 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 25 |
| 3. OBJETIVOS | 27 |
| 3.1 Objetivo Geral | 27 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 27 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 4.1 Preparação e administração do Kefir | 28 |
| 4.2 Desenho experimental e indução de lesão gástrica | 28 |
| 4.3 Análise do pH do suco gástrico | 30 |
| 4.4 Análise macroscópica | 30 |
| 4.5 Escore de lesão gástrica | 31 |
| 4.6 Índice de proteção | 31 |
| 4.7 Análise estrutural e quantificação de mucocitoprotetor no estômago | 31 |
| 4.8 Análise estrutural do epitélio gástrico através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 33 |
| 4.9 Preparo de amostras | 34 |
| 4.9.1 Isolamento das células do estômago | 34 |
| 4.9.2 Preparo das amostras de plasma | 35 |
| 4.10 Determinação dos níveis de ROS por citometria de fluxo | 35 |
| 4.11 Determinação de apoptose e viabilidade celular | 36 |
| 4.12 Análise do conteúdo de DNA | 36 |
| 4.13 Atividade da mieloperoxidase plasmática | 36 |
| 4.14 Níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias | 37 |

| | | |
|------|---------------------------|----|
| 4.15 | Análise estatística | 37 |
|------|---------------------------|----|

5. RESULTADOS

| | | |
|-----|--|----|
| 5.1 | Análise macroscópica..... | 38 |
| 5.2 | Escore de lesão, índice de prevenção e análise do pH gástrico..... | 38 |
| 5.3 | Citoestrutura do estômago..... | 39 |
| 5.4 | Avaliação estrutural do epitélio gástrico por MEV..... | 41 |
| 5.5 | Análise dos níveis de ROS/NO em células gástricas | 42 |
| 5.6 | Avaliação da viabilidade e apoptose celular em células gástricas | |
| 5.7 | Análise do conteúdo do DNA..... | 43 |
| 5.8 | Atividade da mieloperoxidase sistêmica | 44 |
| 5.9 | Níveis plasmático de citocinas inflamatórias..... | 45 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| 6. DISCUSSÃO | 47 |
|---------------------------|-----------|

| | |
|---------------------------|-----------|
| 7. CONCLUSÃO | 53 |
|---------------------------|-----------|

| | |
|-----------------------------|-----------|
| 8. REFERÊNCIAS | 54 |
|-----------------------------|-----------|

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema gastrointestinal

Figura 2: Imagem representativa do estômago e suas regiões

Figura 3: Mecanismo de ação dos medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais

Figura 4: Irritação local do epitélio gástrico por AINE

Figura 5: Esquema das reações das enzimas antioxidantes sobre as espécies reativas de oxigênio

Figura 6: Preparo do leite fermentado do kefir utilizado no projeto de pesquisa

Figura 7: Desenho experimental do projeto de pesquisa

Figura 8: Fotografia do camundongo Swiss em jejum

Figura 9: Análise da lesão gástrica no programa *ImageJ* (*Image-J* 1.35 d, USA) de domínio público

Figura 10: Porcentagem de lesão gástrica sobre tecidos do estômago e suas fotografias representativas dos grupos experimentais

Figura 11: Imagem representativa da histologia do epitélio gástrico (estômago) dos grupos experimentais

Figura 12: Análise histológica dos grupos experimentais

Figura 13: Porcentagem de muco citoprotetor dos grupos experimentais

Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Figura 15: Análise da produção das ROS O_2^- , H_2O_2 , $ONOO^-$, OH^- e ^-NO em células gástricas

Figura 16: Avaliação do apoptose e viabilidade celular em células gástricas isoladas

Figura 17: Avaliação conteúdo celular (fases Sub G0) das células gástricas isoladas dos grupos experimentais

Figura 18: Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no pré-tratamento entre os grupos experimentais

Figura 19: Níveis de plasmáticos de citocinas inflamatórias dos grupos experimentais

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Análise qualitativa do escore gástrico, análise quantitativa do índice de proteção do tecido gástrico e análise do pH do suco gástrico dos grupos experimentais.

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE: Anti-inflamatório não esteroidal

ANOVA: Análise de variância

CAT: Catalase

Cl⁻: Ions cloreto

COX-1: Cicloxigenase 1

COX-2: Cicloxigenase 2

DAF: Diaminofluoresceína

DCFH-DA: 2',7': Diacetato de diclorofluoresceína

DHE: Dihidroetídeo

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

GPx: Glutathione peroxidase

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HCl: Ácido clorídrico

HE: Hematoxilina-eosina

HPF: Hidroxifenilfluoresceína

IBP: Inibidores de bomba de prótons

IL-10: Interleucina 10

IL-6: Interleucina 6

LABIOM: Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares

LFFT-UVV: Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Transacional da Universidade Vila Velha

LFT: Laboratório de fisiologia Translacional

LUCCAR: Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

·NO: Óxido nítrico

O₂⁻: Ânion superóxido

OH·: Radical hidroxila

ONOO⁻: Peróxinitrito

PAS: Ácido periódico de Schiff

PBS: Phosphate-buffered saline

RE: Retículo endoplasmático

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SOD: Superóxido dismutase

TGI: Trato gastrointestinal

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UHT: Ultra High Temperature

UVV: Universidade Vila Velha

RESUMO

COCO, LARISSA ZAMBOM, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, Fevereiro de 2021. **KEFIR DE LEITE PREVINE LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS PELO USO DE ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL** (2019-2021). Orientadora: Bianca Prandi Campagnaro.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são uma classe de medicamentos amplamente utilizados pela população por apresentarem diversas propriedades terapêuticas. No entanto, a utilização prolongada de AINEs está associada ao surgimento de úlceras gástricas por inibição das enzimas cicloxigenases (COX) 1 e 2, com consequente redução da produção de prostaglandinas que são fundamentais para a proteção do tecido gástrico. O tratamento ou profilaxia de lesões gástricas envolve o uso de medicamentos que diminuem a secreção de ácido gástrico no lúmen estomacal. Entre os medicamentos mais prescritos, destacam-se os inibidores da bomba protônica (IBP) os quais, quando utilizados a longo prazo, podem levar o indivíduo a desenvolver reações adversas assim como predispor ao aparecimento de outras doenças. Diante disso, é crescente a busca por alternativas de tratamento para úlcera gástrica e, neste contexto, destaca-se o kefir, uma bebida fermentada com características probióticas e prebióticas. O kefir apresenta diversos benefícios a quem o consome regularmente, sendo estes geralmente associados aos seus efeitos anti-inflamatório e antioxidante. Considerando que as lesões gástricas são dependentes do estresse oxidativo, nosso estudo teve como objetivo avaliar o efeito gastroprotetor do kefir de leite em modelo experimental de úlcera gástrica induzida por AINE. Para isso, foram utilizados camundongos Swiss machos (~35g) que foram aleatoriamente divididos em 3 grupos (n=8): Veículo (leite integral UHT pH 5 na dose de 0,3 mL/100g), IBP (Lansoprazol 30 mg/kg) e kefir de leite 4% (0,3 mL/100g). O tratamento foi realizado por gavagem e teve duração de 14 dias e no último dia os animais foram colocados em jejum por 12 horas. Após esse tempo foi administrada indometacina (40mg/kg, por gavagem) e 6 horas depois foi realizada a eutanásia para coleta de amostras de plasma, suco e tecido gástrico. Foram realizadas análises do pH do suco gástrico, de lesão gástrica (macro e microscopicamente), produção de muco citoprotetor e

estrutura do tecido gástrico. Além disso, nas células gástricas isoladas foram avaliadas a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), viabilidade e apoptose, além da análise do conteúdo de DNA. No plasma foram avaliadas citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e a atividade da enzima mieloperoxidase. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com kefir durante 14 dias foi capaz de prevenir lesões gástricas e aumentar a produção de muco citoprotetor. Nas células gástricas isoladas o uso do kefir foi capaz de reduzir os níveis ROS com simultâneo aumento de NO e consequente diminuição de apoptose celular. Sistemicamente, o kefir, foi capaz de reduzir níveis de TNF- α . Nossos dados mostram que os efeitos antioxidante e anti-inflamatório do kefir de leite são responsáveis pela gastroproteção observada no modelo experimental de lesão induzida por AINE.

Palavras chaves: probióticos, úlcera gástrica, estresse oxidativo, óxido nítrico, inflamação.

ABSTRACT

COCO, LARISSA ZAMBOM, M.Sc, University of Vila Velha – ES, February 2021.
MILK KEFIR PREVENTS GASTRIC INJURIES INDUCED BY THE USE OF NON-STEROID ANTI-INFLAMMATORY. Advisor: Bianca Prandi Campagnaro.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is a class of drugs widely used by the population since it has several therapeutic properties. However, the prolonged use of NSAIDs is associated with gastric ulcers by inhibition cyclooxygenase enzymes (COX) 1 and 2, leading to a reduction in the production of prostaglandins that are essential for the protection of gastric tissue. The treatment or prevention of gastric lesions involves the used of drugs that decrease the secretion of gastric acid in the stomach lumen. The proton pump inhibitors (PPIs) are a classic pharmacological therapy for the treatment of gastric ulcer. However, when used in the long term, can lead to development of adverse reactions as well as the appearance of other diseases. Therefore, is necessary to search for novel agents that have therapeutic benefits for gastric ulcer. The milk kefir is a fermented drink with probiotic and prebiotic characteristics, and that presents several benefits to those who consume it regularly. Among these benefits, we highlight the anti-inflammatory and antioxidant effects. Considering that gastric lesions are dependent on oxidative stress, our study aimed to evaluate the gastroprotective effect of milk kefir in an experimental model of gastric ulcer induced by NSAIDs. For this, male Swiss mice (~ 35g) were used and were randomly divided into 3 groups (n = 8): Vehicle (UHT whole milk pH 5 in the dose of 0.3 mL / 100g), PPI (Lansoprazole 30 mg / kg) and 4% milk kefir (0.3 mL / 100g). The treatment was for 14 days (by gavage) and on the last day the animals were fasted for 12 hours. After this period, indomethacin (40mg / kg, by gavage) was administered and 6 hours later the euthanasia was performed to collect samples of plasma, juice and gastric tissue. The analyzes of the pH of gastric juice, gastric lesion (macro and microscopically), production of cytoprotective mucus and structure of gastric tissue were performed. In addition, in the isolated gastric cells, the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), cellular viability and apoptosis and DNA content were evaluated. In the plasma was evaluated pro-inflammatory and anti-inflammatory

cytokines and the activity of the myeloperoxidase enzyme. Our results showed that pretreatment with kefir for 14 days was able to prevent gastric lesions and increase the production of cytoprotective mucus. Therefore, in isolated gastric cells, the use of kefir was able to reduce ROS levels with simultaneous increase in NO and reduction of apoptosis. At the systemic level, kefir was able to reduce levels of TNF- α . Our data show that the antioxidant and anti-inflammatory effects of milk kefir are responsible for the gastroprotection in the experimental model of NSAID-induced injury.

Keywords: probiotics, gastric ulcer, oxidative stress, nitric oxide, inflammation.

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. Fisiologia do trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é formado pela boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, reto, ânus, além de órgãos anexos (Figura 1). Este sistema é dividido em superior e inferior, apresentando como principal função a digestão de alimentos e absorção de nutrientes e vitaminas. No TGI, as contrações da musculatura lisa, denominadas peristaltismo, movimentam o bolo alimentar e são essenciais para que a digestão dos alimentos aconteça¹.

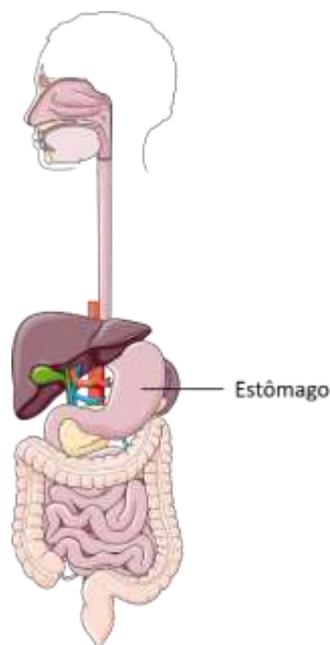
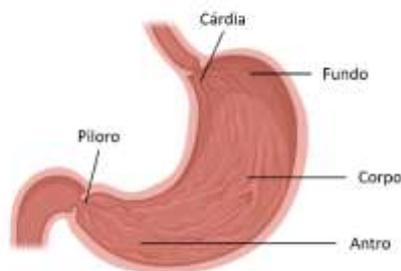


Figura 1: Sistema gastrointestinal (Criado por smart.servier.com).

Entre o esôfago e o duodeno encontra-se o estômago, um órgão muscular oco, dividido em 5 regiões: cárdia, fundo, corpo, antro e piloro² (Figura 2). As suas principais funções são o armazenamento temporário do alimento para o processo de digestão química e mecânica³. Quando o alimento entra no estômago através da cárdia, a parte superior do órgão, o corpo e o fundo do estômago relaxam, enquanto o antro (parte inferior) apresenta movimentos de contrações repetidas que auxiliam o processo de digestão através do contato do alimento com o suco digestivo, formando o quimo^{4 3}.



Created in BioRender.com bio

Figura 2: Imagem representativa do estômago e as suas regiões.

A parede do estômago apresenta característica rugosa que permite a expansão gástrica e o aumento da superfície de contato entre a parede do órgão e o alimento⁴. A parede gástrica é formada pelas camadas mucosa, submucosa, muscular externa e serosa². A mucosa gástrica é a camada mais interna formada por células epiteliais e glândulas gástricas que são responsáveis pela secreção do suco gástrico e muco². O suco gástrico é secretado principalmente na região do fundo enquanto a produção de muco é predominantemente realizada na região da cárdia⁴. A segunda camada, denominada submucosa, é formada por tecido conjuntivo denso, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos⁵. Já a terceira camada, a muscular externa, é subdividida em três: oblíqua interna, responsável pela digestão mecânica; circular média, presente na região do piloro, auxiliando na expulsão do alimento para o duodeno; e longitudinal externa que movimenta o quimo até o piloro³. Entre a camada circular média e a longitudinal externa está o plexo mioentérico que inerva as duas camadas³. A quarta camada, denominada serosa, é composta por tecido conjuntivo e se conecta ao peritônio³.

Os tipos e quantidades de glândulas na mucosa gástrica se diferenciam em cada região do estômago⁶. No corpo do estômago as glândulas oxínticas são predominantes e nelas encontra-se grande quantidade de células parietais que são secretoras de ácido clorídrico (HCl) e de fator intrínseco, células principais que secretam pepsinogênio⁷ e células secretoras de muco, denominadas células mucosas do colo, além células secretoras de grelina, histamina, serotonina somatostatina². As glândulas que são predominantes no antro do estômago são chamadas de glândulas antrais ou glândulas pilóricas que possuem células

secretoras de muco, gastrina (células G), somatostatina (células D), histamina e serotonina (enterocromafim)⁶.

O suco gástrico é fundamental para o processo de digestão alimentar, eliminação de microrganismos patogênicos e absorção de vitaminas e minerais no organismo⁶. A secreção de HCl pelas células parietais é regulada por vias neurais (acetilcolina), vias endócrinas (gastrina) e por vias parácrinas (histamina)⁷. Estas vias irão ativar os receptores H₂ (histamina), M₃ (Acetilcolina) e colecistoquinina (gastrina) e da bomba H⁺/K⁺ -ATPase. No citoplasma a água (H₂O) é dissociado em OH⁻ e H⁺. Os ions H⁺ são liberados para os canalículos das glândulas através da bomba de H⁺/K⁺ -ATPase. Já os ions OH⁻ que ainda estão presentes no citoplasma se ligam ao CO₂ que é oriundo do metabolismo celular, formando o bicarbonato HCO₃⁻, reação catalisada pela enzima anidrase carbônica, e este por sua vez é transportado para a corrente sanguínea em troca de cloreto (Cl⁻), por transporte membranar. O Cl⁻ é liberado para os canalículos através dos canais de Cl⁻ na membrana celular. Formando assim o ácido clorídrico ^{7; 8}.

1.2. Úlcera gástrica

A úlcera gástrica é uma lesão benigna de origem multifatorial que ocorre devido a um desequilíbrio entre os fatores defensivos e lesivos da mucosa gástrica⁹. Os fatores defensivos são: muco citoprotetor, bicarbonato de sódio e barreira endotelial das células da epiderme¹⁰. Dentre os fatores lesivos destacam-se o uso abusivo de álcool e tabaco, estresse emocional, infecção por *Helicobacter pylori* e uso crônico de AINEs¹¹. O dano à integridade da mucosa é proporcionalmente dependente do tempo de exposição ao agente agressor, ou seja, longos períodos de contato da mucosa gástrica com o fator lesivo acarretam injúrias mais severas podendo danificar as camadas mais profundas do tecido gástrico¹².

Um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de úlcera gástrica é o uso de AINEs¹³. No Brasil, os AINEs ocupam a terceira posição entre os fármacos mais utilizados sem prescrição médica¹⁴. Além disso, os AINEs são amplamente utilizados na população de mulheres pelo motivo de sofrerem mais e dor de cabeças e enxaquecas, além do utilizarem esses medicamentos no

período menstrual¹⁵. Os idosos principalmente entre os portadores de doenças crônicas também utilizam muito esta classe medicamentosa^{14 16}. Considerando o exposto, é evidente que o uso de AINEs é um problema de saúde pública relacionado a úlcera gástrica.

1.3. Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) x lesão gástrica

Os AINES são uma das classes de medicamentos mais utilizados no mundo devido às suas ações anti-inflamatória, analgésica e antipirética¹⁷. Esses fármacos são usados cronicamente para o tratamento de diversas doenças e condições de grande incidência como cefaleias, dores reumáticas , entre outros¹⁸. São drogas que apresentam boa biodisponibilidade e alta ligação às proteínas plasmáticas e sua metabolização hepática é realizada através de enzimas da família do citocromo P450 (CYP450), sendo que as mais importantes as CYP2C9, CYP3A4 e CYP2C8, pois são responsáveis pelo metabolismo da maioria dos AINEs¹⁷.

O mecanismo de ação dos AINEs envolve a inibição das isoenzimas COX-1 e COX-2 que são responsáveis pela produção de prostaglandinas e tromboxanos¹⁹ (Figura 3). A COX-1 é a forma constitutiva da enzima, responsável pela produção de muco que reveste o estômago promovendo assim uma barreira importante contra agressão do suco gástrico ao tecido, por isso exerce importante papel na manutenção da integridade e funcionalidade do TGI¹⁷. Já a COX-2 é a forma indutível da enzima ativada durante a inflamação por mediadores inflamatórios, como as citocinas²⁰.

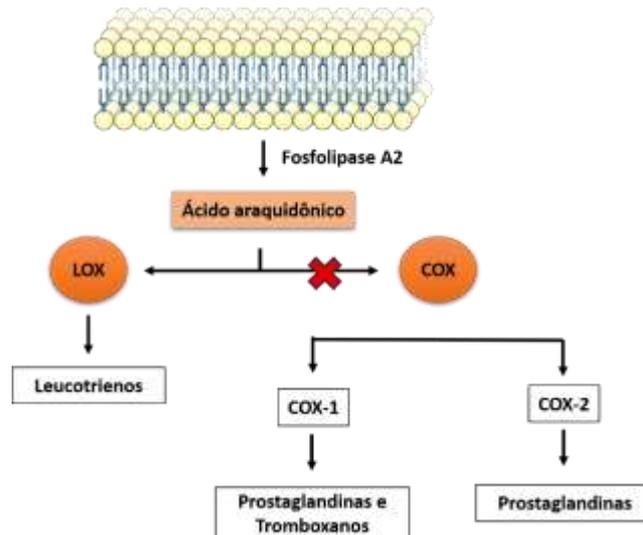


Figura 3: Mecanismo de ação dos medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais. Estes inibem a ação das enzimas cicloxigenase no qual vai diminuir a produção de prostaglandinas (Criado por smart.servier.com).

Os AINES bloqueiam a ligação do ácido araquidônico nas COXs através da ligação no sítio ativo das enzimas²¹. Entretanto, existe uma diferença entre os canais da COX-1 e da COX-2²¹. Os AINEs não seletivos têm acesso aos dois canais, enquanto os seletivos têm afinidade pela enzima COX-2²². Os não seletivos (indometacina, ibuprofeno, piroxicam etc.) apresentam mais efeitos adversos, sendo eles cardiovasculares, renais e gastrointestinais¹⁷. Estes últimos representam, por sua vez, a maior incidência com os principais sintomas relatados de irritação gástrica e o aparecimento de úlceras²⁰. Além disso, outros sintomas gastrointestinais dependentes de AINEs são: dor e desconforto abdominal, náusea e vômito, além de complicações graves, como hemorragia gástrica²³.

Além da diminuição da produção de muco, existe um prejuízo na circulação local do órgão via efeito sistêmico da protasglândina I2 e E2 que participam da regulação da microcirculação do TGI juntamente com o NO²². Além deste efeito sistêmico, os AINEs causam lesão local à mucosa, pois interagem com fosfolídeos, aumentando a permeabilidade e, conseqüentemente danificando as células do epitélio gástrico (figura 4)²². O conjunto desses fatores locais e sistêmicos são fundamentais para o desenvolvimento de irritações gastrointestinais.

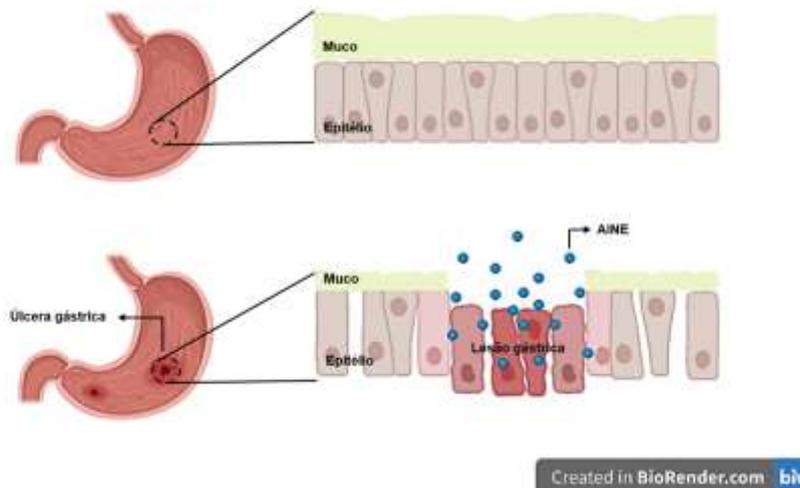


Figura 4: Imagem representativa da ação dos AINEs na mucosa gástrica. A primeira figura é relacionada a mucosa gástrica saudável e intacta, já na segunda podemos observar lesões gástricas relacionadas ao uso do medicamento.

Os danos celulares ocasionados pela citotoxicidade dos AINEs ocorrem principalmente via estresse oxidativo²⁴. Essas drogas afetam principalmente o complexo I da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria levando à produção de ROS, principalmente do precursor ânion superóxido (O_2^-) que dará origem as demais ROS, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\cdot$).¹⁷ Esse acúmulo de ROS intracelular levará a danos em macromoléculas, como proteínas, lipídeos e DNA¹⁷.

1.4. Estresse oxidativo x lesão gástrica

As ROS são produtos oriundos do metabolismo celular do oxigênio ou do nitrogênio, e fazem parte do processo fisiológico do organismo²⁵. Dentre eles destacam-se o aniôn superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH\cdot$), peróxinitrito ($ONOO^-$) e óxido nítrico ($\cdot NO$) e, além dessas, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que não é considerado um radical livre, mas é altamente reativo com macromoléculas e por isso faz parte da formação do estresse oxidativo²⁶.

Para evitar o acúmulo de ROS, as células possuem um sistema de defesa, mediado por substâncias antioxidantes, que previne danos às biomoléculas intracelulares²⁷. As principais enzimas antioxidantes são: superóxido dismutase

(SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx)²⁸. A SOD converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, a CAT e a GPx convertem o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio por mecanismos diferentes, pois para a GPx ter ação ela precisa de enzimas secundárias, enquanto a CAT age diretamente(Figura 5)²⁹.

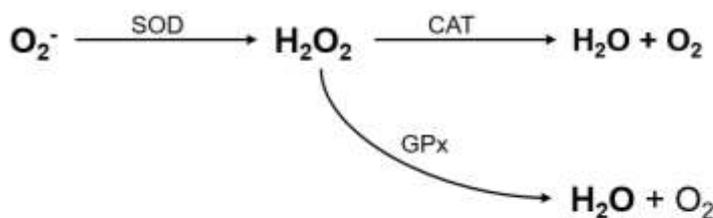


Figura 5: Reação das enzimas antioxidantes sobre as espécies reativas de oxigênio.

Quando existe um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e a produção de ROS, ocorre um aumento do estresse oxidativo levando, conseqüentemente, a danos a macromoléculas biológicas^{24 30 31}. Este desequilíbrio ocorre devido a fatores intrínsecos (inflamação) e extrínsecos (estilo de vida e uso de medicamentos) que são fundamentais para o aumento do estresse oxidativo e conseqüente desenvolvimento de doenças^{32 33 34}.

1.5. Inibidores de bomba de prótons (IBPs) x úlcera gástrica

Os IBPs inibem a secreção de ácido gástrico e são os fármacos de primeira escolha para distúrbios do TGI superior³⁵. Podem ser utilizados para fins de profilaxia ou tratamento da doença do refluxo gastroesofágico, gastrite e úlcera gástrica³⁶. Omeprazol, lansoprazol, ezomeprazol e pantoprazol são medicamentos desta classe, sendo o omeprazol pioneiro e bastante utilizado até hoje³⁶.

O mecanismo de ação dos IBPs envolve a inibição irreversível da bomba de prótons, levando a redução da produção de íons H⁺ e aumento do pH do lúmen estomacal³⁷. Além de possuir funções na digestão alimentar, o pH ácido do suco gástrico é extremamente importante para a absorção de vitaminas e

minerais, que fica prejudicada e, em longo prazo, podem levar ao aparecimento de anemia³⁸, demência³⁹, osteoporose⁴⁰ e disbiose⁴¹.

1.6. Kefir de leite

O kefir de leite é uma bebida fermentada originada do Causaso, Tibet e Mongólia⁴². O nome kefir tem origem da língua Eslava onde é conhecido como *Keif* e significa bem-estar ou viver bem⁴². A bebida ácida e de consistência viscosa, é produzida a partir de leite fermentado pelos grãos do kefir, podendo ser leite de vaca, ovelha, cabra ou búfala⁴³. Os grãos são uma massa irregular, com tamanho de 0,3 a 0,5 cm de diâmetro e que lembra o formato de pipoca ou couve-flor, com textura gelatinosa, e cor branca/perolada⁴². Os grãos são compostos, principalmente, por bactérias do ácido láctico (presentes em maior quantidade), bactérias do ácido acético e leveduras⁴⁴. Estes microrganismos encontram-se aderidos à uma matriz de polissacarídeo, denominada kefiran, no qual vivem em simbiose⁴⁵. Desta forma, os grãos de kefir de leite apresentam em sua composição 83% de água, 9-10% de kefiran e 4-5% de proteínas^{45 44 46}.

No processo de fermentação é no qual o leite fermentado é formado, dando a característica ácida à bebida⁴⁴. As bactérias do ácido láctico, por exemplo as do gênero *Lactococcus*, são responsáveis por tornar o leite fermentado levemente ácido, com pH em torno de 4,5 a 5⁴³. Esse processo é importante pois, em ambiente ligeiramente ácido as bactérias hidrolisam a lactose presente no leite em ácido láctico proporcionando um ambiente adequado para o crescimento de leveduras⁴⁷. Além disso, as leveduras do tipo fermentadoras presentes nos grãos são responsáveis pela conversão da lactose do leite em CO₂ e etanol, além de produzir vitaminas do complexo B⁴⁸. Outras leveduras não fermentadoras possuem ação lipolítica formando ácidos graxos e proteolíticas formando aminoácidos⁴⁴. Ainda, no processo de fermentação ocorre a produção de vitamina k, ácido fólico e cálcio⁴⁶.

É importante ressaltar que a composição do kefir pode variar devido a fatores como clima, temperatura, tipo de leite utilizado, modo de preparo, tipo de vasilhame utilizado para o armazenamento, entre outros⁴². Atualmente, o kefir de leite vem ganhando destaque na comunidade científica e na população devido a seus diversos benefícios à saúde humana. Nos últimos anos têm sido

demonstradas propriedades antitumorais^{49 50}, imunomoduladoras⁵¹, anti-hipertensivas^{52 53}, antimicrobiana⁵⁴, anti-hipercolesterolemica⁵⁵, anti-hiperglicemiante⁵⁶, neuroprotetora⁵⁷, hepatoprotetora⁵⁸. A literatura aponta que estes benefícios se devem, principalmente, às propriedades antioxidante e anti-inflamatória do kefir, além de seus efeitos relacionados a modulação da microbiota intestinal^{59 60 61}.

Atualmente, existem apenas 3 trabalhos na literatura que avaliaram o efeito do kefir de leite como gastroprotetor. O primeiro investigou a ação do kefir sobre a proteção da mucosa gástrica em lesões gástricas induzidas pelo uso de etanol e da irradiação⁶². O segundo investigou em modelo experimental de lesão gástrica por etanol¹⁰¹. O terceiro, do nosso grupo de pesquisa, evidenciou as propriedades antioxidantes sistêmicas do kefir no modelo de úlcera gástrica induzida por AINE³⁰. Esses trabalhos demonstraram que o kefir de leite apresenta atividades gastroprotetoras por mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes. Entretanto, ainda existem várias lacunas para a compreensão dos mecanismos responsáveis pelo efeito gastroprotetor do kefir.

2. JUSTIFICATIVA

A úlcera gástrica é uma morbidade que acomete o TGI superior e caracterizada pela presença de lesões na parede do estômago, que podem ser superficiais ou mais agressivas em que tecidos mais profundos são atingidos. Essas lesões são causadas pelo desequilíbrio dos fatores lesivos e defensivos da mucosa gástrica que levam à exposição do epitélio ao ácido gástrico. Existem inúmeras causas para o desenvolvimento e estabelecimento da doença, dentre elas o uso de AINEs se destaca, sendo a segunda causa de problemas gastrointestinais no mundo. Além disso, os AINEs estão entre os medicamentos mais utilizados no mundo, o que torna mais frequente o aparecimento da doença. Outro ponto que deve ser ressaltado é que a população que mais utiliza esses medicamentos a idosa, pois é mais suscetível a doenças crônicas inflamatórias que necessitam do uso de AINEs.

Como alternativa de prevenir/diminuir os prejuízos causados pelo uso de AINE, é indicado o uso concomitante de medicamentos que diminuam a secreção de ácido gástrico, como os IBP (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol etc.), que são vendidos sem a necessidade de prescrição médica. Entretanto, esses medicamentos apresentam efeitos adversos como diminuição de absorção de vitaminas e minerais, osteoporose, aumento de desenvolvimento de doenças neurológicas e câncer gástrico, quando usados em longo prazo. Em razão destes problemas relacionados ao uso de IBPs existe grande interesse na busca por alternativas de prevenção de úlcera gástrica relacionados ao uso de AINEs. Uma dessas alternativas é o uso de probióticos, que são conhecidos pelos inúmeros benefícios, principalmente ao TGI. Dentre estes, o kefir de leite se destaca pois, além de ser um produto de baixo custo e fácil consumo, possui propriedades prébióticas que contribuem para os benefícios relacionados ao seu consumo.

Na úlcera gástrica, existem poucos artigos que evidenciam os benefícios do uso do kefir de leite, e na prevenção de lesão gástrica por AINE encontra-se apenas um artigo que é do nosso grupo de pesquisa. Portanto, considerando que a úlcera gástrica é um problema de saúde pública, que ainda existe dificuldade na prevenção/tratamento da doença e que o kefir de leite apresenta efeitos anti-oxidante sistêmico, decidimos avaliar os efeitos gastroprotetores

locais do kefir de leite em modelo experimental de lesão gástrica induzida por AINE.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação gastroprotetora do kefir de leite em modelo animal de lesão gástrica induzida por indomentacina.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da administração do kefir de leite sobre:

- Acidez gástrica;
- Lesões gástricas;
- Citoestrutura e o muco citoprotetor no estômago;
- Produção de ROS em células gástricas;
- Biodisponibilidade de óxido nítrico em células gástricas;
- Viabilidade e apoptose de células gástricas;
- Fragmentação do DNA;
- Marcadores inflamatórios sistêmicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram camundongos machos da linhagem *swiss*, com peso corporal de 30 a 40g, originados do biotério da Universidade Vila Velha e mantidos em gaiola, com no máximo 03 animais, com água e comida *Ad libitum*, respeitando o ciclo claro/escuro (12h/12h). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA UVV: N° 524-2019) e os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes de cuidados recomendados pelo *National Institutes of Health*.

4.1 Preparação e administração do Kefir

A preparação do kefir de Leite foi realizada no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Transacional da Universidade Vila Velha (LFFT-UVV). Os grãos foram incubados com leite integral UHT (*Ultra High Temperature*) na concentração de 4% (m/v) e mantidos em temperatura ambiente por 24 horas, depois foram coados e seu produto mantido por mais 24 horas a 4°C. Por fim, foram separadas alíquotas de 1 mL em microtubos e congeladas a -20°C⁵³.



Figura 6: Preparo do leite fermentado do kefir utilizado no projeto de pesquisa (Criado por smart.servier.com).

4.2 Desenho experimental e indução de lesão gástrica

Os grupos experimentais e o modelo de indução de úlcera gástrica foi realizado de acordo com estudo prévio de nosso laboratório³⁰.

Os camundongos foram randomizados em 3 grupos. No grupo Veículo, os animais receberam leite integral UHT acidificado (pH 5 – o qual foi utilizado ácido clorídrico P.A) na dose de 0,3 mL/100g (n=08); no grupo IBP, os animais receberam 30 mg/kg de lansoprazol (UlcerStop[®]) (n=08); e no grupo kefir, os animais receberam 0,3 mL/100g de Kefir de leite 4% (n=08).

O tratamento foi realizado por via oral (gavagem) durante 14 dias e a dose foi calculada diariamente de acordo com o peso do animal. No último dia de tratamento, os animais foram colocados em jejum, individualmente, com acesso livre à água e, para evitar a cropofagia, foram utilizadas gaiolas com grades para que o animal ficasse suspenso. Após 12 horas de jejum, foi administrado o anti-inflamatório indometacina 40mg/kg via oral (gavagem), e depois de 6 horas foi realizada a eutanásia, com sobredose de tiopental sódico (60mg/kg, i.p.) para coleta de amostras de plasma, suco gástrico e estômago.

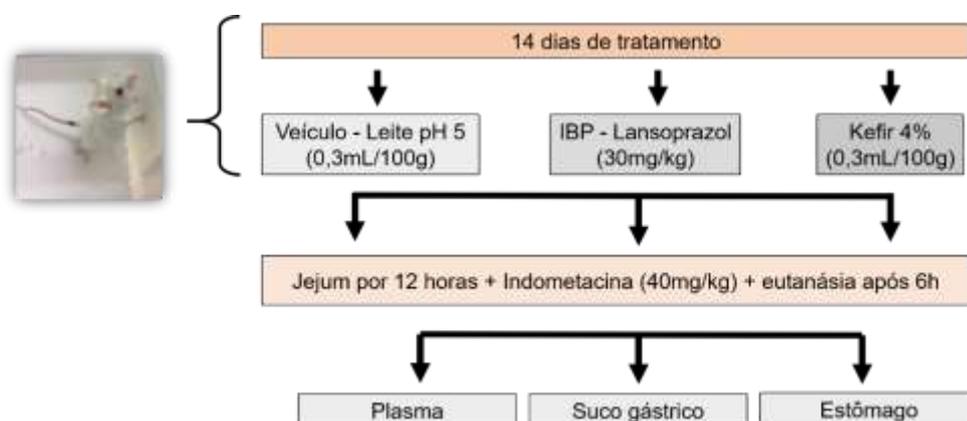


Figura 7: Desenho experimental do projeto de pesquisa.



Figura 8: Fotografia representativa do camundongo Swiss (1 por gaiola) em jejum, após o 14º dia de tratamento. Para evitar a copografia foram utilizadas grades no qual os animais ficaram suspensos do fundo da gaiola.

4.3 Análise do pH do suco gástrico

Após eutanásia, foi realizada perfusão com PBS (*phosphate-buffered saline*) e o estômago foi removido. Através de um corte na região cárdia e outro no piloro e com auxílio de uma agulha e seringa contendo 1 mL de soro fisiológico 0,9%, o suco gástrico foi retirado, centrifugado (50 g por 10 minutos), o sobrenadante coletado e o pH determinado utilizando um pHmetro de bancada (Kasvi K39-1014B).

4.4 Análise macroscópica

Para analisar a área de lesão gástrica, o estômago foi aberto através da curvatura maior, lavado com PBS para retirada de resíduos de conteúdo gástrico, colocado entre duas placas de vidro com papel milimetrado e fotografado com distância padronizada com auxílio de um estúdio fotográfico (Pop Up Studio). A análise macroscópica foi realizada através programa *ImageJ* (*Image-J* 1.35 d, USA) de domínio público (Figura 9) e o parâmetro analisado foi área de lesão gástrica em mm² ³⁰.

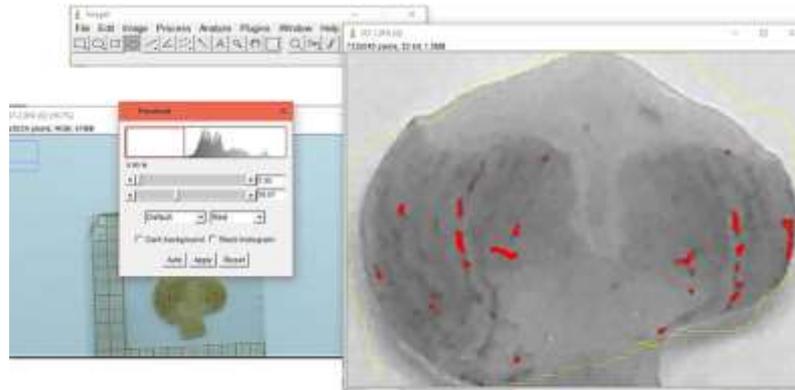


Figura 9: Análise da lesão gástrica no programa *ImageJ* (*Image-J* 1.35 d, USA) de domínio público.

4.5 Escore de lesão gástrica

Depois dos estômagos serem fotografados, o grau de lesão gástrica foi determinado a cegas de acordo com os seguintes parâmetros⁵⁷:

- Nível 0 - Mucosa normal;
- Nível 1 - lesão vascular;
- Nível 2 - uma ou duas lesões;
- Nível 3 - lesões graves;
- Nível 4 - muitos ferimentos graves;
- Nível 5 - mucosa cheia de lesões.

4.6 Índice de proteção:

Para avaliar o índice de proteção gástrica dos tratamentos IBP e kefir foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Área de úlcera (AINE)} - \text{Área de úlcera (Tratamento)}}{\text{Área de úlcera (AINE)}} \times 10 = \% \text{ de prevenção}$$

Sendo a área ulcerada dada em mm² e determinada através do programa *ImageJ* (*Image-J* 1.35 d, USA)⁶³.

4.7 Análise estrutural e quantificação de mucocitoprotetor no estômago

A análise histológica do estômago foi realizada em colaboração com o Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), coordenado pelo Prof Breno Valentim Nogueira.

Após a eutanásia e perfusão com solução paraformaldeído 4%, o estômago foi retirado através de um corte na região cárdia e no piloro, aberto através da curvatura maior e imerso em solução paraformaldeído 4% até a preparação das lâminas. O tecido foi emblocado com parafina e posteriormente cortado em segmentos de 5µm. Para a avaliação estrutural do tecido, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e para quantificação do mucocitoprotetor foram coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) com contracoloração de hematoxilina. Logo, as lâminas foram fotografadas em microscópio óptico Olympus AX70 com sistema de aquisição de imagens câmera Zeiss modelo AxioCam ERc5S.

Foram analisados a cegas dois parâmetros: um estrutural, através do escore de lesão epitelial, edema na camada submucosa e presença de células inflamatórias na submucosa; e outro funcional, através da presença de mucocitoprotetor estomacal.

Para avaliar o escore de erosão epitelial acatamos os seguintes parâmetros:

- Nível 0: sem alterações superficiais do tecido;
- Nível 1: Alterações superficiais do tecido;
- Nível 2: Alterações discretas nas estruturas teciduais e mudanças celulares;
- Nível 3: Alterações avançadas em toda estrutura do tecido⁶⁴.

Para avaliar o edema na submucosa e presença de células inflamatórias acatamos os seguintes parâmetros:

- Nível 0: Negativo;
- Nível 1: Fraco;
- Nível 2: Moderado;

– Nível 3: Forte⁶⁵.

4.8 Análise estrutural do epitélio gástrico através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A MEV do estômago foi realizada em colaboração com o Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), coordenado pelo Prof Breno Valentim Nogueira.

Após a eutanásia e perfusão, o estômago foi retirado através de um corte na região cárdia e no piloro, aberto através da curvatura maior e acondicionado em microtubo de 1,5 mL contendo solução de fixação gelada (2,5% de Glutaraldeído, 2% de Formaldeído e 0,1 M de Tampão cacodilato) até o processamento do tecido.

Os órgãos passaram pelo processo de três lavagens com tampão cacodilato 0,1M (pH 7,2) sendo 10 minutos cada limpeza. Depois, as amostras foram desidratadas em banhos de etanol em temperatura ambiente, nas concentrações de etanol 30%, 50%, 70%, 90% por 10 minutos cada, e por último na concentração de 100% por 30 minutos. Após isso as amostras foram fixadas com uma fita dupla face de carbono em um *stub* (cilindro metálico) de alumínio (*Electron Microscopy Sciences, Washington, USA*) e secagem foi realizada no ponto crítico de CO₂ (Autosandri-815, Tousimis) durante 40 minutos, seguido de revestimento com 10 nm de ouro puro em um aspersor a vácuo (Desk V, Denton Vacuum) por 15 minutos.

A fotografia e análise da estrutura do epitélio gástrico foi realizada a cegas no microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM-6610 LV) ⁶⁶.

4.9 Preparo de amostras

4.9.1 Isolamento das células do estômago

As células gástricas foram isoladas seguindo as orientações de ⁶⁷, mas com adaptações. Para isso, o estômago foi triturado delicadamente com o auxílio de uma tesoura cirúrgica juntamente com 1 mL de solução de digestão (0,03% de colagenase tipo 1; 0,1% de proteinase K) e foi incubado a 37°C por 1 hora, e

após esse tempo foi passado por uma malha de separação de celular e centrifugado a 50 g por 3 minutos, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de solução tampão HBSS 1x e centrifugou novamente a 2600 g por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 300 µL de solução de armazenamento (95% de soro fetal bovino e 5 % de DMSO) e armazenadas no -20°C por 24 horas e depois no Ultrafreezer -80°C até a análise.

4.9.2 Preparo das amostras de plasma

Após o animal ser anestesiado (tiopental sódico 60mg/kg, i.p.) , foi realizada uma incisão do abdome até o tronco, logo após foi feito um corte do diafragma para exposição do coração e com a ajuda de uma seringa hipodérmica descartável de 1 mL com agulha (27,5 G1/2") com *flush* de EDTA (0,33 mol) o sangue foi retirado no ventrículo direito, adicionado em microtubos e logo centrifugado a 400 g por 10 minutos e por fim o plasma foi separado em outro microtubo e congelado no Ultra Freezer – 80°C até análise.

4.10 Determinação dos níveis de ROS por citometria de fluxo

A análise do estresse oxidativo foi realizada em células gástricas isoladas, como descrito acima e a quantificação das ROS foram realizadas através do citometro de fluxo FACSCanto II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EUA*) no Laboratório de Fisiologia Translacional (LFT) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Foi quantificado os parâmetros das espécies ânion superóxido (O_2^-) através dos marcadores dihidroetídeo (DHE), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através do marcador 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), radical hidroxila (OH^-) através do marcador hidroxifenilfluoresceína (HPF) e óxido nítrico (NO) através do marcador diaminofluoresceína (DAF).

As células foram encubadas com 160 µmol/L de DHE, 20 µmol/L de DCF, 10 µmol/L de HPF por 30 minutos e 2 µmol/L de DAF por 180 minutos a 37°C e as amostras foram analisadas até chegarem a 1000 eventos. Todo o

experimento foi realizado em ambiente escuro. O programa utilizado para aquisição dos dados foi FCS *Express software*^{30; 68}.

4.11 Determinação de apoptose e viabilidade celular

A determinação de viabilidade e apoptose celular nas células gástricas isoladas foi realizada através do citômetro de fluxo FACSCanto II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EUA*) no LFT da UFES.

As células foram suspendidas em solução tampão e incubadas com anexina V e PI por 15 minutos a 37° C. A análise foi realizada a partir dos marcadores anexina V conjugada a fluoresceína e do corante intracitoplasmático iodeto de propídeo (PI), através do kit comercial (*FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen, Becton Dickinson, USA*) e os dados foram quantificados através do FCS *Express software* e avaliado a porcentagem de células positivas^{30; 68}.

4.12 Análise do conteúdo de DNA

A análise do conteúdo de DNA em células gástricas isoladas foi realizada através do citômetro de fluxo FACSCanto II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EUA*) no no LFT da UFES.

As células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 200 g por 10 minutos, procedimento esse realizado duas vezes. Logo após as células foram incubadas com solução de coloração (200µL de RNase A (20mg / mL), 800µL de PI (500µg / mL), 20µL de Triton X-100, Qsp 20mL de PBS1x) por 30 minutos a 4 ° C e centrifugadas a 200 g por 10 minutos (duas vezes). A análise dos dados foi realizada por meio do software FACSDiva e foram avaliadas a presença de DNA fragmentado (fase sub-G0). Protocolo adaptado de Campagnaro e colaboradores⁶⁸.

4.13 Atividade da mieloperoxidase plasmática

A análise da atividade da mieloperoxidase sistêmica foi realizada no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

A atividade da mieloperoxidase foi avaliada no plasma. 12µl plasma e 236 µl de solução o-dianisidina foram adicionados em microplaca de 96 poços. A leitura foi realizada a 460nm por espectrofotômetro (Multidetecção Híbrido Synergyx H1) nos tempos de 0 min e 15 minutos. O resultado foi expresso por unidade/mg de proteína. A quantificação de proteína foi realizada pelo método Bradford⁶⁹.

4.14 Níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias

A determinação plasmática das citocinas anti-inflamatória (IL-10) das citocinas pró-inflamatórias (IL-6 eTNF-α) foi realizada através do citômetro de fluxo FACSCanto II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EUA*) no LFT da UFES e foi realizada de acordo com as instruções do kit *Cytometric Bead Array Mouse BD Biosciences*. Os dados foram analisados usando o software FACSDiva (BD) e FCAP Array (BD) software. Através da curva padrão de citocinas usando o software FCAP Array (BD). Os resultados foram expressos em pg/mL⁵⁷.

4.15 Análise estatística

O teste de normalidade foi avaliado utilizando teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram analisados com ANOVA uma via, seguido de teste *post hoc* de Tukey. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de *post hoc* de Dunn foi utilizado para as análises de escores histológico. Foi utilizado o software Prisma (Prisma 8.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média ± EPM e as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise macroscópica

A área de lesão gástrica dos grupos experimentais foi avaliada macroscopicamente. A figura 10A representa a fotografia típica de cada grupo experimental. Nestas observamos que no grupo Veículo os animais apresentaram maior área de lesão gástrica quando comparado com os grupos IBP e Kefir. Dados esses que confirmamos através da análise macroscópica da área de lesão gástrica observado na figura 10B, no qual o grupo veículo apresentou área de lesão ($20,78 \pm 6,363 \text{ mm}^2$) superior ao pré-tratamento com IBP ($12,40 \pm 2,773 \text{ mm}^2$) e kefir ($6,363 \pm 1,018 \text{ mm}^2$) durante 14 dias, mostrando o efeito gastroprotetor deste probiótico.

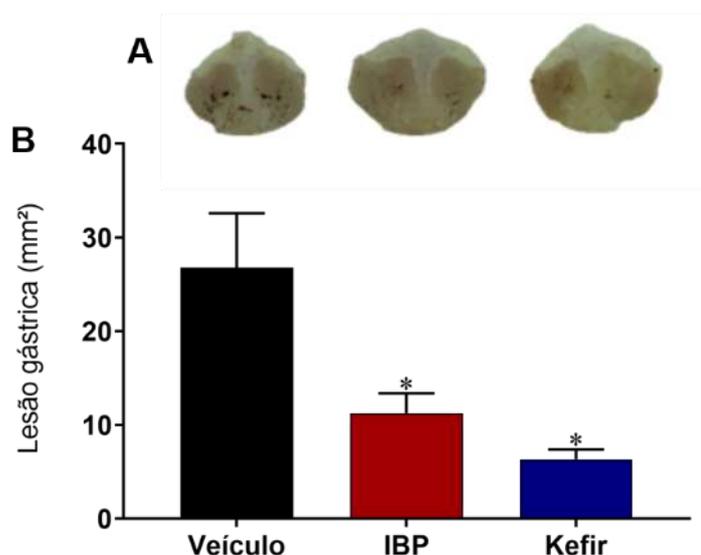


Figura 10: Painel superior(A): fotografias representativas dos estômagos de animais selecionados de cada grupo experimental. Gráfico (B): área de lesão gástrica determinada com auxílio do *software* Image J. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0.05$ vs. controle (ANOVA-1 uma via, seguido de *post hoc* de Tuckey).

5.2 Escore de lesão, índice de prevenção e análise do pH gástrico

Como pode ser observado na Tabela 1, os animais do grupo Veículo apresentaram maior escore de lesão gástrica quando comparado com os animais dos grupos IBP e Kefir. De forma complementar, nossos dados mostram

que a administração tanto de IBP como de kefir foi capaz de prevenir o desenvolvimento de lesões gástricas. Por outro lado, é importante mostrar que não houve diferença nos valores de pH do suco gástrico entre os grupos experimentais.

Tabela 1: Escore de lesão gástrica, índice de prevenção de lesão (%) e pH gástrico.

| Grupos | Escore de lesão gástrica | Índice de prevenção (%) | pH gástrico |
|----------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| Veículo | 4,0 ± 0,3 | 0,00 ± 24,98 | 4,91 ± 0,42 |
| IBP | 3,0 ± 0,2 | 64,33 ± 6,31* | 4,35 ± 0,37 |
| Kefir | 3,0 ± 0,3 | 69,39 ± 4,90* | 4,55 ± 0,25 |

Tabela 1: Dados de escore de lesão gástrica, índice de prevenção de lesão e pH gástrico expressos como média ± erro padrão da média. *p < 0.05 vs. veículo (ANOVA-1uma via, seguido de post hoc de Tuckey).

5.3 Citoestrutura do estômago

As figuras 11 A, B e C apresentam fotomicrografias típicas obtidas do tecido gástrico de animais de cada grupo experimental. A análise destas imagens mostra a presença de erosões epiteliais, assim como a ruptura do tecido epitelial nos grupos Veículo (Figura 11A) e IBP (Figura 11B). No grupo Kefir, não foi observada a presença de erupções nem de ruptura do tecido epitelial e, além disso, a administração de kefir foi capaz de preservar a estrutura glandular do tecido gástrico (Figura 11C), o que não ocorreu com a administração de leite acidificado nem de IBP.

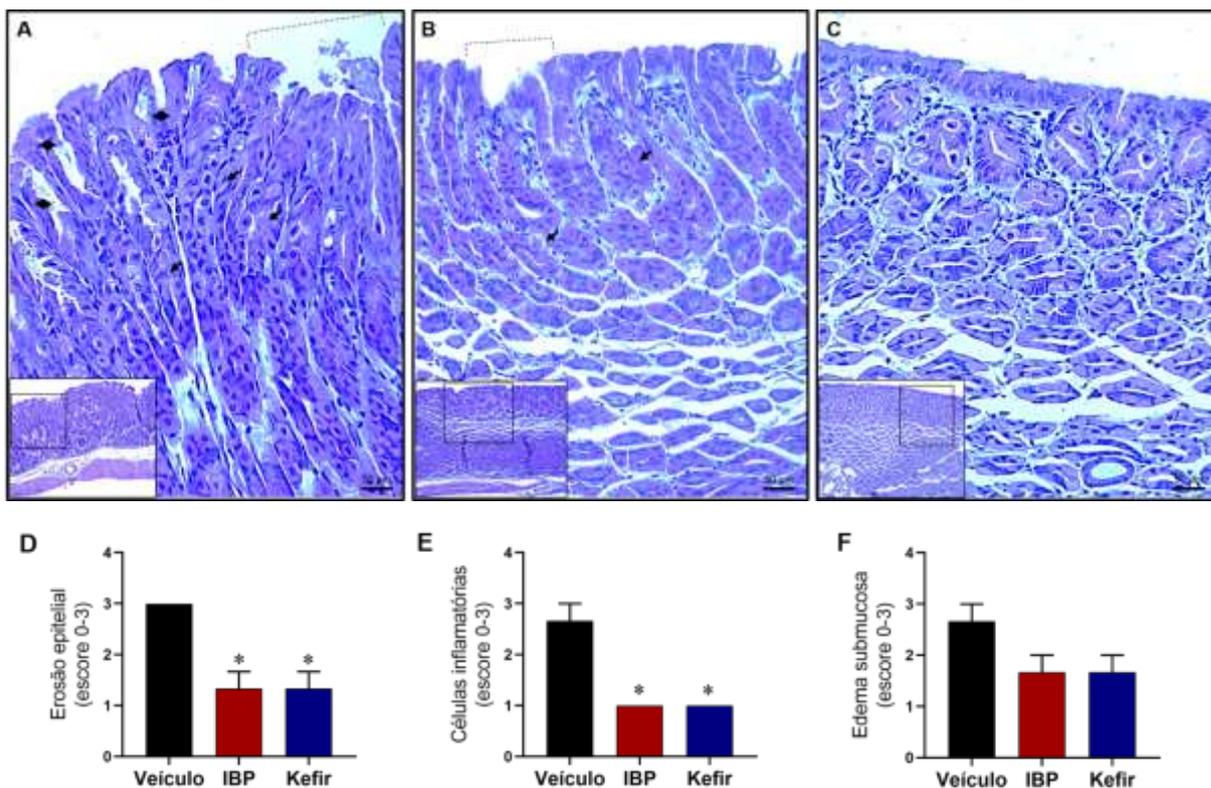


Figura 11:Imagens histopatológicas do epitélio gástrico dos grupos experimentais Veículo (A), IBP (B) e Kefir (C). As lesões gástricas são representadas por tracejado, a ruptura da camada epitelial é representada por losangos e as setas representam as glândulas gástricas. Imagens obtidas por objetivas de 10x e 20x. Gráficos de barras dos escores histológicos representativos da erosão epitelial (D), células inflamatórias (E) e edema da submucosa (F). Dados expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0.05$ vs. Veículo. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (ANOVA-1 via) seguido de *post hoc* de Dunn.

As figuras 11 D, E e F apresentam o escore obtido através da análise histopatológica da estrutura do tecido gástrico. O pré-tratamento com kefir de leite foi capaz de atenuar a erosão epitelial (11D) e presença de células inflamatórias (11E) semelhantemente ao IBP. No entanto, na análise de edema da submucosa (11F) não houve diferença significativa dos tratamentos comparado com o veículo.

A produção de muco citoprotetor foi avaliada em cortes histológicos do estômago corados com PAS (Figura 12). A análise das fotomicrografias mostra, além de muitas lesões ulcerativas, redução importante na camada de muco citoprotetor no estômago dos animais do grupo Veículo (Figura 12A). No grupo IBP (Figura 12B), apesar da presença de algumas lesões ulcerativas, é possível notar que a camada de muco está preservada. O grupo Kefir (Figura 12C),

apresentou camada de muco citoprotetor mais desenvolvida, quando comparado aos outros grupos, confirmando o efeito gastroprotetor deste simbiótico.

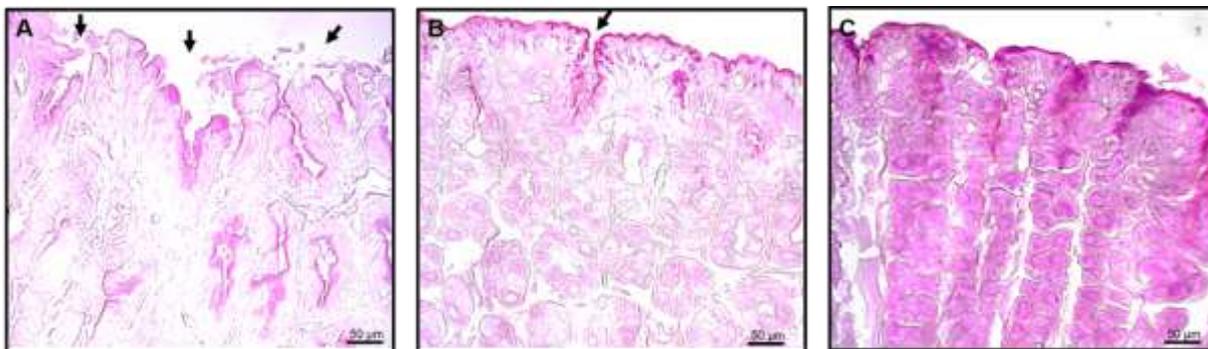


Figura 12: Imagens histopatológicas do epitélio gástrico corados com PAS para avaliar a produção de muco citoprotetor dos grupos experimentais Veículo (A), IBP (B) e Kefir (C). As lesões gástricas são representadas por setas pretas e a produção de muco é representado através da intensidade da coloração. Imagens obtivas por objetivas 20x.

5.4 Avaliação estrutural do epitélio gástrico por MEV

Para avaliar a estrutura do epitélio gástrico de animais dos grupos experimentais, foi realizada MEV da superfície mucosa do estômago (Figura 13). No grupo Veículo (Figuras 13A1 e A2) pode ser observado um desarranjo do epitélio e das fossetas gástricas devido à erosão celular, caracterizando perda celular e dano epitelial. No grupo IBP (Figuras 13B1 e B2) observa-se ligeira descamação do epitélio gástrico com leve dano epitelial. A estrutura das fossetas gástricas está preservada. No grupo Kefir (Figuras 13C1 e C2), a topografia epitelial indica uma boa morfologia, com arranjo regular de células epiteliais sem erosões, com fossetas gástricas preservadas e ligeiramente alargadas, além de proliferação de células epiteliais.

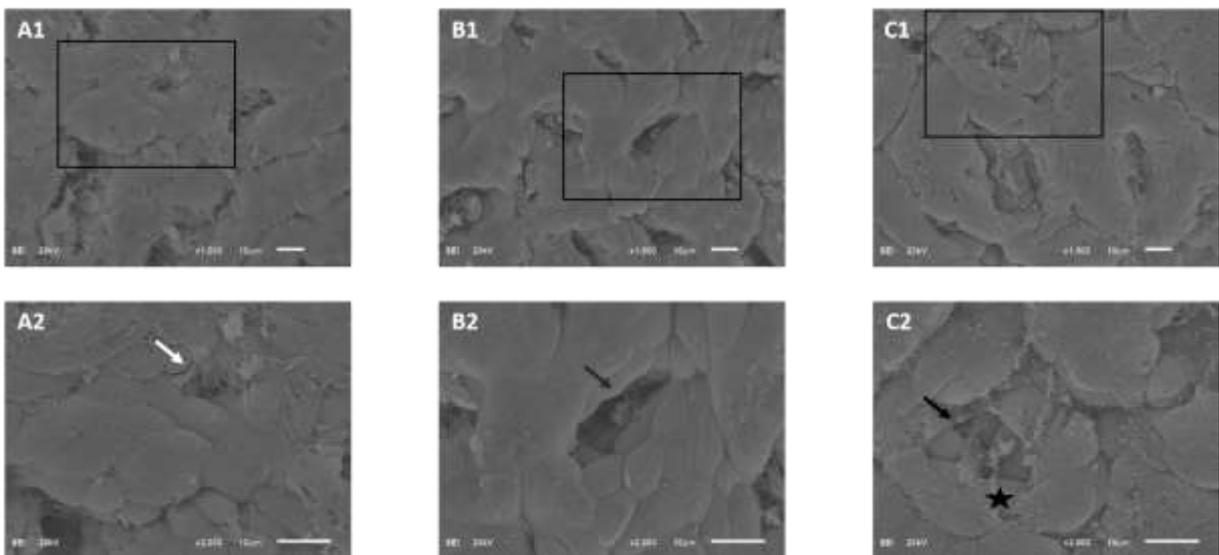


Figura 13: Microfotografias obtidas por MEV em objetivas de 1000x (Figuras A1, B1 e C1) e 2000x (Figuras A2, B2 e C2). A: Veículo, B: IBP e C: Kefir. Seta branca representa lesão gástrica, seta preta representa glândulas gástricas e estrela representa a camada extra de tecido epitelial da mucosa.

5.5 Análise dos níveis de ROS/NO em células gástricas

Após verificar que a administração de kefir foi capaz de prevenir o desenvolvimento de lesões no epitélio gástrico, decidimos avaliar se esta proteção estava relacionada ao efeito antioxidante deste probiótico. Para isso, determinamos por citometria de fluxo os níveis de $\cdot O_2^-$, H_2O_2 e $ONOO^-/\cdot O^-$. Como pode ser observado na figura 14A, nos animais que receberam como pré-tratamento Veículo houve aumento dos níveis de O_2^- ($3235 \pm 105,9$ a.u), enquanto nos grupos que receberam IBP ($1707 \pm 100,8$ a.u) e Kefir ($1635 \pm 93,45$ a.u) estes níveis foram diminuídos. Na figura 14B observamos que no grupo experimental que recebeu pré-tratamento com Veículo ($1719 \pm 76,79$ a.u) e IBP ($1745 \pm 64,07$ a.u) apresentaram níveis superiores de H_2O_2 , enquanto nos animais que receberam pré-tratamento com Kefir ($1068 \pm 57,14$ a.u) estes níveis foram atenuados. Ao avaliar a produção de $ONOO^-/\cdot OH^-$ (Figura 14C) é possível observar que os animais que receberam Veículo ($1433 \pm 55,76$ a.u) como pré-tratamento apresentaram níveis superiores desta ROS. No grupo tratado com IBP ($1123 \pm 26,81$ a.u) estes níveis foram atenuados. No entanto, nos animais que receberam kefir os níveis da produção de $ONOO^-/\cdot OH^-$ foram inferiores

quando comparados com os demais grupos. O que comprova a ação antioxidante do kefir de leite nas células gástricas. A figura 14D mostra a biodisponibilidade de NO de células gástricas isoladas e, é notório observar que nos animais que receberam pré-tratamento com veículo ($167,5 \pm 7,843$ a.u) e IBP ($197 \pm 5,183$ a.u) a biodisponibilidade de NO foi diminuída quando comparadas com os animais que receberam Kefir ($480,7 \pm 18,97$ a.u).

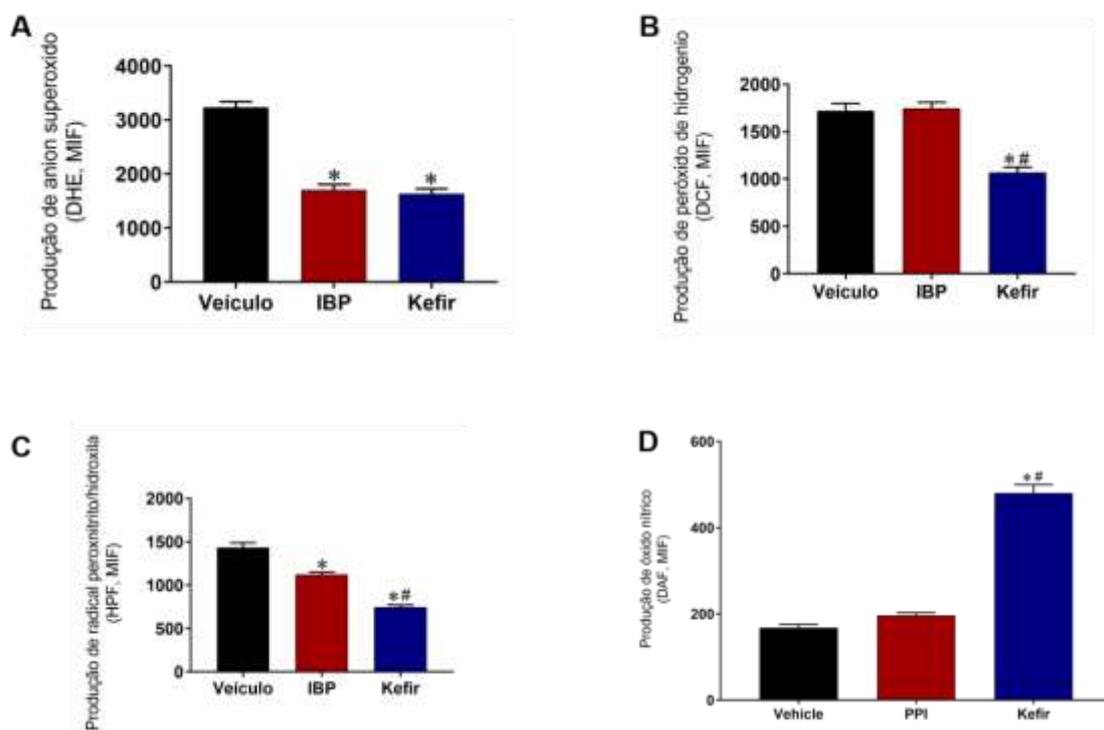


Figura 14: Análise da produção das ROS O_2^- (A), H_2O_2 (B), $ONOO^-$ (C) e NO (D) em células gástricas isoladas. Os resultados são expressos pela média \pm erro padrão da média. * $p < 0.05$ vs. Controle. ** $p < 0.05$ vs. IBP (ANOVA-1 uma via, seguido de *post hoc* de Tuckey).

5.6 Avaliação da viabilidade e apoptose celular em células gástricas

Após confirmar que o kefir apresenta efeito antioxidante em células gástricas, decidimos verificar se este efeito exercia influência sobre a viabilidade (Figura 15A) e apoptose (Figura 15B) de células gástricas. Para isso, verificamos apoptose e viabilidade celular utilizando como marcadores anexina V e iodeto de propídeo. Os animais do grupo Veículo apresentaram aumento de apoptose ($24,6 \pm 2,1\%$) com simultânea diminuição de viabilidade celular ($74,4 \pm 2,2\%$).

Contrariamente, os animais dos grupos IBP e Kefir apresentaram aumento de viabilidade celular (IBP: $87,4 \pm 1,4$; Kefir: $91,6 \pm 1,2$ %) e diminuição de apoptose (IBP: $11,5 \pm 1,0$; Kefir: $7,4 \pm 1,1$ %) quando comparados ao grupo Veículo

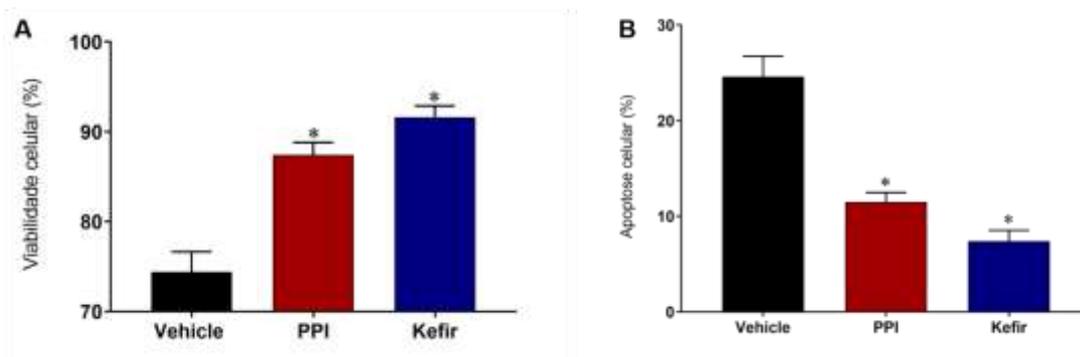


Figura 16: Avaliação do apoptose (A) e viabilidade (B) celular em células gástricas isoladas. Os resultados são expressos pela média \pm erro padrão da média. * $p < 0.05$ vs. controle (ANOVA-1 uma via, seguido de *post hoc* de Tuckey).

5.7. Análise do conteúdo do DNA em células gástricas

Após confirmar que o efeito gastroprotetor do kefir foi capaz de diminuir a apoptose de células gástricas, decidimos avaliar se este simbiótico apresentaria efeito antígeno-tóxico local. Para isso, determinamos o conteúdo de DNA em células gástricas isoladas através da marcação com iodeto de propídeo e quantificação por citometria de fluxo através da determinação da quantidade de células na fase sub-G0 do ciclo celular. Como apresentado na Figura 17A, os animais do grupo Veículo ($3,2 \pm 0,2$ %) apresentaram maior quantidade de células na fase subG0 quando comparo aos animais do grupo IBP ($2,1 \pm 0,1$ %) e Kefir ($1,7 \pm 0,1$ %), caracterizando potencial efeito antígeno-tóxico do kefir.

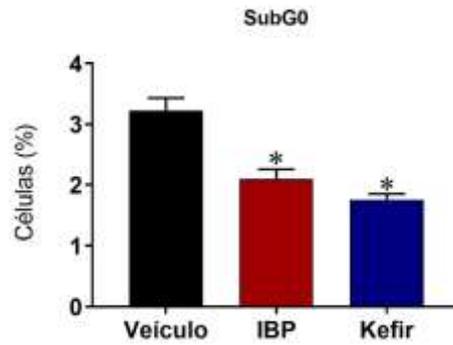


Figura 15: Avaliação conteúdo celular (fases Sub G0) das células gástricas isoladas dos grupos experimentais. Os resultados são expressos pela média \pm erro padrão da média. * $p < 0.05$ vs. controle (ANOVA-1 uma via, seguido de *post hoc* de Tuckey).

5.7 Atividade da mieloperoxidase sistêmica

Após confirmar que o efeito gastroprotetor do kefir estava diretamente relacionado à sua ação antioxidante, decidimos avaliar se a administração deste simbiótico poderia contribuir para a proteção do tecido gástrico através de sua ação anti-inflamatória. Para isso, avaliamos a atividades da enzima mieloperoxidase de maneira sistêmica. Nossos dados mostram que não houve diferença na atividade da enzima mieloperoxidase no plasma dos animais dos diferentes grupos experimentais submetidos à lesão gástrica induzida por AINE (Veículo: $0,042 \pm 0,012$; IBP: $0,050 \pm 0,011$; Kefir: $0,040 \pm 0,010$ u.a/mg de proteína).

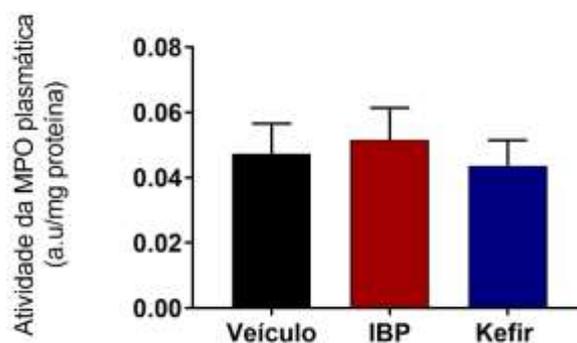


Figura 16: Atividade da mieloperoxidase no pré-tratamento entre os grupos experimentais. Os resultados são expressos pela média \pm erro padrão da média. * $p < 0.05$ vs. controle (ANOVA-1 uma via, seguido de *post hoc* de Tuckey).

5.8 Níveis plasmático de citocinas inflamatórias

Em seguida, para confirmar o resultado obtido com o ensaio da mieloperoxidase, decidimos avaliar os níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias. Para isso, utilizamos a técnica de CBA e os dados estão apresentados na Figura 19. Podemos observar na figura 17A e B que no modelo experimental de lesão gástrica por indometacina, os pré-tratamentos com leite acidificado, IBP e kefir não foram capazes de alterar os níveis plasmáticos de IL-10 (Veículo: $24,9 \pm 3,2$; IBP: $(23,5 \pm 3,9$; Kefir: $30,2 \pm 2,7$ pg/mL) nem de IL-6 (Veículo: $47,2 \pm 10,1$; IBP: $(31,2 \pm 7,0$; Kefir: $39,3 \pm 6,3$ pg/mL). Entretanto, quando avaliamos os níveis plasmáticos de TNF- α (Figura 17C), observamos diminuição nos grupos IBP ($38,8 \pm 3,0$ pg/mL) e Kefir ($34,7 \pm 4,9$ pg/mL) quando comparados com o grupo Veículo ($56,2 \pm 5,5$ pg/mL)

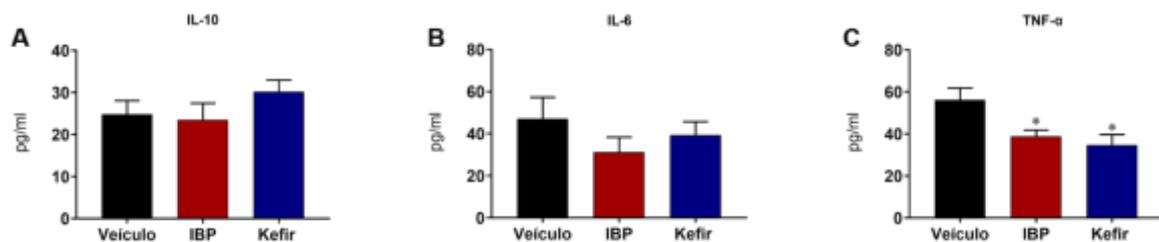


Figura 17: Níveis de plasmáticos da citocina anti-inflamatória IL-10 (A) e das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (B) e TNF- α (C) dos grupos experimentais. Os resultados são expressos pela média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs. controle (ANOVA-1 uma via, seguido de *post hoc* de Tuckey).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o pré-tratamento com kefir de leite durante 14 dias foi capaz de prevenir úlcera gástrica em modelo experimental de lesão gástrica induzida por indometacina. Nossos resultados demonstraram que o kefir de leite preservou o tecido gástrico estrutural e funcionalmente. Além disso, demonstramos que o efeito gastroprotetor do kefir foi mediado pela sua propriedade antioxidante, reduzindo a produção de ROS e aumentando a biodisponibilidade de NO. Com isso, observamos aumento de viabilidade de células gástricas, redução de apoptose celular e de fragmentação do DNA. Desta forma, podemos sugerir que a administração do kefir apresenta ação antioxidante, anti-apoptótica e anti-genotóxica, sendo essas responsáveis diretamente pelo efeito gastroprotetor do kefir.

Sabe-se que distúrbios do TGI estão fortemente relacionados à utilização crônica de AINE, sendo que o desenvolvimento de úlceras gástricas é o principal fator de risco associado ao uso desta classe de fármacos^{70; 71; 72}. Os AINEs atuam localmente em contato direto com o lúmen do TGI e sistemicamente inibindo as enzimas COX 1 e COX 2, o que conseqüentemente diminui a produção de prostaglandinas que, por sua vez, são fundamentais para a proteção do TGI²². Estas ações locais e sistêmicas em conjunto são prejudiciais para a defesa e cicatrização da mucosa, ocasionando lesões gástricas⁷¹.

Em modelo experimental de lesão gástrica, o uso de indometacina é considerado padrão para indução de úlceras^{73 74 30 31}. Como esperado, o nosso modelo experimental apresentou lesões gástricas, confirmando assim a eficácia do modelo experimental escolhido para o presente trabalho. Os IBPs, como o lansoprazol são fármacos de escolha para a prevenção ou tratamento de distúrbios gastrointestinais, entretanto seu uso tem sido associado ao aparecimento de doenças, como demência, anemia, osteoporose e, inclusive a recorrência de úlceras gástricas³⁶. Visando a redução desses efeitos adversos, pesquisadores do mundo todo vêm investigando formas alternativas e eficazes para a prevenção e/ou tratamento de lesões gástricas, condição está bastante prevalente na população.

A literatura científica mostra que o uso de produtos naturais como a Spirulina⁷⁵, óleo essencial de açafrão⁶³, sementes de abacate⁷⁶, óleo essencial

de majericão⁷⁷, probióticos⁷⁸ e o kefir de leite^{30 62} apresentam efeitos gastroprotetores. No presente estudo, a administração de kefir de leite 4% (0,3mL/100g) por 14 dias foi capaz de prevenir o desenvolvimento de lesões gástrica, confirmando o efeito gastroprotetor desse alimento. De forma semelhante, outros estudos demonstraram a ação preventiva da administração de kefir contra o desenvolvimento de úlceras gástricas^{30; 62 103}.

Em 2015, Fahmy e colaboradores⁶² investigaram o efeito do kefir sobre lesões gástricas induzidas por etanol e radiação gama. Neste estudo os autores observaram que o pré-tratamento com kefir de leite foi capaz de reduzir as lesões gástricas⁶². Estudo recente do nosso grupo de pesquisa, publicado em 2018, também corrobora os dados obtidos no presente trabalho, confirmando o efeito gastroprotetor do kefir em modelo experimental de lesão gástrica induzida por indometacina em camundongos³⁰.

Além disso, estudo realizado por Rodrigues e colaboradores¹⁰¹ em que foi avaliado o efeito gastroprotetor do kefir em modelo de lesão gástrica induzida por etanol, também demonstrou comprovada ação gastroprotetora deste probiótico. Visando complementar os dados referentes à gastroproteção, no presente observamos o índice de prevenção de lesão gástrica, que confirmou o efeito lesivo do uso de AINE e evidenciou o efeito protetor do IBP assim como do kefir.

Estudos apontam que o consumo de alimentos probióticos é responsável por diversos benefícios ao organismo, principalmente para o TGI⁷⁹. Especificamente na prevenção de lesões gástricas, alguns autores demonstram os benefícios do kefir em modelo animal de lesão induzida por etanol e AINE^{79 80}. Oliveira e colaboradores⁸¹ e Sun e colaboradores⁸² evidenciaram a gastroproteção da administração do probiótico *Lactobacillus reuteri* em modelo de lesão gástrica induzido por etanol. Dharmani e colaboradores⁸³ comprovaram a gastroproteção do probiótico VSL#3 composto por uma variedade de microrganismos (*Lactobacilos acidophilus*, *Lactobacilos bulgaricus*, *Lactobacilos casei*, *Lactobacilos plantarum* *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* e algumas espécies de *Streptococcus species*) em modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético.

Em relação uso do kefir de leite na úlcera gástrica induzida por indometacina, Barboza e colaboradores³⁰ utilizaram os grãos que o presente

estudo utilizou. Estes foram analisados por Friquez e colaboradores⁵³, em 2015 e foram encontradas as seguintes bactérias: *Acetobacter aceti*, *Acetobacter* sp, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc* spp, *Lactobacillus kefiranofaciens*, além das leveduras *Candida famata* e *Candida krusei*.

Na lesão gástrica, a camada mucosa é a primeira a ser afetada pelos agentes lesivos. Desta forma, em modelos experimentais de lesão gástrica é importante avaliar estruturalmente o tecido gástrico. Nossos resultados histológicos evidenciaram que o pré-tratamento com o kefir além de prevenir o aparecimento de lesões epiteliais, foi capaz de preservar as estruturas glândulares e de manter a produção de muco. Além disso, também confirmamos esses resultados através de microscopia eletrônica. A MEV permitiu visualizar com mais detalhes que o uso do kefir de leite foi capaz de preservar o tecido gástrico, devido ao aparecimento de uma camada extra de células epiteliais, garantindo maior proteção ao tecido. Desta forma, o presente estudo é o primeiro a demonstrar a MEV do efeito gastroprotetor da administração de kefir de leite em modelo experimental de lesão gástrica induzido por indometacina. Rodrigues e colaboradores¹⁰¹ evidenciaram estes achados, no entanto em modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol. No grupo IBP observamos que a quantidade de células epiteliais era menor e as glândulas gástricas não apresentavam estrutura preservada. Devemos ressaltar que o uso de IBP em longo prazo podem levar a hiperplasia e hipertrofia das células parietais⁸⁴. Um dos fatores prejudiciais para a defesa e cicatrização do tecido que favorecem o desenvolvimento da lesão gástrica é a diminuição do muco citoprotetor²².

No presente estudo observamos que a administração do kefir foi capaz de manter a produção de muco, diferente do que foi observado nos demais grupos que apresentaram redução neste agente protetor. Fahmy e colaboradores⁶² avaliaram a produção de mucina e conseguiram demonstrar resultados semelhantes ao nosso. Estudo realizado por Rodrigues e colaboradores¹⁰³, em modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol, evidenciou que o pré-tratamento com kefir foi capaz de produzir uma camada extra de tecido epitelial no estômago e que esta estaria relacionada com interações com a mucina ou com outras estruturas, corroborando os achados do nosso estudo.

Os dados apresentados no presente estudo, confirmaram que o kefir é um alimento com potencial gastroprotetor. Para confirmar que a proteção se devia aos efeitos antioxidantes do kefir, decidimos avaliar marcadores de estresse oxidativo no tecido gástrico. Demonstramos que a administração de kefir diminuiu significativamente os níveis de ROS. Acreditamos que o efeito gastroprotetor do kefir de leite pode estar relacionado à presença de peptídeos antioxidantes encontrados no leite fermentado. É importante lembrar que no modelo experimental de lesão gástrica induzida por AINE, a úlcera é diretamente dependente do estresse oxidativo³⁰. Sabe-se que o uso de indometacina em modelo experimental aumenta a produção de ROS sistêmico e em células gástricas³¹. Um dos motivos desse aumento é a presença de um número maior de células inflamatórias no tecido gástrico que por sua vez desencadeiam resposta imune intensa aumentando a produção ROS e, conseqüentemente, causando danos a biomoléculas, como proteínas, lipídios e até mesmo o DNA⁸⁵

30 31.

Dentre as ROS, o peróxido de hidrogênio é a mais agressiva, uma vez que o tempo de permanência dentro da célula é maior que as demais, favorecendo a sinalização de citocinas inflamatórias⁸⁶. O uso de indometacina, além de aumentar a produção de ROS, diminui a produção de substâncias antioxidantes, como as enzimas CAT e SOD, favorecendo a oxidação de macromoléculas em células sistêmicas e locais^{31 87 30}. Em nosso estudo, observamos resultados semelhantes na diminuição das ROS, demonstrando a gastroproteção do uso do kefir de leite por mecanismos antioxidantes. FAHMY e colaboradores⁶² também evidenciaram o efeito protetor do kefir sobre o estresse oxidativo em modelo experimental de úlcera induzida por radiação e etanol, e esses efeitos foram avaliados a partir de substâncias antioxidantes.

Devemos destacar que o kefir de leite não apenas oferece benefícios antioxidantes na profilaxia da úlcera gástrica, mas também em outras doenças como Alzheimer⁵⁷, doenças hepática⁸⁸ e cardiovasculares⁸⁹. Estes benefícios são devidos às substâncias bioativas do leite fermentado que apresenta compostos bioativos como os peptídeos funcionais do kefir com ação antioxidante⁹⁰

Um dos mecanismos de defesa do tecido gástrico é a produção de NO. Este, por sua vez, tem papel fundamental contra os danos causados pelo uso

dos AINES, atuando na microcirculação tecidual do estômago e controlando a produção de muco citoprotetor⁹¹. No presente estudo relatamos que o uso de indometacina e IBP diminuíram os níveis de NO nas células gástricas, e o pré-tratamento com kefir foi capaz de aumentar a biodisponibilidade celular de NO. Esses dados corroboram com o trabalho de Barboza e colaboradores³⁰, que avaliaram os níveis de NO sistêmico. Um estudo realizado por Abraham e colaboradores⁹² evidenciou que o uso de um antagonista da enzima óxido nítrico sintase tem efeito gastroprotetor mediado por indução de lesão gástrica por AINE. Em 2001, Khattab e colaboradores⁹³ demonstraram efeitos protetores na mucosa gástrica mediados pelo NO. Estes estudos, corroboram os dados obtidos no presente trabalho.

O desenvolvimento da úlcera gástrica ocorre devido a um desequilíbrio entre os fatores defensivos e lesivos da mucosa gástrica. Por exemplo, o aumento da produção de ROS contribui para danos celulares, podendo causar morte celular programada⁹⁴. Lesões gástricas por diferentes mecanismos são capazes de desencadear apoptose celular⁹⁵. Em modelos experimentais de lesão gástrica (indometacina, etanol e estresse) os resultados são semelhantes⁹⁶. No presente estudo, comprovamos que o uso do kefir de leite preveniu danos ao DNA e conseqüentemente apoptose dessas células gástricas, com conseqüente aumento da viabilidade celular. Barboza e colaboradores³⁰ e Fahmy e colaboradores⁶² apresentaram resultados semelhantes sobre a redução do dano ao DNA em células gástricas e sanguíneas. Além disso, estes trabalhos comprovaram os benefícios do uso do kefir na prevenção da oxidação de outras macromoléculas locais e sistêmicas. É importante destacar, que o kefir de leite apresenta efeito antioxidante, anti-apoptótico e anti-genotóxico em pacientes com Alzheimer⁵⁷ e em modelo experimental de hipertensão arterial⁹⁸, ressaltando os benefícios do consumo do kefir de leite.

Depois de confirmar que o kefir apresenta efeito antioxidante em modelo experimental de lesão gástrica induzida por AINE, decidimos verificar se este leite fermentado apresentava efeito anti-inflamatório local e sistêmico, pois as lesões gástricas induzidas por administração de AINE se deve ao aumento de citocinas inflamatórias. Desta forma, analisamos a atividade da MPO nas células gástricas, assim como os níveis sistêmicos de citocinas inflamatórias. A citocina pró-inflamatória TNF- α é um importante mediador inflamatório na lesão gástrica

por AINE, uma vez que participa do recrutamento de leucócitos o que consequentemente diminui a microcirculação, aumenta a inflamação tecidual, causando lesão epitelial^{97 75 98}. No presente trabalho observamos que o pré-tratamento com kefir de leite foi capaz de diminuir os níveis plasmáticos de TNF- α . Em relação as interleucinas IL-6 e IL-10 não encontramos evidências de que o uso do kefir de leite alterasse os níveis sistêmicos destas citocinas. Ao contrário dos nossos achados, Hatware e colaboradores⁹⁹ demonstraram que no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina, os níveis séricos destas citocinas estão aumentados. Na indução de lesão gástrica por etanol, ocorre aumento da atividade da MPO e de TNF- α com consequente diminuição de IL-10 e, estes resultados estão relacionados com a inflamação do tecido gástrico¹⁰⁰.

Entretanto, nosso estudo apresenta limitações sobre mecanismos que ainda devem ser elucidados, como a avaliação da participação de enzimas antioxidantes (SOD e CAT) e de substâncias antioxidantes (glutaciona), além de protocolos que confirmem os resultados dos demais trabalhos da área, como oxidação de macromoléculas. Também devemos considerar a importância da realização de protocolos voltados para os mecanismos anti-inflamatórios.

7 CONCLUSÃO

Em nosso estudo, demonstramos que o kefir de leite, um alimento de baixo custo, é um excelente gastroprotetor devido aos seus efeitos antioxidantes, anti-apoptóticos e antígenotóxicos locais. Desta forma, os dados aqui apresentados suportam que este probiótico deva ser considerado uma alternativa, ou mesmo um adjuvante, no tratamento e/ou prevenção de úlceras gástricas, minimizando problemas gastrointestinais relacionados ao uso de AINEs, assim como pelo uso dos IBPs.

8 REFERÊNCIAS

- 1 GREENWOOD-VAN MEERVELD, B.; JOHNSON, A. C.; GRUNDY, D. Gastrointestinal Physiology and Function. **Handb Exp Pharmacol**, v. 239, p. 1-16, 2017.
- 2 SOYBEL, D. I. Anatomy and physiology of the stomach. **Surg Clin North Am**, v. 85, n. 5, p. 875-94, v, Oct 2005.
- 3 CHAUDHRY, S. R.; LIMAN, M. N. P.; PETERSON, D. C. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Stomach. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- 4 RAMSAY, P. T.; CARR, A. Gastric acid and digestive physiology. **Surg Clin North Am**, v. 91, n. 5, p. 977-82, Oct 2011.
- 5 SCHUBERT, M. L. Physiologic, pathophysiologic, and pharmacologic regulation of gastric acid secretion. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 33, n. 6, p. 430-438, Nov 2017.
- 6 ENGEVIK, A. C.; KAJI, I.; GOLDENRING, J. R. The Physiology of the Gastric Parietal Cell. **Physiol Rev**, v. 100, n. 2, p. 573-602, Apr 1 2020.
- 7 CHEN, D. et al. Differentiation of the gastric mucosa. I. Role of histamine in control of function and integrity of oxyntic mucosa: understanding gastric physiology through disruption of targeted genes. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 291, n. 4, p. G539-44, Oct 2006.
- 8 SHIN, J. M. et al. The gastric HK-ATPase: structure, function, and inhibition. **Pflugers Arch**, v. 457, n. 3, p. 609-22, Jan 2009.
- 9 MOUSA, A. M. et al. Antiulcerogenic effect of *Cuphea ignea* extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **BMC Complement Altern Med**, v. 19, n. 1, p. 345, Dec 2 2019.
- 10 YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: An Overview. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 17, n. 6, p. 24, Jun 2015.

- ¹¹ LEVENSTEIN, S. et al. Psychological stress increases risk for peptic ulcer, regardless of Helicobacter pylori infection or use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 13, n. 3, p. 498-506.e1, Mar 2015.
- ¹² MERTZ, H. R.; WALSH, J. H. Peptic ulcer pathophysiology. **Med Clin North Am**, v. 75, n. 4, p. 799-814, Jul 1991.
- ¹³ SOLL, A. H.; MCCARTHY, D. NSAID-related gastrointestinal complications. **Clin Cornerstone**, v. 1, n. 5, p. 42-56, 1999.
- ¹⁴ ARRAIS, P. S. et al. Prevalence of self-medication in Brazil and associated factors. **Rev Saude Publica**, v. 50, n. suppl 2, p. 13s, Dec 2016.
- ¹⁵ ATHANASOPOULOS, C. et al. Is drug utilization in Greece sex dependent? A population-based study. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 112, n. 1, p. 55-62, Jan 2013.
- ¹⁶ DA SILVA DAL PIZZOL, T. et al. Analgesic use among the Brazilian population: Results from the National Survey on Access, Use and Promotion of Rational Use of Medicines (PNAUM). **PLoS One**, v. 14, n. 3, 2019.
- ¹⁷ BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochem Pharmacol**, v. 180, p. 114147, Oct 2020.
- ¹⁸ GHLICHLOO, I.; GERRIETS, V. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs). In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan.
- ¹⁹ CONAGHAN, P. G. A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. **Rheumatol Int**, v. 32, n. 6, p. 1491-502, Jun 2012.
- ²⁰ TAKEUCHI, K. et al. COX inhibition and NSAID-induced gastric damage-roles in various pathogenic events. **Curr Top Med Chem**, v. 5, n. 5, p. 475-86, 2005.

- ²¹ MAHBOUBI RABBANI, S. M. I.; ZARGHI, A. Selective COX-2 inhibitors as anticancer agents: a patent review (2014-2018). **Expert Opin Ther Pat**, v. 29, n. 6, p. 407-427, Jun 2019.
- ²² BJARNASON, I. et al. Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Gastroenterology**, v. 154, n. 3, p. 500-514, Feb 2018.
- ²³ LANAS, A.; FERRANDEZ, A. Inappropriate prevention of NSAID-induced gastrointestinal events among long-term users in the elderly. **Drugs Aging**, v. 24, n. 2, p. 121-31, 2007.
- ²⁴ BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiol Rev**, v. 94, n. 2, p. 329-54, Apr 2014.
- ²⁵ FORRESTER, S. J. et al. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. **Circ Res**, v. 122, n. 6, p. 877-902, Mar 16 2018.
- ²⁶ POPRAC, P. et al. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends Pharmacol Sci**, v. 38, n. 7, p. 592-607, Jul 2017.
- ²⁷ NOCELLA, C. et al. Impairment between Oxidant and Antioxidant Systems: Short- and Long-term Implications for Athletes' Health. **Nutrients**, v. 11, n. 6, Jun 15 2019.
- ²⁸ HE, L. et al. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cell Physiol Biochem**, v. 44, n. 2, p. 532-553, 2017.
- ²⁹ WEYDERT, C. J.; CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nat Protoc**, v. 5, n. 1, p. 51-66, Jan 2010.
- ³⁰ BARBOZA, K. R. M. et al. Gastroprotective effect of oral kefir on indomethacin-induced acute gastric lesions in mice: Impact on oxidative stress. **Life sciences**, v. 209, p. 370-376, 2018.

- ³¹ MAZIERO ALVES, G. et al. Sildenafil attenuates nonsteroidal anti-inflammatory-induced gastric ulceration in mice via antioxidant and antigenotoxic mechanisms. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, Oct 5 2020.
- ³² FREED, J. K. et al. Ceramide changes the mediator of flow-induced vasodilation from nitric oxide to hydrogen peroxide in the human microcirculation. **Circ Res**, v. 115, n. 5, p. 525-32, Aug 15 2014.
- ³³ HICKEY, E. J. et al. Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 2, p. 139-52, Jul 15 2001.
- ³⁴ RZHESHEVSKY, A. V. Fatal "triad": lipotoxicity, oxidative stress, and phenoptosis. **Biochemistry (Mosc)**, v. 78, n. 9, p. 991-1000, Sep 2013.
- ³⁵ EUSEBI, L. H. et al. Proton pump inhibitors: Risks of long-term use. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 32, n. 7, p. 1295-1302, Jul 2017.
- ³⁶ MALFERTHEINER, P.; KANDULSKI, A.; VENERITO, M. Proton-pump inhibitors: understanding the complications and risks. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 12, p. 697-710, Dec 2017.
- ³⁷ WARD, R. M.; KEARNS, G. L. Proton pump inhibitors in pediatrics : mechanism of action, pharmacokinetics, pharmacogenetics, and pharmacodynamics. **Paediatr Drugs**, v. 15, n. 2, p. 119-31, Apr 2013.
- ³⁸ SARZYNSKI, E. et al. Association between proton pump inhibitor use and anemia: a retrospective cohort study. **Dig Dis Sci**, v. 56, n. 8, p. 2349-53, Aug 2011. ISSN 0163-2116.
- ³⁹ GRAY, S. L. et al. Proton Pump Inhibitor Use and Dementia Risk: Prospective Population-Based Study. **J Am Geriatr Soc**, v. 66, n. 2, p. 247-253, Feb 2018.
- ⁴⁰ KIM, J. J. et al. Association between proton pump inhibitor use and risk of fracture: A population-based case-control study. **PLoS One**, v. 15, n. 7, p. e0235163, 2020.

- ⁴¹ HOJO, M. et al. Gut Microbiota Composition Before and After Use of Proton Pump Inhibitors. **Dig Dis Sci**, v. 63, n. 11, p. 2940-2949, Nov 2018.
- ⁴² ROSA, D. D. et al. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutr Res Rev**, v. 30, n. 1, p. 82-96, Jun 2017.
- ⁴³ Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition research reviews**, v. 30, n. 1, p. 82-96, 2017.
- ⁴⁴ PRADO, M. R. et al. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1177, 2015.
- ⁴⁵ BENGUA, A. A. et al. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. **J Appl Microbiol**, v. 126, n. 3, p. 686-700, Mar 2019.
- ⁴⁶ FARAG, M. A. et al. The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. **Nutrients**, v. 12, n. 2, Jan 28 2020.
- ⁴⁷ DE OLIVEIRA LEITE, A. M. et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Braz J Microbiol**, v. 44, n. 2, p. 341-9, 2013.
- ⁴⁸ GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **J Dairy Res**, v. 68, n. 4, p. 639-52, Nov 2001.
- ⁴⁹ ESENER, O. et al. Donkey milk kefir induces apoptosis and suppresses proliferation of Ehrlich ascites carcinoma by decreasing iNOS in mice. **Biotech Histochem**, v. 93, n. 6, p. 424-431, 2018.
- ⁵⁰ DE MORENO DE LEBLANC, A. et al. Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. **J Dairy Sci**, v. 90, n. 4, p. 1920-8, Apr 2007.
- ⁵¹ VINDEROLA, C. G. et al. Immunomodulating capacity of kefir. **J Dairy Res**, v. 72, n. 2, p. 195-202, May 2005.

- ⁵² DE ALMEIDA SILVA, M. et al. Kefir ameliorates hypertension via gut-brain mechanisms in spontaneously hypertensive rats. **J Nutr Biochem**, v. 77, p. 108318, Mar 2020.
- ⁵³ FRIQUES, A. G. F. et al. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Journal of translational medicine**, v. 13, n. 1, p. 390, 2015.
- ⁵⁴ SILVA, K. R. et al. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 152, n. 2, p. 316-25, Feb 2009.
- ⁵⁵ LIU, J. R. et al. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. **Br J Nutr**, v. 95, n. 5, p. 939-46, May 2006.
- ⁵⁶ PUNARO, G. R. et al. Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. **Nitric Oxide**, v. 37, p. 53-60, Feb 15 2014.
- ⁵⁷ TON, A. M. M. et al. Oxidative Stress and Dementia in Alzheimer's Patients: Effects of Synbiotic Supplementation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.
- ⁵⁸ KIM, D. H. et al. Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. **J Nutr Biochem**, v. 44, p. 35-43, Jun 2017.
- ⁵⁹ PRADO, M. R. et al. Anti-inflammatory and angiogenic activity of polysaccharide extract obtained from Tibetan kefir. **Microvasc Res**, v. 108, p. 29-33, Nov 2016.
- ⁶⁰ ROSA, D. D. et al. Kefir reduces insulin resistance and inflammatory cytokine expression in an animal model of metabolic syndrome. **Food Funct**, v. 7, n. 8, p. 3390-401, Aug 10 2016.
- ⁶¹ BOURRIE, B. C.; WILLING, B. P.; COTTER, P. D. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. **Front Microbiol**, v. 7, p. 647, 2016.

- ⁶² FAHMY, H. A.; ISMAIL, A. F. M. Gastroprotective effect of kefir on ulcer induced in irradiated rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 144, p. 85-93, 2015.
- ⁶³ TAMADDONFARD, E. et al. Safranal, a constituent of saffron, exerts gastro-protective effects against indomethacin-induced gastric ulcer. **Life sciences**, v. 224, p. 88-94, 2019.
- ⁶⁴ MINOZZO, B. R. et al. Anti-ulcer mechanisms of polyphenols extract of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 191, p. 29-40, 2016.
- ⁶⁵ MAHMOUD, Y. I.; ABD EL-GHFFAR, E. A. Spirulina ameliorates aspirin-induced gastric ulcer in albino mice by alleviating oxidative stress and inflammation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 314-321, 2019.
- ⁶⁶ ZANARDO TÉ, C. et al. Decellularized Splenic Matrix as a Scaffold for Spleen Bioengineering. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 8, p. 573461, 2020.
- ⁶⁷ EVERETT, S. M. et al. In vivo DNA damage in gastric epithelial cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 468, n. 1, p. 73-85, 2000.
- ⁶⁸ CAMPAGNARO, B. P. et al. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from angiotensin-dependent hypertensive mice. **International Journal of Hypertension**, v. 2013, 2013.
- ⁶⁹ BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- ⁷⁰ SHIM, Y. K.; KIM, N. [Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug and Aspirin-induced Peptic Ulcer Disease]. **Korean J Gastroenterol**, v. 67, n. 6, p. 300-12, Jun 25 2016.
- ⁷¹ GARCÍA-RAYADO, G.; NAVARRO, M.; LANAS, A. NSAID induced gastrointestinal damage and designing GI-sparing NSAIDs. **Expert Rev Clin Pharmacol**, v. 11, n. 10, p. 1031-1043, Oct 2018.

- ⁷² YOSHIMI, T. et al. Study of the Inhibitory Effects of Enteral Nutrition Formula on Indomethacin-Induced Gastric Lesions in Mice. **Nutrients**, v. 11, n. 12, Dec 14 2019.
- ⁷³ EL-ASHMAWY, N. E. et al. Nebivolol prevents indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **J Immunotoxicol**, v. 13, n. 4, p. 580-9, Jul 2016.
- ⁷⁴ KANGWAN, N. et al. Rosmarinic Acid Enriched Fraction from *Perilla frutescens* Leaves Strongly Protects Indomethacin-Induced Gastric Ulcer in Rats. **Biomed Res Int**, v. 2019, p. 9514703, 2019.
- ⁷⁵ MAHMOUD, Y. I.; EL-GHFFAR, E. A. A. Spirulina ameliorates aspirin-induced gastric ulcer in albino mice by alleviating oxidative stress and inflammation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 314-321, 2019.
- ⁷⁶ ATHAYDES, B. R. et al. Avocado seeds (*Persea americana* Mill.) prevents indomethacin-induced gastric ulcer in mice. **Food Res Int**, v. 119, p. 751-760, May 2019.
- ⁷⁷ ABD EL-GHFFAR, E. A. et al. The protective role of *Ocimum basilicum* L. (Basil) against aspirin-induced gastric ulcer in mice: Impact on oxidative stress, inflammation, motor deficits and anxiety-like behavior. **Food Funct**, v. 9, n. 8, p. 4457-4468, Aug 15 2018.
- ⁷⁸ SENOL, A. et al. Effect of probiotics on aspirin-induced gastric mucosal lesions. **Turk J Gastroenterol**, v. 22, n. 1, p. 18-26, Feb 2011.
- ⁷⁹ PARK, H. et al. Amelioration of Alcohol Induced Gastric Ulcers Through the Administration of *Lactobacillus plantarum* APSulloc 331261 Isolated From Green Tea. **Front Microbiol**, v. 11, p. 420, 2020.
- ⁸⁰ WANG, F. Y. et al. Potential protective effects of *Clostridium butyricum* on experimental gastric ulcers in mice. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 27, p. 8340-51, Jul 21 2015.
- ⁸¹ OLIVEIRA, A. P. et al. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 Protects against Gastric Damage Induced by Ethanol Administration in Mice: Role of TRPV1/Substance P Axis. **Nutrients**, v. 11, n. 1, Jan 21 2019.

- ⁸² SUN, M. C. et al. Pretreatment with *Lactobacillus reuteri* F-9-35 attenuates ethanol-induced gastric injury in rats. **Food Nutr Res**, v. 62, 2018.
- ⁸³ DHARMANI, P.; DE SIMONE, C.; CHADEE, K. The probiotic mixture VSL#3 accelerates gastric ulcer healing by stimulating vascular endothelial growth factor. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58671, 2013.
- ⁸⁴ STOLTE, M. et al. Treatment with lansoprazole also induces hypertrophy of the parietal cells of the stomach. **Pathol Res Pract**, v. 196, n. 1, p. 9-13, 2000.
- ⁸⁵ DENGIZ, G. O. et al. Gastroprotective and antioxidant effects of amiodarone on indomethacin-induced gastric ulcers in rats. **Arch Pharm Res**, v. 30, n. 11, p. 1426-34, Nov 2007.
- ⁸⁶ GANGULY, K. et al. Hydrogen peroxide-mediated downregulation of matrix metalloproteinase-2 in indomethacin-induced acute gastric ulceration is blocked by melatonin and other antioxidants. **Free Radic Biol Med**, v. 41, n. 6, p. 911-25, Sep 15 2006.
- ⁸⁷ KOC, M.; IMIK, H.; ODABASOGLU, F. Gastroprotective and anti-oxidative properties of ascorbic acid on indomethacin-induced gastric injuries in rats. **Biol Trace Elem Res**, v. 126, n. 1-3, p. 222-36, Winter 2008.
- ⁸⁸ EL GOLLI-BENNOUR, E. et al. Protective effects of kefir against deltamethrin-induced hepatotoxicity in rats. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 26, n. 18, p. 18856-18865, Jun 2019.
- ⁸⁹ MERT, H. et al. Investigation of the Protective Effect of Kefir against Isoproterenol Induced Myocardial Infarction in Rats. **Korean J Food Sci Anim Resour**, v. 38, n. 2, p. 259-272, Apr 2018.
- ⁹⁰ DE LIMA, M. D. S. F. et al. Brazilian Kefir-Fermented Sheep's Milk, a Source of Antimicrobial and Antioxidant Peptides. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 10, n. 3, p. 446-455, 2018.
- ⁹¹ SULEYMAN, H. et al. Different mechanisms in formation and prevention of indomethacin-induced gastric ulcers. **Inflammation**, v. 33, n. 4, p. 224-34, Aug 2010.

- ⁹² ABRAHAM, P.; K, I.; K, D. Nitro-arginine methyl ester, a non-selective inhibitor of nitric oxide synthase reduces ibuprofen-induced gastric mucosal injury in the rat. **Dig Dis Sci**, v. 50, n. 9, p. 1632-40, Sep 2005.
- ⁹³ KHATTAB, M. M.; GAD, M. Z.; ABDALLAH, D. Protective role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion. **Pharmacol Res**, v. 43, n. 5, p. 463-7, May 2001.
- ⁹⁴ KAMINSKY, V. O.; ZHIVOTOVSKY, B. Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. **Antioxid Redox Signal**, v. 21, n. 1, p. 86-102, Jul 1 2014.
- ⁹⁵ LIANG, J. et al. Prophylactic efficacy of patchoulene epoxide against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and apoptosis. **Chem Biol Interact**, v. 283, p. 30-37, Mar 1 2018.
- ⁹⁶ FU, Y. et al. Gastroprotective and anti-ulcer effects of oxymatrine against several gastric ulcer models in rats: Possible roles of antioxidant, antiinflammatory, and prosurvival mechanisms. **Phytother Res**, v. 32, n. 10, p. 2047-2058, Oct 2018.
- ⁹⁷ WATANABE, T. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates leukocyte recruitment during gastric ulcer recurrence induced by tumor necrosis factor- α . **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 287, n. 4, p. G919-28, Oct 2004.
- ⁹⁸ WANG, T. et al. Protective effects of escin against indomethacin-induced gastric ulcer in mice. **Toxicol Mech Methods**, v. 24, n. 8, p. 560-6, Dec 2014.
- ⁹⁹ HATWARE, K. V. et al. Evidence for gastroprotective, anti-inflammatory and antioxidant potential of methanolic extract of *Cordia dichotoma* leaves on indomethacin and stress induced gastric lesions in Wistar rats. **Biomed Pharmacother**, v. 103, p. 317-325, Jul 2018.
- ¹⁰⁰ ARAB, H. H. et al. Diosmin protects against ethanol-induced gastric injury in rats: novel anti-ulcer actions. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0122417, 2015.

101: RODRIGUES, Kamila Leite et al. A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 58-69, 2016.