

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO KEFIR SOBRE O DANO OXIDATIVO EM
CAMUNDONGOS SUMETIDOS À LESÃO GÁSTRICA**

KELLY RIBEIRO MOURA BARBOZA

VILA VELHA
OUTUBRO/2017

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO KEFIR SOBRE O DANO OXIDATIVO EM
CAMUNDONGOS SUMETIDOS À LESÃO GÁSTRICA**

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

KELLY RIBEIRO MOURA BARBOZA

VILA VELHA
OUTUBRO/2017

B238a Barboza, Kelly Ribeiro Moura.

Avaliação do efeito do Kefir sobre o dano oxidativo em camundongos submetidos à lesão gástrica. / Kelly Ribeiro Moura Barboza. – 2017.

38 f.: il.

Orientadora: Bianca Prandi Campagnaro.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Vila Velha, 2017
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia terapêutica.. 2. Kefir.. 3. Apoptose.. 4. Probióticos.
I. Campagnaro, Bianca Prandi. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

KELLY RIBEIRO MOURA BARBOZA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO KEFIR SOBRE O DANO OXIDATIVO EM
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À LESÃO GÁSTRICA**

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

Aprovada em 27 de outubro de 2017.

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Marcella Leite Porto — IFES



Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez — UVV



Profa. Dra. Bianca Prandi Campagnaro — UVV

(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente na minha vida, me abençoando e me guiando em cada passo e em cada decisão;

À minha família, em especial, minha mãe, Maria, por ter sempre me apoiado e acreditado que era possível a realização dos meus sonhos, mesmo quando as dificuldades eram enormes, e nunca me deixou desistir;

Ao meu esposo pelo apoio, amor e dedicação, além de muita compreensão pelos momentos em que estive ausente;

À Prof. Dra. Bianca Prandi Campagnaro, pela orientação neste trabalho, sempre com atenção e dedicação;

Às alunas de iniciação científica, Larissa Zambom Côco e Beatriz Peters, pelo carinho e dedicação, pelo tempo e disposição de me ensinar cada protocolo de pesquisa. Gratidão é a palavra que resume o meu sentimento por tudo o que fizeram por mim;

À aluna de mestrado e companheira de caminhada, Gisele Alves, pelas palavras de incentivo, e por todas as vezes que se dispôs a me ajudar no laboratório;

Aos professores do mestrado, pelas excelentes aulas ministradas;

Aos colegas de laboratórios da UVV e da UFES, funcionários do PPGCF e Biopráticas;

Enfim a todos que de alguma forma estiveram, direta ou indiretamente envolvidos nesse trabalho e contribuíram para a realização do mesmo.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	:	i
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	:	ii
RESUMO	:	iv
ABSTRACT	:	v
1 INTRODUÇÃO	:	6
1.1 Doença Ulcerosa péptica	:	7
1.1.1 Úlceras gástricas	:	8
1.1.2 Anti-inflamatórios não esteroidais	:	8
1.1.3 Inibidores de bomba protônica	:	8
1.2 Probióticos	:	9
1.2.1 Kefir	:	9
2 OBJETIVOS	:	11
2.1 Objetivos gerais	:	11
2.2 Objetivos específicos	:	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS	:	12
3.1 Animais	:	13
3.2 Preparação e administração do kefir	:	13
3.3 Grupos experimentais e tratamento de animais	:	13
3.4 Coleta de sangue para análise de espécies reativas de oxigênio (ROS)	:	14
3.5 Análise de lesões macroscópicas	:	14
3.6 Determinação de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP)	:	15
3.7 Determinação dos níveis de ROS por citometria de fluxo	:	16
3.8 Determinação de viabilidade e apoptose celular	:	16
3.9 Análise de conteúdo de DNA	:	17
3.10 Ensaio Cometa	:	17
3.11 Análise Estatística	:	19
4 RESULTADOS	:	20
4.1 pH gástrico	:	20
4.2 Lesões gástricas macroscópicas	:	20
4.3 Análise de estresse oxidativo (ROS)	:	21
4.4 Oxidação proteica no plasma	:	22
4.5 Apoptose e viabilidade em células sanguíneas	:	22

4.6	Ciclo celular _____	: 23
4.7	Detecção do dano ao DNA pelo Ensaio Cometa _____	: 24
5	DISCUSSÃO _____	: 25
6	CONCLUSÃO _____	: 30
7	REFERÊNCIAS _____	: 31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Etapas para análise de lesões macroscópicas _____ :	15
Figura 2	Etapas da leitura de microplaca contendo amostras de _____ : plasma para verificação de AOPP	16
Figura 3	Ensaio do Cometa Alcalino _____ :	19
Figura 4	Variação pH do suco gástrico _____ :	20
Figura 5	Lesões gástricas macroscópicas _____ :	20
Figura 6	Produção de ROS por citometria de fluxo _____ :	21
Figura 7	Produtos Avançados de Oxidação Proteica no plasma _____ :	22
Figura 8	Percentual de células em apoptose e de células viáveis _____ :	23
Figura 9	Fração de células na fase subG0 do ciclo celular _____ :	23
Figura 10	Detecção do dano ao DNA por Ensaio Cometa _____ :	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- O₂⁻ — Ânion superóxido
- OH⁻ — Radical hidroxila
- AINEs — Anti-inflamatórios não esteroidais
- ANOVA — Análise de variância
- AOPP — Produtos proteicos de oxidação avançada
- CEUA — Comitê de ética no uso de animais
- DAF — Diaminofluoresceína
- DCF — Diclorofluoresceína
- DCFH-DA — 2', 7' -diacetato de diclorofluoresceína
- DHE — Dihidroetídeo
- DMSO — Dimetilsulfóxido
- DNA — Ácido desoxiribonucleico
- EDTA — Ácido etileno diamina tetra acético
- EPM — Erro Padrão da Média
- H₂O₂ — Peróxido de hidrogênio
- HCL — Ácido clorídrico
- HCO₃⁻ — Ânion bicarbonato
- HP — Helicobacter pylori
- HPF — Hidroxifenilfluoresceína
- IBPs — Inibidores de bomba de prótons
- KI — Iodeto de potássio
- NIH — National Institutes of Health
- NO — Óxido nítrico
- OMS — Organização Mundial da Saúde
- ONOO⁻—Peroxinitrito
- PBS — Solução salina tamponada
- PG — Prostaglandinas
- PI — Iodeto de propídeo
- ROS— Espécies reativas de oxigênio
- RPM — Rotações por minuto
- SFB — Soro fetal bovino
- SOD — Superóxido dismutase
- UFES — Universidade Federal do Espírito Santo

UP — Úlcera péptica

UVV — Universidade Vila Velha

RESUMO

BARBOZA, Kelly Ribeiro Moura, M.Sc, Universidade Vila Velha-ES, outubro de 2017. **Avaliação do efeito do kefir sobre o dano oxidativo em camundongos submetidos à lesão gástrica.** Orientadora: Bianca Prandi Campagnaro.

O kefir despertou interesse na comunidade científica devido aos inúmeros efeitos benéficos em saúde. O consumo regular tem sido associado a efeitos antioxidante, anti-inflamatório, antialergênico, antitumoral e propriedades cicatrizantes. A úlcera péptica induzida pelo uso de anti-inflamatório é mais prevalente na população idosa, e pode se manifestar com sintomas graves. O uso de inibidores de bomba de prótons (IBPs) tornou-se uma alternativa na profilaxia dessas lesões gástrica, apesar dos efeitos adversos importantes com o seu uso crônico. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi investigar a ação gastroprotetora do kefir em camundongos submetidos à lesão gástrica por indometacina. Para tanto, foram ensaiados três grupos (n=10), que receberam leite com pH ajustado para 4,5 e kefir (0,3mL/100g de peso respectivamente), e um terceiro que recebeu lansoprazol (30mg/kg de peso). O tratamento foi por via oral durante 14 dias e, posteriormente, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue por punção cardíaca e análise de genotoxicidade pelo Ensaio Cometa e análise por citometria de fluxo de estresse oxidativo, fragmentação de DNA, apoptose e viabilidade celular. O plasma foi separado para quantificar os produtos de oxidação proteica avançadas (AOPP) e o estômago extraído para medir o pH e a área de lesão na mucosa. Efeitos significativos foram observados com o uso do kefir. O pH do estômago no grupo kefir, não revelou diferença significativa quando comparados aos outros dois grupos; a área de lesão macroscópica no grupo kefir foi significativamente menor ($0,6\% \pm 1,0\text{mm}^2$) do que nos grupos leite e lansoprazol ($3,3\% \pm 0,3$ e $1,0\% \pm 0,3\text{mm}^2$ respectivamente); e a análise de citometria de fluxo revelou menor produção de ROS, maior biodisponibilidade de óxido nítrico, redução de apoptose e de fragmentação de DNA, maior viabilidade celular, redução de oxidação proteica menor genotoxicidade no Ensaio Cometa. Com os nossos resultados, podemos concluir que o kefir foi capaz de proteger a mucosa gástrica através da redução do estresse oxidativo.

Palavras-chave: Úlcera gástrica, fragmentação de DNA, apoptose, probióticos

ABSTRACT

BARBOZA, Kelly Ribeiro Moura, M.Sc, Vila Velha-ES University, October 2017

Evaluation of the effect of kefir on oxidative damage in mice subject to gastric injury. Advisor: Bianca Prandi Campagnaro .

Kefir has aroused interest in the scientific community due to the numerous beneficial effects on health. Regular consumption has been associated with antioxidant, anti-inflammatory, anti-allergenic, antitumor effects and healing properties. Peptic ulcer induced by the use of anti-inflammatory drugs is more prevalent in the elderly population, and may manifest with severe symptoms. The use of proton pump inhibitors (PPIs) has become an alternative in the prophylaxis of these gastric lesions, despite the important adverse effects with its chronic use. In this context, the objective of this study was to investigate the gastroprotective action of kefir in mice submitted to indomethacin gastric lesion. For this, three groups (n=10), who received milk with pH adjusted for 4.5 and kefir (0.3 mL/100g of body weight, respectively), and lansoprazole (30 mg/kg of body weight) were tested. The treatment was orally for 14 days and afterwards the animals were euthanized for blood collection by cardiac puncture and analysis of genotoxicity by the Cometa Assay and analysis by flow cytometry of oxidative stress, DNA fragmentation, apoptosis and cell viability. Plasma was separated to quantify the advanced protein oxidation products (AOPP) and the extracted stomach to measure the pH and area of mucosal lesion. Significant effects were observed with kefir. The pH of the stomach in the kefir group showed no significant difference when compared to the other two groups; the area of macroscopic lesion in the kefir group was significantly lower ($0.6\% \pm 1.0\text{mm}^2$) than in the milk and lansoprazole groups ($3.3\% \pm 0.3$ and $1.0\% \pm 0.3\text{mm}^2$ respectively); and the flow cytometric analysis revealed lower ROS production, higher bioavailability of nitric oxide, reduced apoptosis and DNA fragmentation, increased cell viability, reduction of protein oxidation, and lower genotoxicity in the Cometa Assay. With our results, we can conclude that Kefir was able to protect the gastric mucosa by reducing oxidative stress.

Keywords: Gastric ulcer, DNA fragmentation, apoptosis, probiotics

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença ulcerosa péptica

A úlcera péptica (UP) é uma doença do trato gastrointestinal bastante frequente, considerada uma condição importante em saúde pública, com uma incidência mundial anual que varia de 0,10% a 0,19%, e prevalência de 0,12% a 1,5% (Sung et al., 2009). É caracterizada por lesão da mucosa na presença de ácido e pepsina e os fatores de risco conhecidos atualmente para o seu desenvolvimento são o tabagismo, alcoolismo, fatores genéticos, maus hábitos alimentares, estilo de vida, infecção por *Helicobacter pylori* (HP) e uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (Schubert et al., 1993) A média de idade de pessoas acometidas por úlcera péptica fica em torno de 30 a 60 anos (Martins et al., 2002).

Calcula-se que 25% das pessoas que fazem uso de AINEs podem vir a apresentar alguma complicação e 50-80% das hemorragias digestivas estão relacionadas ao uso dessas drogas sendo responsáveis por 40-60% das hospitalizações em todo o mundo (Zhonghua, 2017). Somente nos Estados Unidos as úlceras pépticas é uma das principais causas de morbidade e mortalidade com mais de seis milhões de diagnóstico ao ano (Konturek et al., 2003; Cryer et al., 2014; Tielleman et al., 2015). O uso de AINEs é cada vez mais frequente sendo considerada a segunda causa, ficando atrás somente das infecções por *H. pylori* (Goldstein et al., 2015; Toneto et al., 2011; Malmi et al., 2017). O risco relativo calculado de um usuário dessa droga desenvolver úlcera gástrica ou duodenal é 46 e 8 vezes, respectivamente, maior que a população normal (Najm, 2011).

Houve uma redução da prevalência da úlcera péptica na população mundial nos últimos 20-30 anos, devido ao conhecimento dos principais fatores de risco e ao uso cada vez mais freqüente de drogas antissecretoras, como por exemplo, os inibidores de bomba protônica (IBPs), entretanto a morbidade e mortalidade permanecem elevadas (Graham, 2014; Malfertheiner et al., 2009; Lanas et al., 2017).

No Brasil não são encontrados estudos de base populacional que quantifique a magnitude da doença ulcerosa. Oliveira et al., 2008 fez um levantamento com base em registro de internação no Sistema Único de Saúde e observou uma taxa de 10% de internações relacionadas à doença, com prevalência variando de 0,1-0,3% dependendo da região do país estudada, sendo maior na

região centro-oeste, e a taxa de mortalidade encontrada foi de 3,0/100 mil habitantes. Nosso país segue a mesma tendência mundial com redução dos números de casos, porém ainda com altas taxas de complicações.

1.1.1 Úlceras gástricas

As lesões gástricas são geradas por um desequilíbrio entre os mecanismos defensivos da mucosa e os agentes lesivos (Nieto, 2012, Li et al., 2017). Como forma de proteção, a mucosa possui um mecanismo de barreira que é formado pela camada de muco que recobre a superfície epitelial, o bicarbonato secretado pelo epitélio colunar, bicarbonato intersticial, pela rápida e constante capacidade de renovação de células epiteliais gástricas após lesão da superfície mucosa, pela manutenção da integridade da microcirculação local e hidrofobicidade do epitélio de revestimento (Castro, 1998).

Essa barreira mucosa constitui a primeira linha de defesa que mantém o pH aproximadamente neutro na superfície das células epiteliais. As prostaglandinas (PG) secretadas pelas células gástricas estimulam receptores na mucosa que estão relacionados ao aumento da secreção de bicarbonato (HCO_3^-), aumento do fluxo sanguíneo local, inibição da secreção ácida e diminuição da motilidade gástrica, portanto as PG exercem um papel fundamental na proteção da mucosa (Abayasekara et al., 1999; Takeeda et al., 2004; Kotani et al., 2005).

1.1.2 Anti-inflamatórios não esteroidais

A utilização de AINEs está entre as principais causas de desenvolvimento de úlcera péptica, podendo ocorrer após administração oral ou sistêmica dessas drogas (Singh et al., 1996), especialmente na população idosa (Malcontenti-Wilson et al., 1998, Bi et al., 2017, Al Khaja et al., 2017). Esta classe de medicamento pode promover lesão gastroduodenal por dois mecanismos independentes: 1) por efeito tóxico direto, em nível epitelial, sobre os mecanismos de defesa da mucosa gastroduodenal, resultando em aumento da permeabilidade celular, inibição do transporte iônico e da fosforilação oxidativa e, 2) por meio sistêmico, enfraquecendo os mecanismos de defesa através da inibição da cicloxigenase, enzima chave na síntese das prostaglandinas (Wallace, 2000).

Desta forma, os AINEs causam uma redução significativa nos teores de prostaglandinas e sabe-se que as prostaglandinas A e E protegem a mucosa gástrica através de seus efeitos estimulantes sobre a produção de muco e secreção

de bicarbonato, enquanto aumentam o fluxo sanguíneo mucoso e reduzem o turnover celular (Jackson et al., 1999; Pilotto et al., 2004).

A célula gástrica possui um sistema de defesa antioxidante capaz de evitar a citotoxicidade das espécies reativas de oxigênio (ROS) e a formação dessas espécies reativas é uma constante nas células gástricas em condições fisiológicas ou patológicas como na inflamação (Ueda et al., 2008). Esses compostos reativos constituem no ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical de hidroxila ($\cdot\text{OH}$), que podem induzir ao dano, e eventualmente a morte da célula. Em condições fisiológicas o sistema redox (oxidação e redução) intracelular é capaz de impedir esses danos causados pelas EROs através de um sistema enzimático antioxidante, que envolve as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona redutase. Qualquer depleção desses antioxidantes ou exposição a um agente oxidante pode causar um desequilíbrio resultando no estresse oxidativo (Guo et al., 2003).

Existem várias terapias farmacológicas conhecidas e estudadas para a profilaxia de lesões gástricas em indivíduos que necessitam do uso continuado ou prolongado de anti-inflamatórios, incluindo antiácidos, bloqueadores de receptores de histaminas (H_2) e inibidores de bomba de prótons (IBPs).

Este último tornou-se muito popular e estudos recentes têm atribuído efeitos adversos importantes com a terapia em longo prazo trazendo prejuízo da cognição principalmente em indivíduos idosos (Gomm et al., 2016; Goldstein et al., 20).

1.1.3 Inibidores de bomba protônica

Os IBPS estão indiscutivelmente entre as medicações mais prescritas no mundo e o seu uso tem sido associado à lesão renal aguda (Avinash et al., 2017), maior risco de desenvolvimento de osteoporose e, conseqüentemente, aumento do risco de fraturas (van der Hoorn et al., 2015). As medidas não farmacológicas envolvendo a nutrição e recomendações dietéticas é reconhecidamente uma forma de promover a saúde, prevenir e tratar doenças no trato gastrointestinal, havendo um interesse especial no uso de probióticos (Vomero et al., 2014).

1.2 Probióticos

Probióticos são micro-organismos vivos que podem ser incluídos na preparação de diversos produtos, incluindo alimentos, medicamentos e suplementos

dietéticos capazes de melhorar o equilíbrio intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (FAO/OMS, 2001; Khoder et al., 2016).

Os probióticos incluem bactérias lácticas e leveduras na forma liofilizada ou de produto fermentado, e os gêneros mais utilizados de bactérias são os gêneros *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus*, em particular a espécie *Lactobacillus acidophilus*. Estes gêneros estão presentes nos iogurtes e produtos lácteos fermentados. As leveduras também são empregadas em especial a espécie *Saccharomyces cerevisiae* (Bengoa et al., 2017).

1.2.1 Kefir

O kefir é um leite fermentado produzido a partir de grãos que compreendem uma mistura específica e complexa de bactérias e leveduras que vivem em uma associação simbiótica (Iraporda et al., 2017; de la Fuente et al., 2017; Lopitz-Otsoa et al., 2006). Os produtos gerados pelos grãos de kefir são ácidos lácticos, dióxido de carbono, produtos de degradação de proteínas, diacetil e acetaldeído (Orhan et al., 2012).

A composição nutricional do kefir varia de acordo com a composição do leite, composição microbiológica dos grãos utilizados, o tempo/temperatura de fermentação e as condições de armazenamento. O teor de ácido láctico varia de 0,6-1mL por 100mL do produto fermentado e a composição de proteínas de 3-4g, gorduras 1,5 e 2,0 a 3,5 g de lactose. As leveduras presentes aumentam o valor biológico do leite com aumento da produção de vitaminas complexo B (Bashali et al., 2017).

Uma das características dos probióticos é a capacidade de um micro-organismo sobreviver ao trato gastrointestinal. Portanto, as bactérias precisam sobreviver ao trânsito gástrico e chegar ao intestino resistindo ao pH ácido do estômago (Amund, 2016, Bengoa et al., 2017).

Essas bactérias colonizam o intestino e exercem efeito de barreira contra patógenos através de uma variedade de mecanismos como ação antimicrobiana, competição por nutrientes ou competição por nichos (Balzaretti et al., 2016; Zhong et al., 2017). Existe uma grande aceitação pelo público para o consumo de probióticos e o kefir na Europa Oriental é considerado um probiótico natural (Rodrigues et al., 2005).

O kefir é originário das montanhas do Cáucaso, Mongólia e Tibete. A origem da palavra vem do turco *Keyif* que significa “bem-estar”, “bem viver” e

acredita-se ser o sentimento experimentado quando consumido (Baschali et al., 2017).

Recentemente, o kefir despertou o interesse na comunidade científica devido aos seus inúmeros efeitos benéficos para a saúde (Walsh et al., 2016). É historicamente relatado como uma bebida probiótica com grande potencial na promoção da saúde, além de ser um alimento seguro, barato e facilmente produzido em casa.

O consumo regular de kefir tem sido associado à melhor digestão e tolerância à lactose, possuiu efeito antibacteriano, hipocolesterolêmico, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, antioxidante, anticarcinogênico, antialergênico e com capacidade de cicatrização tecidual além de controle de glicemia. Uma grande proporção dos estudos que apoiam esses achados foram conduzidos *in vitro* ou em modelo animal (Bourrie et al., 2016; Rosa et al., 2017; Choi et al., 2017; Xing et al., 2017). O potencial antioxidante é uma importante propriedade nutricional dos alimentos, uma vez que o estresse oxidativo está envolvido na maioria das doenças (Fardet et al., 2017) e é o fator subjacente envolvido na patogênese das úlceras.

Embora existam diversos fármacos disponíveis utilizados para tratamento e também como protetores da mucosa gástrica prevenindo lesões, com destaque para os inibidores de bomba protônica (IBPs) os estudos mais recentes demonstram que essa classe de medicamentos tem uma associação com o desenvolvimento de algumas doenças graves, quando usados cronicamente e muitas vezes de forma inapropriada, especialmente em indivíduos que requerem também o uso freqüente de AINEs (Naunton et al., 2017).

Em todo o mundo existe a preocupação de promover a prevenção de úlceras causadas pelo uso de anti-inflamatórios, principalmente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, que convivem com o aumento da expectativa de vida.

O envelhecimento da população vem acompanhada do uso frequente de duas classes de medicamentos que não são isentas de complicações e somando-se a isso tem crescido o interesse mundial voltado para a prevenção de doenças através da nutrição, e os probióticos como o kefir mostrou-se benéfico em diversas patologias, mas ainda há poucos estudos que apontam a relação do kefir como um agente gastroprotetor, existindo uma lacuna na literatura.

Portanto, faz-se necessário o estudo de terapias alternativas não medicamentosas que possam minimizar os efeitos adversos dos AINEs sobre a

mucosa gástrica, e ao mesmo tempo, não interferirem com a absorção de nutrientes, levando prejuízos à saúde do indivíduo, como ocorre com os IBPs, justificando o desenvolvimento desse desenho experimental.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito gastroprotetor do kefir sobre o estresse oxidativo em camundongos submetidos à lesões por indometacina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do tratamento do kefir durante 14 dias sobre:

- ✓ Estômago:
 - O pH do suco gástrico;
 - Percentual de lesões macroscópicas na mucosa gástrica.

- ✓ Sangue periférico:
 - A produção de espécies reativas de oxigênio, viabilidade e apoptose nas células sanguíneas;
 - Avaliar o ciclo celular e determinar o conteúdo e fragmentação de DNA.

- ✓ Plasma:
 - Verificar a oxidação proteica plasmática (AOPP).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Este estudo foi realizado em camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, adultos, machos, pesando entre 30-40g, provenientes do Biotério da Universidade Vila Velha (UVV), mantidos em gaiolas de plástico com maravalha, aclimatizados com temperatura controlada de 22 ±2°C, ciclo claro-escuro de 12-12 horas controlados automaticamente, recebendo ração e água *ad libitum*.

Os animais foram colocados em jejum sólido de 16 horas, antes da realização de cada experimento em que a via oral foi utilizada para a absorção do fármaco.

Os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê Institucional Animal (CEUA-UVV, nº404-2016). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes de cuidado e uso de animais de laboratório, como recomendado pelo National Institutes of Health (NIH).

3.2. Preparação e administração do Kefir

A identificação, preparação e administração do Kefir foram realizadas como descritos por Friques et al., 2015. Os grãos foram cedidos originalmente pela Universidade de Viçosa para a UVV e adicionados em leite integral (UHT- Ultra High Temperature), com tratamento térmico adequado, pasteurizado e resfriado, na proporção de 4% (m/v).

O leite inoculado com os grãos foi mantido em temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, esses grãos foram filtrados através de peneira de plástico e o produto resultante foi então refrigerado entre 5°C a 15 °C, permitindo assim o crescimento e multiplicação de leveduras no período de 24 horas. Após esse período, foram feitas alíquotas de kefir em tubos eppendorffs estéreis e armazenados a -20°C até a sua utilização.

3.3. Grupos experimentais e tratamento de animais

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais. O tratamento se deu por 14 dias. O grupo leite (n=10) recebeu leite integral com pH ajustado para 4,5 (3mL/100g de peso corporal) água potável e ração padrão; o grupo lansoprazol (n=10) recebeu lansoprazol (n=10) na dose de 30mg/kg de peso (UlcerStop®-

DiffucapChemobras®), água potável e ração; e o grupo kefir(n=10) recebeu água e ração padrão e kefir (0,3mL/100g de peso) (Friques et al., 2015).

O peso corporal dos animais foi medido no início e término do tratamento para o cálculo da dose a ser administrada. A via escolhida foi oral, por gavagem. Ao final do tratamento, no 14º dia, os animais foram colocados em jejum de sólidos por 16 horas.

Para indução de lesão gástrica, foi administrada indometacina manipulada (Fagron®), na dose de 40mg/kg de peso, por gavagem (Nagai et al., 2009). Seis horas depois, os animais foram eutanasiados com Tiopental sódico (Cristália, São Paulo, Brasil, 100mg/kg) por via intraperitoneal (i.p).

A coleta de sangue se fez por punção cardíaca no ventrículo direito para análise de biomarcadores de estresse oxidativo, apoptose, viabilidade e fragmentação de DNA por citometria de fluxo. O Plasma foi separado para avaliação de oxidação proteica. A remoção do estômago foi realizada para análises macroscópicas de lesões e medidas do pH do suco gástrico.

3.4. Coleta de sangue para análise de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para o estudo de estresse oxidativo, os animais foram submetidos à toracotomia para exposição do coração e o sangue foi coletado por punção cardíaca do ventrículo direito, sendo coletado 1mL de sangue, transferido para tubos eppendorffs contendo solução de EDTA para análise de ROS

3.5. Análise de lesões macroscópicas

Após eutanásia e perfusão dos órgãos através de punção cardíaca e infusão contínua de PBS, os estômagos foram removidos, abertos pela curvatura maior e, posteriormente, prensados em placas de vidro. As imagens foram obtidas por câmera digital para análise da área de lesão, através do *software "Image J"* (Image-J 1.35 d, USA), de domínio público.

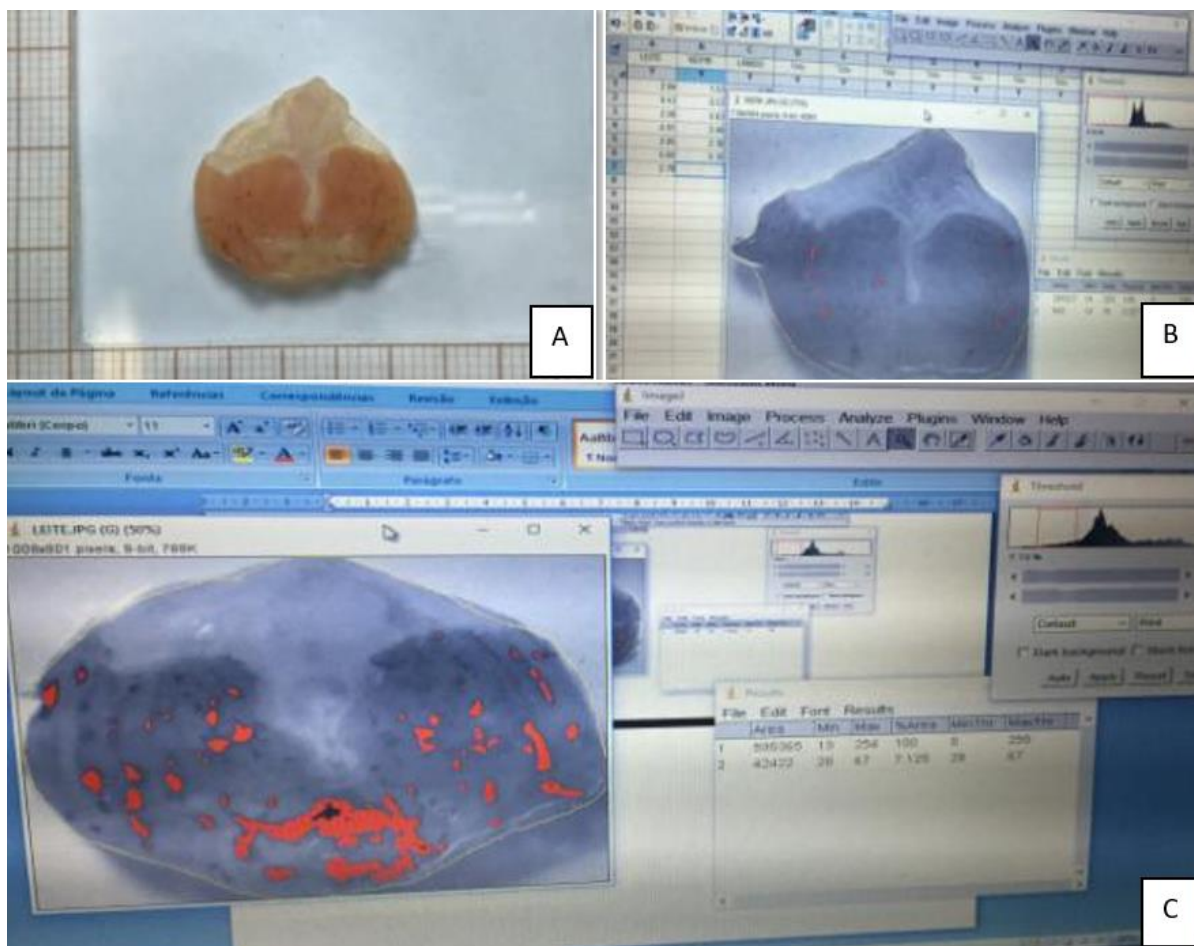


Figura 1. Etapas para análise de lesões macroscópicas. (A) Estômago aberto pela curvatura maior, com o fundo gástrico na parte superior, prensado em placas de vidros com papel milimetrado. (B) Imagens obtidas pelo programa *Image J*. (C) Área calculada pelo programa após a seleção da área lesada da mucosa em vermelho.

3.6. Determinação de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP)

Os AOPPs são formados através da ação do estresse oxidativo sobre proteínas e aminoácidos, sendo um marcador de estresse oxidativo. O plasma separado foi diluído 1:15 em PBS sem necessidade de preparo prévio.

Na determinação dos valores plasmáticos de AOPP, foram usadas alíquotas de 40 µl das amostras, diluídas em 160 µl de tampão fosfato (PBS), 10 µl de iodeto de potássio (KI) e 20 µL de ácido acético glacial numa leitora de microplacas de 96 poços de acordo com Witko-Sarsat et al.,1996), e acético glacial ultrapuro.

A leitura da absorbância das amostras foram feitas no comprimento de onda de 340nm em um leitor de microplacas (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) após agitação por seis minutos.

Os valores obtidos foram comparados a uma curva de calibração de 0 a 100µM realizadas com equivalentes de cloramina T. Os resultados foram

expressos em μM de cloramina T/mg de proteínas. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).



Figura 2. Etapas da leitura de microplaca contendo amostras de plasma para verificação de AOPP.

3.7. Determinação dos níveis de ROS por citometria de fluxo

Para a determinação da produção citoplasmática de $\cdot\text{O}_2$, H_2O_2 , NO , $\text{ONNO}^-/\cdot\text{OH}$, foram utilizados os corantes dihidroetídeo (DHE-160 μM), diclorofluorosceína (DCF-20mM), diaminofluoresceína (DAF- 2mM), e HPF (5 μM), respectivamente. Para isso 1×10^6 células/ml foram incubadas, no escuro por 30 minutos a 37°C (DHE, DCF, HPF) e 180 minutos (DAF) (Campagnaro et al., 2013).

3.8. Determinação de viabilidade e apoptose celular

Apoptose significa morte celular programada. Faz parte de um processo fisiológico, quando a célula recebe sinalização para autodestruição. (Salgame et. al., 1997). O iodeto de propídeo (PI) foi utilizado em conjunto com anexina V para permitir a identificação de células em estágio inicial e final de apoptose (Campagnaro et al., 2013).

As células isoladas foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas a 1200 rpm, durante 10 minutos. Para cada animal, foi separada uma amostra de 100 μL , correspondente a, aproximadamente, 10^6 células em um tubo, acrescentado 400 μL de Binding Buffer.

Posteriormente, foram transferidos 100 μL dessa amostra para tubos de citometria. Acrescentou-se 2,5 μL de anexina-FITC e/ou 2,5 μL de PI. Após essa etapa, as amostras foram passadas no vortex e incubadas por 15 minutos no

escuro. Em seguida, foram acrescentados 400µL de Binding Buffer uma vez em cada tubo e feita a aquisição de 1000 eventos no citômetro (FACS Canto II, Becton Dickinson, San Juan, CA, EUA). Neste ensaio, é possível determinar a proporção de células vivas (anexina V-/PI-); células em estágio inicial de apoptose, onde a fosfatidilserina está exposta na membrana e cora com anexina V (anexina V+/PI-); e células em estágio final de apoptose, onde há dupla marcação por colapso da membrana plasmática (anexina V+/PI+). Consideramos células anexina V+ como células em apoptose.

3.9. Análise de conteúdo de DNA

Este protocolo determina o conteúdo de DNA das células marcadas com o PI através da citometria de fluxo. O PI é um marcador de fluorescência que atravessa a membrana plasmática de células permeáveis à sua passagem e coram o DNA das mesmas.

Uma quantidade de 10^6 células foram ressuspensas e fixada em 1mL de etanol 70% por pelo menos 2 horas a -20°C . As células foram lavadas e ressuspensas em 1mL de PBS gelado e incubadas com 200µL de solução de coloração (200µL de RNase S (20mg/mL), 800µL de PI (500µL/mL), 20 µL de Triton X-100, Q.s.p 20µL de PBS 1x) por 30 minutos, no escuro, a 4°C .

Em seguida, essas células foram centrifugadas com 1200 rpm durante 10 minutos e ressuspendidas em 1mL de PBS. Uma suspensão de células de concentração de 10^6 foi incubada com 2µL de PI (500µg/mL) por um período de 5 minutos, no escuro e em temperatura de 25°C . As amostras de células foram lavadas posteriormente com PBS e analisadas pelo citômetro (FACS Canto II, Becton Dickinson, San Juan, CA, EUA).

As células foram excitadas a 488nm para a detecção da fluorescência do PI, utilizando-se um filtro de 585/42. Para a quantificação da viabilidade foram adquiridos 10.000 eventos por leitura e os dados foram expressos pela relação percentual de células não viáveis/ células viáveis

3.10. Ensaio do Cometa Alcalino

O ensaio do Cometa Alcalino é uma técnica bem validada para avaliar o dano do DNA em células individuais (Rodrigues et al., 2013). Em 1984 Ostling e Johanson desenvolveram a técnica em pH neutro com limitação em seus experimentos. Singh em 1988 aperfeiçoou a técnica utilizando um pH de 13. O que

fez aumentar a velocidade de migração do DNA (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000). As lâminas histológicas de vidro fosco foram pré-tratadas com uma camada de agarose 1,5% de ponto de fusão normal (*Normal Melting Point –Agarose –NMA*) dissolvida em PBS e mantida a 65°C e secaram em temperatura ambiente por 24 horas e foram armazenadas a 4°C. Posteriormente, 20µL de suspensão de 10⁴ células foram misturadas com 100µL de agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point Agarose-LMA*) a 1% dissolvida em PBS e mantida a 37°C em banho-maria. A mistura contendo agarose LMA e a suspensão de células foi espalhada sobre as lâminas de primeira camada que foram cobertas por lamínulas e resfriadas a 4°C por cerca 30 minutos para a polimerização da agarose.

Em seguida, as lamínulas foram removidas cuidadosamente e as lâminas submersas em solução de lise contendo 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, gelada e recém preparada. A lise se deu por 1 hora, a 4°C e protegida da luz, com a finalidade de rompimento das membranas celulares. Com o objetivo de inibir as enzimas reparadoras do DNA, as lâminas foram lavadas com água gelada e posteriormente com PBS e dispostas em uma cuba de eletroforese e recobertas por solução tampão alcalino (300mM NaOH e 1 mM EDTA, pH>13), durante 40 minutos em temperatura de 4 °C, onde permaneceram em repouso para a desnaturação das proteínas histonas, o que permitiu o desnovelamento do DNA. A eletroforese foi realizada a 4°C por 20 minutos, com amperagem à 300mA e 32 V (1V/cm). Ao final da eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba cuidadosamente e submetidas à etapa de neutralização com solução tampão (TRIS-HCl 0,4M, pH 7, 5), lavadas em três ciclos de 5 minutos cada, secadas ao ar e fixadas em metílico 100% por 2 minutos.

Para a análise citológica, as lâminas foram coradas com 40µL de brometo de etídeo (20µg/ml) e cobertas por lamínulas. As células foram analisadas no microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TI, Melville, NY, USA) em objetiva de 20x, com filtro de excitação de 420-490 nm e filtro de barreira de 520nm. As imagens foram adquiridas por uma câmera digital (Nikon) e analisadas por um programa de domínio público CASP 98. Foram utilizados os parâmetros porcentagem de DNA na cauda e o momento da cauda para analisar o dano no DNA. Finalmente, foram analisadas as imagens de 50 células selecionadas aleatoriamente de cada amostra obtida a partir de lâminas duplicadas de cada animal. Foi utilizado o programa CASP 98 de domínio público para calcular os parâmetros de porcentagem de DNA na cauda e momento da cauda (Figura 3).

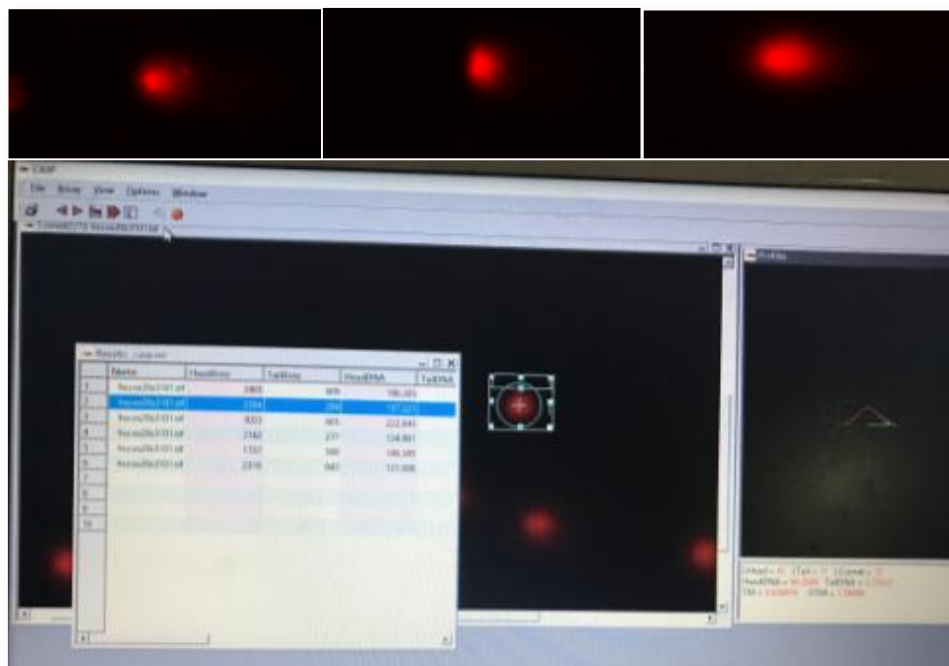


Figura 3. Ensaio do Cometa Alcalino. Painel superior imagens representativas dos cometas nos três grupos diferentes. Painel inferior, imagem do programa Casp 98, domínio público, utilizado para o cálculo de parâmetros de dano ao DNA.

3.11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), uma via, seguido de teste *post hoc* de Tukey, usando o software Prisma (Prisma 6.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. pH gástrico

A Figura 4 apresenta os valores de pH do suco gástrico nos três grupos. O kefir, apesar de ser uma bebida fermentada acidificada, ligeiramente carbonada e com pequenas quantidades de álcool, no estômago não foi capaz de reduzir o pH intraluminal.

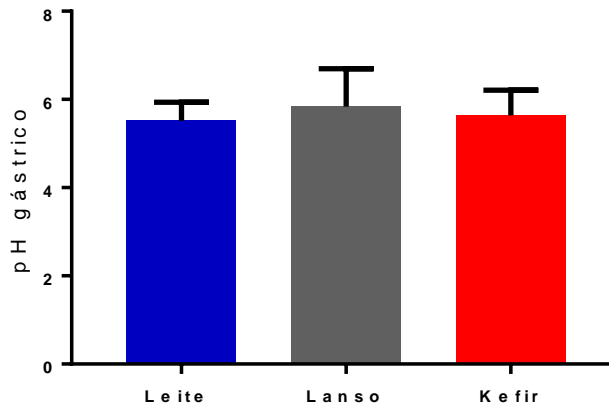


Figura 4: Variação do pH do suco gástrico. Os animais (n=10) tratados com kefir não apresentaram diferença estatisticamente significativa no valor do pH do suco gástrico ($5,63 \pm 0,28$) quando comparados aos grupos leite e lansoprazol ($5,15 \pm 0,21$; $5,84 \pm 0,41$) respectivamente. (ANOVA uma via seguida de post- hoc de Tukey $p > 0,05$).

4.2. Lesões gástricas macroscópicas

A Figura 4 representa o efeito gastroprotetor com bases nas lesões gástricas induzidas por indometacina. Os animais que receberam kefir apresentaram menor número de lesões gástricas comparados ao grupo leite e ao grupo lansoprazol ($0,6\% \pm 0,1 \text{ mm}^2$; $3,2\% \pm 0,3 \text{ mm}^2$; $1,0\% \pm 0,2 \text{ mm}^2$; respectivamente) $*p < 0,05$.

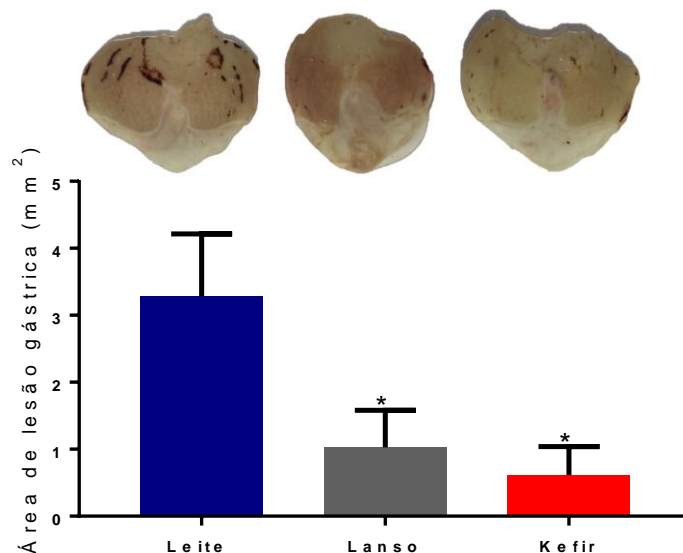


Figura 5. Os camundongos tratados por 14 dias com kefir e lansoprazol apresentaram menor área de lesão macroscópica quando comparados ao grupo leite (* $p < 0,05$). Os valores estão expressos em média \pm EPM para um $n = 10$ animais por grupo. (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

4.3. Análises de estresse oxidativo (ROS) por citometria de fluxo

O mecanismo de lesão da mucosa gástrica envolve a participação das ROS no dano celular e a perfusão do tecido gástrico mantido pelo óxido nítrico. Avaliamos os níveis intracelulares de ROS nas células sanguíneas nos três grupos estudados. Conforme ilustrado na Figura 6A. Mostramos que o tratamento com kefir e lansoprazol foram semelhantes na redução de produção de ROS. O gráfico 6A mostra que a produção de H_2O_2 (2003 ± 163 a.u.) no grupo kefir foi menor em comparação ao grupo leite (3219 ± 213 a.u., * $p < 0,05$) e grupo lansoprazol (1685 ± 133 a.u.). Na figura 6B a produção de óxido nítrico no grupo kefir foi maior (4532 ± 293 a.u.) quando comparados aos outros dois grupos, leite e lansoprazol (2795 ± 146 ; 2653 ± 103 a.u., * $\#p < 0,05$, respectivamente). Com relação à produção de $\bullet O_2^-$ (Figura 6C), e $ONOO^-$ (Figura 6D), a produção dessas espécies reativas foi menor no grupo kefir ($\bullet O_2^-$ 2086 ± 168 ; $ONOO^-$ 825 ± 126 a.u.) com relação aos grupos leite ($\bullet O_2^-$ 25571 ± 333 ; $ONNO^-$ 2473 ± 191 a.u., $p < 0,05$) e ($\bullet O_2^-$ 1937 ± 276 ; $ONOO^-$ 704 ± 305 a.u., * $p < 0,05$).

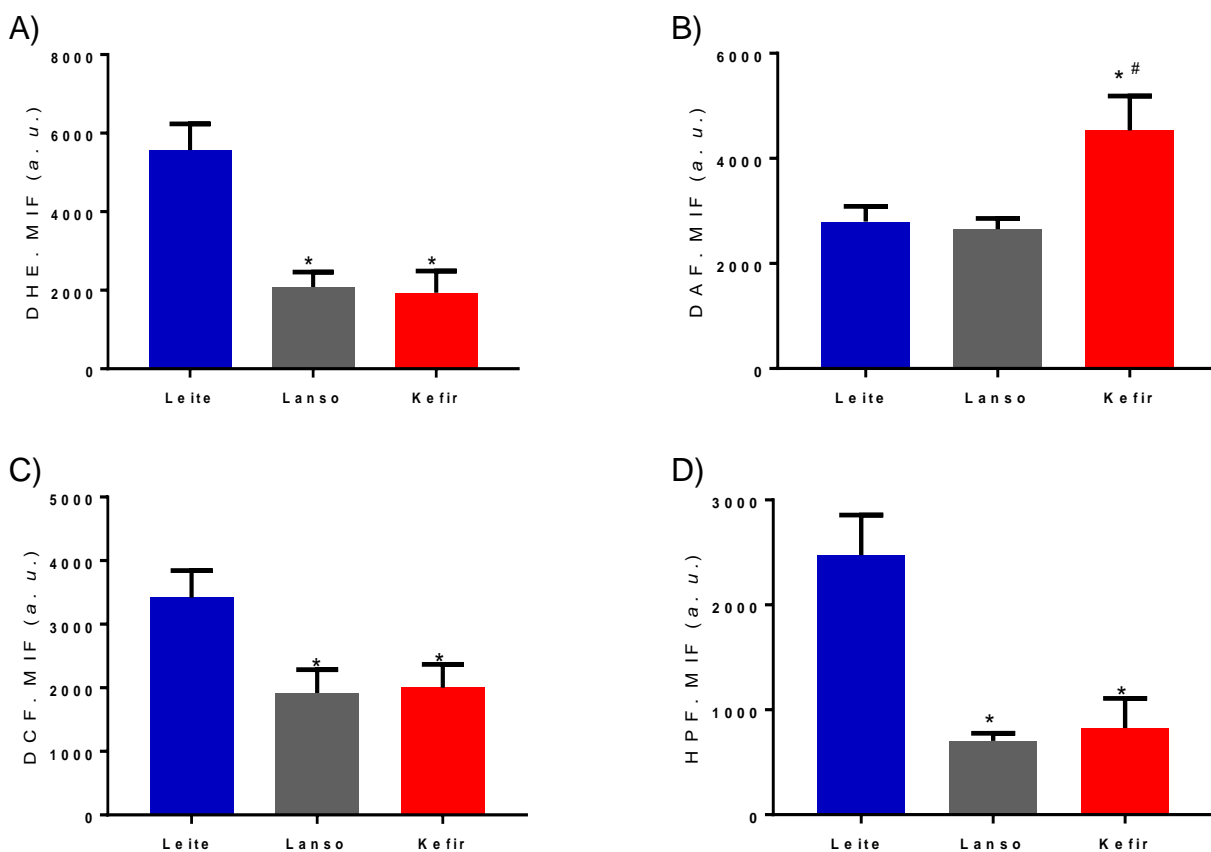


Figura 6. Produção de ROS por citometria de fluxo. A) Gráfico mostra a produção de H_2O_2 nos três grupos. O grupo kefir e o grupo lansoprazol apresentaram menor produção de peróxido de hidrogênio. * $p < 0,05$. B) Gráfico indica a biodisponibilidade do óxido nítrico. O grupo kefir apresentou maior produção de NO em comparação aos grupos leite * $p < 0,05$ e lansoprazol # $p < 0,05$. C) Gráfico evidencia que tanto o grupo kefir como o grupo lansoprazol apresentou menor produção ânions superóxido D) Gráfico mostra que os animais (n=10 por grupo) tratados com kefir e lansoprazol apresentaram menor produção de peroxinitrito quando comparados ao grupo Leite. * $p < 0,05$, n=10 animais por grupo. (ANOVA uma via, seguida de *post-hoc* de Tukey)

4.4. Oxidação proteica no plasma

A figura 7 mostra o resultado de AOPP, um marcador de estresse oxidativo que serve para mensurar o dano oxidativo de proteínas. Nesse gráfico grupo kefir reduziu a produção de AOPP (~2,6 vezes) quando comparados ao grupo leite (* $p < 0,05$), e a diferença para o grupo lansoprazol não foi estatisticamente significante.

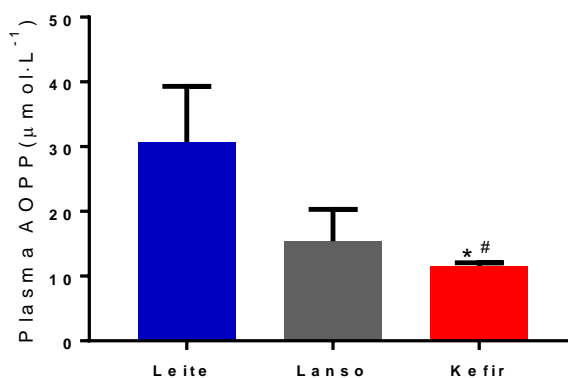


Figura 7. Produtos Avançados de Oxidação Proteica no plasma sanguíneo. Os animais (n=10) do grupo kefir apresentaram menor produção de AOPP. *# $p < 0,05$ vs. grupo leite e lansoprazol. (ANOVA uma via seguido de *post hoc* Tukey).

4.5. Apoptose e viabilidade em células sanguíneas

A apoptose celular foi investigada nas células sanguíneas por citometria de fluxo. A figura 8 indica que o grupo kefir (12,54±1,76%) reduziu o número de células apoptóticas em ~2,3 vezes (* $p < 0,05$) em comparação ao grupo leite (29,36±2,39%) e não houve diferença significativa quando comparados com o grupo lansoprazol (17,66%±1,19%). Quanto à viabilidade celular (Figura 10), o grupo kefir apresentou maior percentual de células viáveis (83,5%± 3,2*# $p < 0,05$) quando comparados aos outros grupos (leite: 52,7%±2,62 e lansoprazol: 60,18%±4,33).

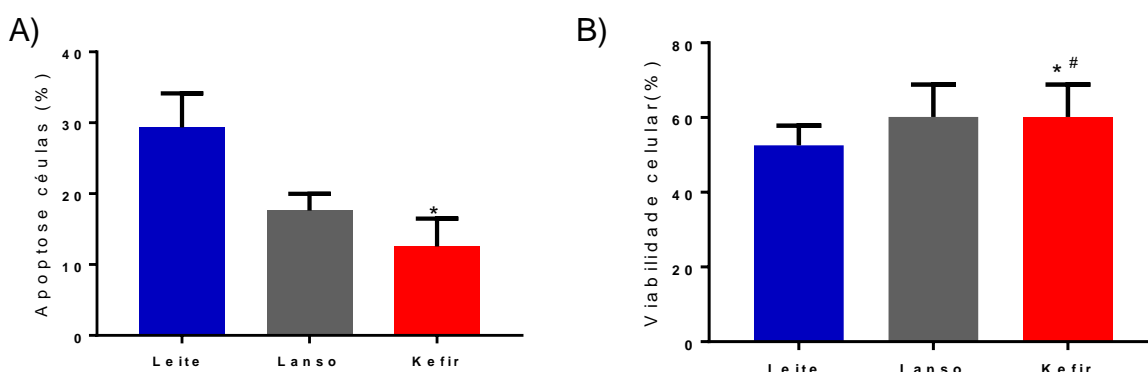


Figura 8. A) Percentual de células em apoptose precoce (marcadas com Anexina V-FITC). Os animais do grupo kefir confirmam menor percentual de células apoptóticas. Os valores indicam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. grupo leite e lansoprazol, $n = 10$ por grupo. B) Porcentagem de células viáveis (sem marcação PI). Nota-se aumento do percentual de células viáveis no grupo kefir * $p < 0,05$ vs. grupo leite e # $p < 0,05$ vs. grupo lansoprazol. (ANOVA uma via seguido de *post hoc* Tukey).

4.6. Ciclo Celular

A fragmentação do DNA pode ser quantificada a partir da observação do conteúdo de DNA em ensaios de ciclo celular com o iodeto de propídeo (PI). Neste ensaio, avaliamos a população de células na fase subG0 no ciclo celular. O nosso estudo demonstrou (Figura 11) que o kefir apresenta um menor percentual de células nessa fase do ciclo celular o que significa que houve menor grau de fragmentação do DNA da célula dos animais tratados com kefir.

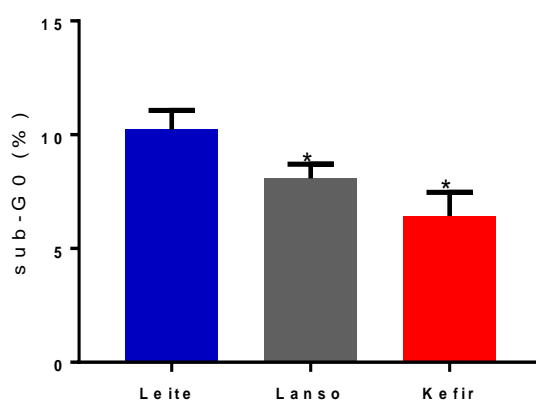


Figura 9. Fração de células na fase SubG0 do ciclo celular. Os camundongos tratados com kefir apresentam menor percentual de células na fase subG0 quando comparados ao grupo leite e lansoprazol ($6,43 \pm 0,46\%$; $10,22 \pm 0,43\%$; $8,08 \pm 0,31\%$, * $p < 0,05$). Os valores estão expressos em média \pm EPM para um $n = 10$ animais por grupo. (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

4.7. Detecção do dano ao DNA pelo Ensaio Cometa

A avaliação do estresse oxidativo genotóxico pelo Ensaio Cometa (Figura 10A) indicou menor dano ao DNA do grupo kefir ($7,48 \pm 0,85\%$) comparado ao grupo leite ($14,39 \pm 1,39\%$) e não houve diferença significativa quando comparado ao grupo lansoprazol ($6,18 \pm 0,63\%$). Outro parâmetro avaliado foi o momento de cauda (Rodrigues et al., 2013). Esta análise demonstrou uma redução da fragmentação do DNA no grupo kefir ($6,16 \pm 0,49$ a.u., $*p < 0,05$) em comparação com os camundongos do grupo leite e lansoprazol ($13,75 \pm 0,68$ e $10,2 \pm 0,75$ a.u., respectivamente, 10B).

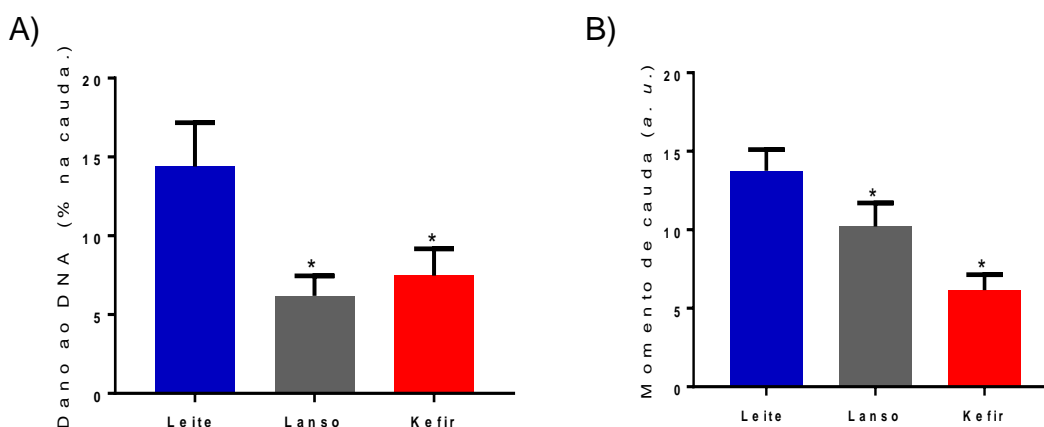


Figura 10. Kefir reduz dano ao DNA e aumenta a viabilidade celular em células sanguíneas. A) Representa o percentual de DNA na cauda, demonstrando menor fragmentação do DNA no grupo kefir através do Ensaio Cometa B) O gráfico representa o momento da cauda (~ 2vezes menor que o grupo leite). Os valores são expressos em média \pm EPM para $n=10$ ($* p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que a administração do kefir por 14 dias, em camundongos *Swiss* não acidificou o pH do suco gástrico e e ainda reduziu o percentual de lesões macroscópicas na mucosa gástrica. O tratamento com kefir também reduziu os níveis sistêmicos de ROS, oxidação proteica, apoptose, fragmentação do DNA, número de células na fase subG0 do ciclo celular bem como aumentou a viabilidade celular e a biodisponibilidade de óxido nítrico. A redução do estresse oxidativo sistêmico foi o principal mecanismo para o kefir promover seu efeito de proteção da mucosa gástrica.

Terapeuticamente, houve um maior interesse no uso de probióticos para a prevenção e tratamento de uma série de distúrbios gastrointestinais, e teoricamente, os probióticos podem exercer sua ação também na mucosa gástrica (Russo et al., 2014).

Nossos resultados evidenciaram que o pH do suco gástrico nos animais tratados com kefir foi semelhante ao grupo tratado com lansoprazol, com os valores de pH de 5,3 e 5,84 respectivamente. O lansoprazol é um IBP considerado muito eficaz na prevenção de úlceras pépticas, porque ele suprime a secreção de ácido clorídrico, através da inibição da enzima $H^+K^+ATPase$ que efetua a trocas dos íons potássio (K^+) que estão dentro das células parietais gástricas com os íons hidrogênio (H^+) do plasma. Os íons hidrogênio (H^+) se unem aos íons cloreto (Cl^-) dentro da célula formando o ácido clorídrico que é então secretado. Quando a enzima é bloqueada o pH intragástrico atinge valores superior a 4 (James et al., 2009).

O pH do kefir situa-se entre 4,2-4,6 e essa acidez auxilia na absorção e utilização de nutrientes pelo organismo. Sugere-se que o kefir reduza a atividade péptica através da neutralização da secreção ácida por meio de inibição das bombas protônicas e estimulação da secreção de muco. Porém, esses mecanismos permanecem desconhecidos (Fahmy et al., 2015).

Embora vários estudos clínicos envolvendo probióticos, em especial o kefir, indiquem ação benéfica na mucosa gástrica, em sua maioria o destaque é para a sua ação antimicrobiana e anticancerígena como um adjuvante no tratamento da erradicação do *Helicobacter pylori*, já que essa bactéria coloniza 50% da população mundial e possui cepas que tem relação com o câncer gástrico e é também considerada a primeira causa de úlcera péptica (Liu et al., 2017), ficando os AINEs

em segundo lugar. Notadamente, os AINEs são uma classe de medicamento muito prescrita, sobretudo em indivíduos idosos e, por consequência de sua ação deletéria na mucosa gástrica, é comum a prescrição associada de IBPs. Não existem muitos estudos correlacionando o uso do kefir como gastroprotetor e os nossos resultados apontam para essa importante associação.

Por ter ação tóxica direta, os AINEs resultam em acúmulo intracelular e também agem indiretamente através da inibição da enzima ciclooxigenase (COX): COX 1 e COX 2. A COX-1 tem funções fisiológicas estabelecidas e quando ativada, atuam no reparo da lesão superficial, sendo essencial para a manutenção do estado fisiológico normal de vários tecidos, sobretudo o tecido gástrico (Wallace, 2000). A inibição da COX 1 reduz a secreção de prostaglandinas, responsável por manter o equilíbrio de barreira com a manutenção da produção de muco, bicarbonato e aumentando a microcirculação sanguínea local (Orhan et al., 2012). Por esta via enzimática, a PG é sintetizada e liberada pelas células endoteliais, promovendo citoproteção (Batlouni, 2010). Já a COX-2 é encontrada em macrófagos, fibroblastos e células epiteliais, e são secretadas em locais de inflamação (Jackson et al., 1999; Hawkey CJ, 1999).

A indometacina, um AINE inibidor seletivo de COX 1, inibe a PG e com isso ocorre aumento do fator de necrose tumoral que leva a maior expressão de moléculas de adesão do epitélio aos neutrófilos, que se acumulam na microcirculação levando a obstrução do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica resultando da formação de úlceras. Isso ficou demonstrado no estudo Vivatvakin et al., 2017, que observou esse efeito na mucosa em ratos testando uma substância derivada da soja também com propriedades antioxidantes. Nossa análise de dano macroscópico da mucosa induzido por indometacina nos permitiu verificar que o kefir foi capaz de reduzir o percentual de lesões, sendo inclusive superior ao lansoprazol.

As ROS são produzidas em grandes quantidades no aparelho digestivo resultante de processo fisiológico de oxidação na mucosa. Quando ocorre um desequilíbrio entre fatores oxidantes e antioxidantes, o resultado é o aparecimento de lesões agudas e, como consequência, essas espécies reativas aumentam devido ao processo inflamatório, promovendo recrutamento de células secretoras de citocinas pró-inflamatórias, hidroxilação de DNA, desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica e apoptose (Wang et al., 2017).

No nosso experimento, utilizamos protocolos para quantificar as ROS no sangue através da citometria de fluxo e conseguimos documentar que o tratamento

com kefir foi capaz de reduzir a produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e radical hidroxila. Isso confirma a hipótese do efeito antioxidante do kefir corroborando com achados de outros estudos que observaram cepas específicas desse probiótico (Wang et al., 2017). O papel antioxidante dos probióticos é uma importante propriedade nutricional dos alimentos para o uso em doenças onde o estresse oxidativo está aumentado (Fardet et al., 2017).

Também conseguimos demonstrar que houve maior produção de óxido nítrico, podendo ser este, um fator contribuinte para o menor número de lesões na mucosa, pois no trato gastrointestinal o NO atua na manutenção da homeostase, sendo responsável por múltiplas funções fisiológica e pela integridade da barreira mucosa. Ele é uma molécula importante como sinalizadora de diversas funções, tais como regulação do apoptose, vasodilatação, neurotransmissão e carcinogênese. Na mucosa gástrica favorece o processo de cicatrização de úlceras (Bronw et al., 1994).

Diante dos nossos resultados, observamos que o estresse oxidativo é o mecanismo subjacente fundamental à patogênese das úlceras pépticas e os efeitos benéficos dos probióticos na mucosa gástrica conhecidos na literatura estão relacionados à proteção da mucosa e à estabilização da função de barreira, ação competitiva em relação às bactérias patogênicas, ação anti-inflamatória e efeitos na proliferação celular, e essas ações ocorrem através do aumento da produção de prostaglandinas, estimulação da angiogênese, liberação de substâncias antioxidantes, além de melhora na permeabilidade da mucosa e diminuição da sobrecarga bacteriana. Os probióticos têm a capacidade de modificar a flora intestinal e promovem impacto importante nas atividades do hospedeiro, não somente a nível local, mas também afetando a resposta imune (Ushida et al., 2014).

Trabalhos envolvendo o kefir como agente protetor gástrico são escassos na literatura, e os nossos resultados, bem como outros achados experimentais relacionados (Fahmy et al., 2015) confirmam a hipótese de que o uso profilático de kefir previne o surgimento de úlceras gástricas frente a um agente agressor, e esse efeito pode ser atribuído à sua capacidade antioxidante e antiapoptótica.

O kefir é um leite fermentado feito a partir na inoculação de grãos de kefir com leite comum ou água. Os grãos são uma mistura de bactéria e leveduras que vivem em uma associação simbiótica. É originário das montanhas do Cáucaso e tradicionalmente consumido na Europa Oriental, Rússia e Sudoeste da Ásia (Lopitz-Otsoa et al., 2006; Tamine 2006, Laureys et al., 2017).

Consiste principalmente, de bactérias fermentadoras de lactose *Lactobacillus* e *Leuconostoc* (*Lactobacillus casei*, *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. kefir*, *Leuconostoc mesenteroides* e *L. Mesenteroides sub.sp* e *Dextranicum*), bem como *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* e outras bactérias do ácido láctico. Outros organismos característicos são leveduras fermentadoras e não fermentadoras de lactose incluindo, principalmente, *Candida kefir*, e *Saccaromyces cerevisiae* respectivamente (Diosma et al., 2014). No Brasil a bebida é tradicionalmente produzida em casa e distribuída de pessoa a pessoa a partir de grãos iniciantes, mas já existem formas comerciais disponíveis (Zanirati et al., 2015).

No presente estudo, o kefir demonstrou efeito benéfico na mucosa, reduzindo a taxa de apoptose e fragmentação do DNA com aumento da viabilidade celular, como resposta aos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Uchida et al., 2010 relataram que lactobacilos inibem a formação de lesões agudas gástricas, através da geração de prostaglandinas. Nagaoka et al., 1994 mostrou efeito benéfico de Bifidobacterias na proteção da mucosa gástrica em lesões induzida por álcool em ratos e sugeriu que a regulação da apoptose, produção de mucina e proliferação e permeabilidade celular estavam implicadas no efeito gastroprotetor.

A proliferação celular e a apoptose são eventos essenciais para que haja renovação do epitélio gástrico. Trata-se de um processo fisiológico natural que regula o número de células. O equilíbrio entre a taxa de apoptose e a taxa de proliferação de células é o que mantém a homeostase do tecido (Elmore et al., 2007).

Através da citometria de fluxo, também foi possível avaliar o efeito do probiótico sobre o ciclo celular e verificar menor percentual de células na fase subG0/G1, demonstrando menor dano ao DNA da célula. Esses resultados estão de acordo com o encontrado na literatura sugerindo compostos bioativos do kefir, são capazes de reduzir o dano oxidativo na célula. Nos casos estudados de neoplasia, atuam de forma diferente, induzindo apoptose em células tumorais (Sharifi et al., 2017). Mais estudos são necessários para entender o caminho do kefir na modulação do apoptose nas lesões induzidas em mucosa gástrica.

Os dois estudos encontrados na literatura que relacionam gastroproteção e kefir são dos autores, Fahmy et al., 2015 e Orhan et al., 2012 e diferem do nosso, porque ambos utilizaram uma única fermentação do probiótico e sabe-se que o tempo de fermentação influencia diretamente na maior produção de compostos bioativos benéficos ao organismo. O kefir utilizado para o nosso estudo foi

submetido a dois processos de fermentação, e um estudo prévio realizados por pesquisadores do Laboratório de Fisiologia da UFES, detalhou a composição do grão que utilizamos com imagens geradas por microscopia eletrônica de varredura que demonstraram uma forte associação de um aglomerado de diferentes microrganismos em torno dos grãos, tendo a superfície externa um biofilme formado por bacilos curvos curtos e longos, em forte associação com uma matriz de polissacarídeo e na superfície interna foram observadas a presença de bacilos que crescem em associação com leveduras (Friques et al., 2015).

O kefir e seus constituintes possuem atividade antimicrobiana, antitumoral e imunomoduladora, trazendo benefício em diversas doenças e como demonstrado nesse estudo ele também proporciona um efeito benéfico na prevenção úlceras pépticas induzidas por indometacina.

6. CONCLUSÃO

No presente protocolo experimental, ficou evidente que a administração do kefir por um período de 14 dias foi capaz de proteger a mucosa gástrica de lesões induzidas por indometacina. O pH no suco gástrico do grupo Kefir foi semelhante ao pH do grupo que recebeu o lansoprazol e leite e as análises por citometria de fluxo, demonstraram que o Kefir foi capaz de reduzir a produção de ROS

Também ficou demonstrado um menor dano ao DNA da célula, com maior número de células viáveis e redução de apoptose. O mecanismo pelo qual o Kefir reduz as lesões gástricas se deve, em parte, à capacidade antioxidante atribuída às bebidas probióticas, já confirmadas em outros estudos envolvendo diversas patologias.

Portanto, o kefir pode ser um aliado importante a outras terapias farmacológicas na prevenção de úlceras pépticas, especialmente quando há necessidade do uso de anti-inflamatórios, conferindo benefícios à mucosa com sua proteção por mecanismos sistêmico na redução de estresse oxidativo.

7. REFERÊNCIAS

Abayasekara DR, Wathes DC. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999 Nov;61(5):275-87.

Al Khaja KAJ, Veeramuthu S, Isa HA, Sequeira RP. Prescription audit of NSAIDs and gastroprotective strategy in elderly in primary care. *Int J Risk Saf Med*. 2017;29(1-2):57-68. doi: 10.3233/JRS-170742. PubMed PMID:28885223.

Amund OD. Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacteria. *Can J Microbiol*. 2016 Sep;62(9):715-25. doi: 10.1139/cjm-2016-0186. Epub 2016 Jun 14. PubMed PMID:2746506.

Avinash A, Patil N, Kunder SK, Balaji O, Tilak A, Sori RK, Rao R. A Retrospective Study to Assess the Effect of Proton Pump Inhibitors on Renal Profile in a South Indian Hospital. *J Clin Diagn Res*. 2017 Apr;11(4):FC09-FC12. doi: 10.7860/JCDR/2017/26097.9752. Epub 2017 Apr 1. PubMed PMID: 28571164; PubMed Central PMCID: PMC5449810.

Balzaretti S, Taverniti V, Guglielmetti S, Fiore W, Minuzzo M, Ngo HN, Ngere JB, Sadiq S, Humphreys PN, Laws AP. A Novel Rhamnose-Rich Heteroexopolysaccharide Isolated from *Lactobacillus paracasei* DG Activates THP-1 Human Monocytic Cells. *Appl Environ Microbiol*. 2017 Jan 17;83(3). pii: e02702-16. doi: 10.1128/AEM.02702-16. Print 2017 Feb 1. PubMed PMID:27913418; PubMed Central PMCID: PMC5244303.

Baschali A, Tsakalidou E, Kyriacou A, Karavasiloglou N, Matalas AL. Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group. *Nutr Res Rev*. 2017 Jun;30(1):1-24. doi: 10.1017/S0954422416000202. Epub 2017 Jan 24. PubMed PMID: 28115036.

Bengoa AA, Llamas MG, Iraporda C, Dueñas MT, Abraham AG, Garrote GL. Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. *Food Microbiol*. 2018 Feb;69:212-218. doi: 10.1016/j.fm.2017.08.012. Epub 2017 Aug 19. PubMed PMID: 28941904.

Bi W, Hu L, Man MQ. Anti-ulcerogenic efficacy and mechanisms of edible and natural ingredients in NSAID-induced animal models. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2017 Jun 5;14(4):221-238. doi: 10.21010/ajtcam.v14i4.25. eCollection 2017. PubMed PMID: 28638885; PubMed PMC5471470.

Bourrie BC, Willing BP, Cotter PD. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Front Microbiol*. 2016 May 4;7:647. doi: 10.3389/fmicb.2016.00647. eCollection 2016. PubMed PMID:27199969; PubMed Central PMCID: PMC4854945.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54. PubMed PMDI:942051.

Brown J F, Tepperman BL, Hanson PJ. Lipopolysaccharide induces Ca²⁺ independent nitric oxide synthase activity in rat mucosal cells. *Eur J Pharmacol*, v. 292, p. 11-4, 1994.

Campagnaro BP, Tonini CL, Doche LM, Nogueira BV, Vasquez EC, Meyrelles SS. Renovascular hypertension leads to DNA damage and apoptosis in bone marrow cells. *DNA Cell Biol.* 2013 Aug;32(8):458-66. doi: 10.1089/dna.2013.2065. Epub 2013 Jun 20. PubMed PMID: 23786322; PubMed Central PMC3725873.

Castro LP. Defense mechanisms of gastroduodenal mucosa: a present view. *AMB rev. Assoc. Med. Bras*;34(1):5-13, jan.-fev. 1988.

Choi JW, Kang HLim WC, Kim MK, Lee IY, Cho HY. Kefir prevented excess fat accumulation in diet-induced obese mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017 May;81(5):958-965. doi: 10.1080/09168451.2016.1258984. Epub 2017 Jan 23W. PubMed PMDI: 28110622.

Cryer B, Mahaffey KW. Gastrointestinal ulcers, role of aspirin, and clinical outcomes: pathobiology, diagnosis, and treatment. *J Multidiscip Health.* 2014 Mar 3;7:137-46. doi: doi: 10.2147/JMDH.S54324. eCollection 2014. PubMed PMDI: 24741318; PubMed Central PMCID:3970722.

De la Fuente G, Jones E, Jones S, Newbold CJ. Functional Resilience and Response to a Dietary Additive (Kefir) in Models of Foregut and Hindgut Microbial Fermentation In Vitro. *Front Microbiol.* 2017 Jun 28;8:1194. 2017 Jun 28;8:1194. doi:10.3389/fmicb.2017.01194. eCollection 2017. PubMed PMID:28702019; PubMed Central PMCID: 5487516.

Diosma G, Romanin DE, Rey-Burusco MF, Londero A, Garrote GL. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014 Jan;30(1):43-53. doi: 10.1007/s11274-013-1419-9. Epub 2013 Jul 4. PMID:23824665.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495–516. PubMed PMID:17562583; PubMed Central PMCID:PMC 2117903.

Fahmy HA, Ismail AF. Gastroprotective effect of kefir on ulcer induced in irradiated rats. *J Photochem Photobiol B.* 2015 Mar;144:85-93. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.02.009. Epub 2015 Feb 18. PubMed PMID: 25728227.

Fardet A, Rock E. In vitro and in vivo antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: a narrative review of evidence. *Nutr Res Rev.* 2017 Oct 2:1-19. doi: 10.1017/S0954422417000191.

FAO/WHO, Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, 1-11, 2002.

Fardet A, Rock E. In vitro and in vivo antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: a narrative review of evidence. *Nutr Res Rev.* 2017 Oct 2;1-19. doi: 10.1017/S0954422417000191.

Frigues AG, Arpini CM, Kalil IC, Gava AL, Leal, MA, Porto ML, Nogueira BV, Dias AT, Andrade TU, Pereira TM, Meyrelles SS, Campagnaro BP, Vasquez EC. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Transl Med* 2015.Dec30;13:390. doi: 10.1186/s12967-015-0759-7. PubMed PMID:2615471; PubMed Central PMCID: PMC4696190.

Goldstein FC, Steenland K, Zhao L, Wharton W, Levey AI, Hajjar I. Proton Pump Inhibitors and Risk of Mild Cognitive Impairment and Dementia. *J Am Geriatr Soc.* 2017 Sep;65(9):1969-1974. doi: 10.1111/jgs.14956. Epub 2017 Jun 7. PubMed PMID: 28590010.

Goldstein JL, Cryer B. Gastrointestinal injury associated with NSAID use: a case study and review of risk factors and preventative strategies. *Drug Healthc Patient Saf.* 2015 Jan 22;7 : 31-41. doi 10.2147/DHPS.S71976. e Collection 2015. PubMed PMID 25653559; PubMed Central PMCID: PMC 4310346.

Guo OG, Yang J, Li Y, Xu J, Jiang J. Antioxidant activities of peel, pulp and seed of common fruits as determined by FRAP. *Nutrition Research*, v.23, p.1719, 2002. Elsevier, 2003.

Gomm W, von Holt K, Thomé F, Broich K, Maier W, Fink A, Doblhammer G, Haenisch B. Association of Proton Pump Inhibitors With Risk of Dementia: A Pharmacoepidemiological Claims Data Analysis. *JAMA Neurol.* 2016 Apr;73(4):410-6. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.4791. PubMed PMID:26882076.

Graham DY. History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2014 May 14; 20(18): 5191–5204. doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5191. PubMed PMID: 24833849; PubMed Central PMCID: PMC4017034.

Hawkey CJ. Is *Helicobacter pylori* eradication useful in patients taking NSAIDs? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999 Aug;11 Suppl 2:S47-50; discussion S73. PubMed PMID:10503823.

Iraporda C, Abatemarco Júnior M, Neumann E, Nunes AC, Nicoli JR, Abraham AG, Garrote GL. Biological activity of the non-microbial fraction of kefir: antagonism against intestinal pathogens. *J Dairy Res.* 2017 Aug;84(3):339-345. doi: 10.1017/S0022029917000358. PubMed PMID: 28831964.

Jackson LM, Hawkey CJ. Gastrointestinal effects of COX-2 inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*. 1999 Jul;8(7):963-71. PubMed PMID: 15992098.

Jackson LM, Hawkey CJ. NSAIDs and the GI tract-potential hazards and benefits. *Apoptosis*. 1999 Oct;4(5):397-402. PubMed PMID: 14634343.

James MM, Gabello M, Murray LJ, Farrel CP, Belows J, Wolov KR. Proton pump inhibitors: actions and Reactions. *Drug Discov Today*. 2009;14:13-14.

Khoder G, Al-Menhali AA, Al-Yassir F, Karam SM. Potential role of probiotics in the management of gastric ulcer. *Exp Ther Med*. 2016 Jul;12(1):3-17. Epub 2016 Apr 26. PubMed PMID: 27347010; PubMed Central PMCID: PMC4906699.

Konturek SJ, Bielański W, Płonka M, Pawlik T, Pepera J, Konturek PC, Czarnecki J, Penar A, Jedrychowski W. Helicobacter pylori, non-steroidal anti-inflammatory drugs and smoking in risk pattern of gastroduodenal ulcers. *Scand J Gastroenterol*. 2003 Sep;38(9):923-30. PubMed PMID: 14531527.

Kotani T, Kobata A, Nakamura E, Amagase K, Takeuchi K. Roles of cyclooxygenase-2 and prostacyclin/IP receptors in mucosal defense against ischemia/reperfusion injury in mouse stomach. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Feb;316(2):547-55. Epub 2005 Oct 19. PubMed PMID: 16236816

Lanas A, Chan FKL. Peptic ulcer disease. *Lancet*. 2017 Aug 5;390(10094): 613-624. Doi: 10.1016/S0140-6736(16)32404-7. Epub 2017, Feb 25. PubMed PMID: 28242110.

Laureys D, De Vuyst L. The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *J Appl Microbiol*. 2017 Mar;122(3):719-732. doi: 10.1111/jam.13370. PubMed PMID: 27930854.

Li W, Wang X, Zhi W, Zhang H, He Z, Wang Y, Liu F, Niu X, Zhang X. The gastroprotective effect of nobiletin against ethanol-induced acute gastric lesions in mice: impact on oxidative stress and inflammation. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2017 Sep 26:1-10. doi: 10.1080/08923973.2017.1379088. PubMed PMID: 28948855.

Liu Y, Pischetsrieder M. Identification and Relative Quantification of Bioactive Peptides Sequentially Released during Simulated Gastrointestinal Digestion of Commercial Kefir. *J Agric Food Chem*. 2017 Mar 8;65(9):1865-1873. doi: 10.1021/acs.jafc.6b05385. Epub 2017 Feb 23. PubMed PMID: 28195465.

Lopitz-Otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol*. 2006 Jun;23(2):67-74. PubMed PMID: 16854180.

Malcontenti-Wilson C, Schulz S, Penney AG, Andrews FJ, O'Brien PE. Aged gastric mucosa: Mechanisms of vulnerability. *J Gastroenterol Hepatol*. 1998 Nov;13(S3):S204-S208. doi: 10.1111/j.1440-1746.1998.tb01878.x. PubMed PMID: 28976664.

Malfertheiner P, Chan FK, McColl KE. Peptic ulcer disease. *Lancet*. 2009 Oct 24;374(9699):1449-61. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60938-7. Epub 2009 Aug 13

Malmi H, Kautiainen H, Virta LJ, Färkkilä MA. Outcomes of patients hospitalized with peptic ulcer disease diagnosed in acute upper endoscopy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2017;Nov;29(11):1251-1257. doi: 10.1097/MEG.0000000000000951. PubMed PMID: 28857894

Martins LC, Corvelo TCO, Oti HT, Barile KAS. Soroprevalência de anticorpos contra antígeno Cag A do *Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera gástrica na região Norte do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002;35:307-310.

Nagaoka M, Hashimoto S, Watanabe T, Yokokura T, Mori Y. Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biol Pharm Bull*. 1994 Aug;17(8):1012-17. PubMed PMID: 7820099.

Nagai N, Fukuhata T, Ito Y, Usui S, Hirano K. Involvement of interleukin 18 in indomethacin-induced lesions of the gastric mucosa in adjuvant-induced arthritis rat. *Toxicology*. 2009 Jan 31;255(3):124-30. doi: 10.1016/j.tox.2008.10.005. Epub 2008 Oct 17. PubMed PMID: 18996434.

Najm WI. Peptic ulcer disease. *Prim Care*. 2011 Sep;38(3):383-94, vii. doi: 10.1016/j.pop.2011.05.001. PubMed PMID: 21872087.

Naunton M, Peterson GM, Deeks LS, Young H, Kosari S. We have had a gutful: The need for deprescribing proton pump inhibitors. *J Clin Pharm Ther*. 2017 Sep 11. doi: 10.1111/jcpt.12613.

Nieto Y. Protocolo terapêutico de la úlcera péptica. *Medicine*. 2012; 11:179-82.

Orhan YT, Karagözlü C, Sarioğlu S, Yılmaz O, Murat N, Gıdener S. A study on the protective activity of kefir against gastric ulcer. *Turk J Gastroenterol*. 2012 Aug;23(4):333-8. PubMed PMID: 22965503.

Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Aug 30;123(1):291-8. PubMed PMID: 6477583.

Pilotto A, Franceschi M, Leandro G, Paris F, Cascavilla L, Longo MG, Niro V, Andriulli A, Scarcelli C, Di Mario F. Proton-pump inhibitors reduce the risk of uncomplicated peptic ulcer in elderly either acute or chronic users of aspirin/non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004 Nov 15;20(10):1091-7. PubMed PMID: 5569111.

Rodrigues KL, Carvalho JC, Schneedorf JM. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. *Inflammopharmacology*. 2005;13(5-6):485-92.

Rosa DD, Dias MMS, Grześkowiak ŁM, Reis SA, Conceição LL, Peluzio MDCG. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev.* 2017 Jun;30(1):82-96. doi: 10.1017/S0954422416000275. Epub 2017 Feb 22. PubMed PMID: 28222814.

Russo F, Linsalata M, Orlando A. Probiotics against neoplastic transformation of gastric mucosa: effects on cell proliferation and polyamine metabolism. *World J Gastroenterol.* 2014 Oct 7;20(37):13258-72. doi: 10.3748/wjg.v20.i37.13258. PubMed PMID: 25309063; PubMed Central PMCID: PMC4188884.

Salgame P, Varadhachary AS, Primiano LL, Fincke JE, Muller S, Monestier M. An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 1997 Feb 1;25(3):680-1. PubMed PMID: 9016614; PubMed Central PMCID: PMC146463.

Schubert TT, Bologna SD, Nensey Y, Schubert AB, Mascha EJ, Ma CK. Ulcer risk factors: interactions between *Helicobacter pylori* infection, nonsteroidal use, and age. *Am J Med.* 1993 Apr;94(4):413-8. PubMed PMID: 8475935.

Sharifi M, Moridnia A, Mortazavi D, Salehi M, Bagheri M, Sheikhi A. Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. *Med Oncol.* 2017 Sep 27;34(11):183. doi: 10.1007/s12032-017-1044-9. PubMed PMID: 28956261

Singh G, Ramey DR, Morfeld D, Shi H, Hatoum HT, Fries JF. Gastrointestinal tract complications of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment in rheumatoid arthritis. A prospective observational cohort study. *Arch Intern Med.* 1996 Jul 22;156(14):1530-6. PubMed PMID: 8687261.

Sung JJY, Kuipers EJ, El-Serag HB. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2009 May 1;29(9):938-46. doi: 10.1111/j.1365-2036.2009.03960.x. PubMed PMID: 19220208.

Tamime AY. Fermented milks: a historical food with modern applications--a review. *Eur J Clin Nutr.* 2002 Dec;56 Suppl 4:S2-S15. PubMed PMID: 12556941.

Takeeda M, Hayashi Y, Yamato M, Murakami M, Takeuchi K. Roles of endogenous prostaglandins and cyclooxygenase isoenzymes in mucosal defense of inflamed rat stomach. *J Physiol Pharmacol.* 2004 Mar;55(1 Pt 2):193-205. PubMed PMID: 15082878.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35(3):206-21. PubMed PMID: 10737956.

Tielleman T, Bujanda D, Cryer B. Epidemiology and Risk Factors for Upper Gastrointestinal Bleeding. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2015 Jul;25(3):415-28. doi: 10.1016/j.giec.2015.02.010. PubMed PMID: 26142028.

- Toneto M, Oliveira F, Lopes MH. Evolução histórica da úlcera péptica da etiologia ao tratamento. *Scientia Medica*. 2011; 105:84-89.
- Ueda K, Ueyama T, Yoshida K, Kimura H, Ito T, Shimizu Y, Oka M, Tsuruo Y, Ichinose M. Adaptive HNE-Nrf2-HO-1 pathway against oxidative stress is associated with acute gastric mucosal lesions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Sep;295(3):G460-9. doi: 10.1152/ajpgi.00204.2007. Epub 2008 Jul 10. PubMed PMID: 18617559.
- Uchida M, Shimizu K, Kurakazu K. Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21 yogurt) accelerated the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74:1891–1894. PubMed PMID: 20834166.
- van der Hoorn MM, Tett SE, de Vries OJ, Dobson AJ, Peeters GM. The effect of dose and type of proton pump inhibitor use on risk of fractures and osteoporosis treatment in older Australian women: A prospective cohort study. *Bone*. 2015 Dec;81:675-82. doi: 10.1016/j.bone.2015.08.024. Epub 2015 Aug 28. PubMed PMID: 26319499.
- Vivatvakin S, Werawatganon D, Somanawat K, Klaikeaw N, Siriviriyakul P. Genistein-attenuated Gastric Injury on Indomethacin-induced Gastropathy in Rats. *Pharmacogn Mag*. 2017 Jul;13(Suppl 2):S306-S310. doi: 10.4103/pm.pm_502_16. Epub 2017 Jul 11. PubMed PMID: 28808397.
- Vomero ND, Colpo E. Nutritional care in peptic ulcer. *Arq Bras Cir Dig*. 2014 Nov-Dec;27(4):298-302. doi: 10.1590/S0102-67202014000400017. PubMed PMID: 25626944; PubMed Central PMCID: PMC4743227.
- Wallace JL. How do NSAIDs cause ulcer disease? *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2000 Feb;14(1):147-59. PubMed PMID: 10749095.
- Walsh AM, Crispie F, Kilcawley K, O'Sullivan O, O'Sullivan MG, Claesson MJ, Cotter PD. Microbial Succession and Flavor Production in the Fermented Dairy Beverage Kefir. 2017 Feb 21;2(1). pii: e00003-17. doi: 10.1128/mSystems.00003-17. eCollection 2017 Jan-Feb. PubMed PMID: 28251185; PubMed Central PMCID: PMC5320000
- Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, Wang Y, Li W. Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. *Nutrients*. 2017 May 19;9(5). pii: E521. doi: 10.3390/nu9050521. PubMed PMID: 28534820; PubMed Central PMCID: PMC5452251.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996 May;49(5):1304-13. PubMed PMID: 8731095.
- Zanirati DF, Abatemarco M Jr, Sandes SH, Nicoli JR, Nunes AC. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic

cultures. *Anaerobe*. 2015 Apr;32:70-6. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.12.007. Epub 2014 Dec 24. PubMed PMID: 25542841.

Zhong C, Qu C, Wang B, Liang S, Zeng B. Probiotics for Preventing and Treating Small Intestinal Bacterial Overgrowth: A Meta-Analysis and Systematic Review of Current Evidence. *J Clin Gastroenterol*. 2017 Apr;51(4):300-311. doi: 10.1097. PubMed PMID: 28267052.

Zhonghua Nei Ke Za Zhi. Recommendation for the prevention and treatment of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal ulcers and its complications. *Chinese Rheumatism Data Center; Chinese Systemic Lupus Erythematosus Treatment and Research Group*. 2017 Jan 1;56(1):81-85. doi: 10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2017.01.021. PubMed PMID: 28056333.