

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

**EFEITO GASTROPROTETOR AGUDO DO KEFIR NO PRÉ-
TRATAMENTO DE ANIMAIS COM INDUÇÃO DE LESÃO GÁSTRICA
PELO HCl/ETANOL: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE BEBIDAS
FERMENTADAS EM MATRIZ LÁCTEA E EM MATRIZ AQUOSA**

ALEXANDRE SALES MARQUES DOS SANTOS

VILA VELHA
NOVEMBRO/2018

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

**EFEITO GASTROPROTETOR AGUDO DO KEFIR NO PRÉ-
TRATAMENTO DE ANIMAIS COM INDUÇÃO DE LESÃO GÁSTRICA
PELO HCl/ETANOL: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE BEBIDAS
FERMENTADAS EM MATRIZ LÁCTEA E EM MATRIZ AQUOSA**

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

ALEXANDRE SALES MARQUES DOS SANTOS

VILA VELHA
NOVEMBRO/2018

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UUV-ES

S237e Santos, Alexandre Sales Marques dos
Efeito gastroprotetor agudo do kefir no pré-tratamento de animais com indução de lesão gástrica pelo HCl/Etanol: estudo comparativo entre bebidas fermentadas em matriz láctea e em matriz aquosa / Alexandre Sales Marques dos Santos – 2018.
26 f.; il.

Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.
Coorientadora: Ewelyne Miranda de Lima.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Vila Velha, 2018.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia. 2. Fermentação. 3. Estresse oxidativo. 4. Sistema gastrointestinal. 5. Ratos como animais de laboratório. I. Andrade, Tadeu Uggere de. II. Lima, Ewelyne Miranda de. III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 610.724

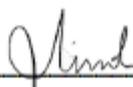
ALEXANDRE SALES MARQUES DOS SANTOS

**EFEITO GASTROPROTETOR AGUDO DO KEFIR NO PRÉ-
TRATAMENTO DE ANIMAIS COM INDUÇÃO DE LESÃO GÁSTRICA
PELO HCl/ETANOL: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE BEBIDAS
FERMENTADAS EM MATRIZ LÁCTEA E EM MATRIZ AQUOSA**

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

Aprovado em 29 de novembro de 2018,

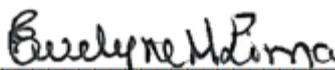
Banca examinadora:



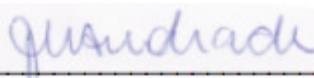
Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli - UFES



Profa. Dra. Girlandia Alexandre Brasil – UVV



**Profa. Dra. Ewelyne Miranda de Lima – UVV
(Coorientadora)**



**Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade – UVV
(Orientador)**

AGRADECIMENTOS

Alegremente agradeço ao Criador que me entregou a meus pais e estes que me deram a uma família maravilhosa e me levaram aos meus professores de ontem e de hoje, nenhum anônimo – gratidão eterna. Todos juntos a iluminar meus caminhos, descobertas e aprendizados. Todos me concedendo novas oportunidades quando errei e celebrando nossos acertos.

Faço reverência especial aos Professores Doutores Tadeu Uggere de Andrade, Eweline Miranda de Lima e Girlandia Alexandre Brasil com quem tive sorte de caminhar e comemoro porque não desistiram de mim quando eu já me rendia.

Encerro, lembrando todos que participaram desta pesquisa, oferecendo tempo e vida para a conclusão deste estudo inédito.

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1. O efeito gastroprotetor do kefir de água e leite após a lesão gástrica.....</u>	9
<u>Figura 2. Oxidação proteica e lipídica após indução de lesão gástrica por HCl/etanol</u>	10
<u>Figura 3. Atividade das enzimas antioxidantes no estômago após os tratamentos e a</u> <u>indução de lesão por HCl / etanol</u>	11

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
AOPP	Produto proteico de oxidação avançada
CAT	Catalase
COX	Ciclooxigenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GI	Gastrointestinal
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
H ⁺ , K ⁺ ATPase	Hidrogênio potássio adenosina trifosfatase
IU	Índice de Ulceração
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
MDA	Malonaldeído
NO	Óxido Nítrico
PBS	Tampão fosfato salina
PDE5	Fosfodiesterase 5
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético

Sumário

1. Introdução	Erro! Indicador não definido.
2. Material e métodos	4
2.1. Animais experimentais	4
2.2. Preparação e administração do kefir de água e de leite	5
2.3. Grupos experimentais e protocolo experimental	5
2.4. Indução de lesão gástrica pelo HCl/etanol	5
2.5. Avaliação das lesões gástricas induzidas pelo HCl/etanol	6
2.6. Preparo de amostras do tecido gástrico	6
2.7. Avaliação da peroxidação lipídica em tecidos gástricos	7
2.8. Avaliação de produtos de oxidação proteica avançada (AOPP) em tecidos gástricos	7
2.9. Atividade de enzimas antioxidantes	7
2.10. Análise estatística	8
3. Resultados	8
3.1. Bebidas fermentadas com kefir de leite e de água protegem contra lesões da mucosa gástrica	8
3.2. Bebidas fermentadas com Kefir de leite e kefir de água reduzem a oxidação de proteínas e lipídios	10

<u>4. Discussão</u>	11
<u>5. Limitações do estudo</u>	15
<u>6. Agradecimentos</u>	15
<u>7. Perspectivas futuras</u>	15
<u>8. Referências</u>	15

Efeito gastroprotetor agudo do kefir no pré-tratamento de animais com indução de lesão gástrica pelo HCl/etanol: Estudo comparativo entre bebidas fermentadas em matriz láctea e em matriz aquosa

Alexandre Sales Marques dos Santos^a, Silvia Cruz Goes Coutinho Haguihara^a, Raiana Maria Prucoli Falsoni^a, Flávia de Souza Andrade Moraes^a, Girlandia Alexandre Brasil^a, Tadeu Uggere de Andrade^a, Ewelyne Miranda de Lima^{a*}

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Vila Velha, Espírito Santo Brasil.

* Autor de correspondência:

RESUMO

SANTOS, Alexandre Sales Marques dos. M. Sc., Universidade Vila Velha - E.S. novembro de 2018. **Efeito gastroprotetor agudo do kefir no pré-tratamento de animais com indução de lesão gástrica pelo HCl/Etanol: Estudo comparativo entre bebidas fermentadas em matriz láctea e em matriz aquosa.** Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.

Introdução: A popularidade das bebidas fermentadas é devida à capacidade de fornecer nutrientes e melhorar a saúde humana, incluindo o sistema gastrointestinal. O objetivo do presente estudo foi comparar o efeito gastroprotetor agudo entre bebidas fermentadas por kefir de água e leite contra úlceras gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos. **Métodos:** Camundongos *Wistar* machos foram separados em grupos: controle (C), ulcerado (U); tratados com lansoprazol (L; 30 mg/kg), tratados com kefir-água (WK; 0,3 mL / 100 g) e tratados com kefir de leite (MK; 0,3 mL / 100 g). Os grupos receberam uma dose única dos tratamentos e uma hora depois, as lesões foram induzidas com etanol acidificado. Após a indução da úlcera o estômago foi retirado e fotografado para determinar a área da úlcera, a partir disso o índice de úlcera e o percentual de redução da úlcera foram calculados. Os efeitos sobre o estresse oxidativo foram verificados pela quantificação dos produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), além disso a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e Catalase) foram avaliados. **Resultados:** O pré-tratamento com ambas as bebidas fermentadas foram capazes de reduzir a área da lesão gástrica após a indução com etanol acidificado. E não houve diferença entre o kefir de água e o kefir de leite. Além disso, foi possível observar diminuição da oxidação protéica (C: $42,52 \pm 10,02$, U: $103,9 \pm 20,57$, L: $9,637 \pm 1,413$, WK: $66,15 \pm 8,72$ e MK: $54,75 \pm 7,253$ cloraminaT/mg de proteína) e peroxidação lipídica (C: $0,9667 \pm 0,1281$, U: $3,108 \pm 0,7534$, L: $1,812 \pm 0,04315$, WK: $1,33 \pm 0,153$ e MK: $1,11 \pm 0,135$ nmol MDA/mg de proteína) de maneira semelhante ao lansoprazol. Nenhuma mudança foi observada na atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). **Conclusão:** Nossos resultados demonstram que uma dose única das bebidas fermentadas com kefir de água e leite, protege contra lesões agudas gástricas induzidas por HCl/etanol, esse resultado pode ser atribuído, pelo menos em parte, pela redução do estresse oxidativo bem como pela formação de uma matriz complexa que é capaz de proteger fisicamente o epitélio gástrico. Sendo assim, ambas as bebidas fermentadas poderiam ser usadas como suplementação adjuvante para prevenir o desenvolvimento de úlceras gástricas.

Palavras chave: Fermentação, estresse oxidativo, lesão gástrica, TBARS

ABSTRACT

SANTOS, Alexandre Sales Marques dos. M. Sc. Vila Velha University - E.S. November, 2018. **Acute gastroprotective effect of kefir in pre-treatment of animals with gastric lesion induction by HCl/Etanol: Comparative study between fermented drinks in milk matrix and in aqueous matrix.** Advisor: Tadeu Uggere de Andrade

Introduction: The popularity of fermented beverages is due to the ability to provide nutrients and improve human health, including the gastrointestinal system. The objective of the present study was to compare the acute gastroprotective effect between water and milk kefir fermented beverages against gastric ulcers induced by acidified ethanol in mice. **Methods:** Male *Wistar* mice were separated into groups: control (C), ulcerated (U); treated with kefir-water (WK, 0.3 mL / 100 g) and treated with kefir of milk (MK, 0.3 mL / 100 g) were treated with lansoprazole (L, 30 mg / kg). The groups received a single dose of the treatments and one hour later, the lesions were induced with acidified ethanol. After ulcer induction the stomach was removed and photographed to determine the area of the ulcer, from which the ulcer index and the percentage of ulcer reduction were calculated. The effects on oxidative stress were verified by the quantification of advanced oxidation protein products (AOPP) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). In addition, antioxidant enzymes (SOD and Catalase) were evaluated. **Results:** Pretreatment with both fermented beverages was able to reduce the area of the gastric lesion after induction with acidified ethanol. And there was no difference between water kefir and milk kefir. In addition, it was possible to observe a decrease in protein oxidation (C: 42.52 ± 10.02 , U: 103.9 ± 20.57 , L: 9.637 ± 1.413 , WK: 66.15 ± 8.72 and MK: $54, 75 \pm 7,253$ chloramine/mg protein) and lipid peroxidation (C: 0.9667 ± 0.1281 , U: 3.108 ± 0.7534 , L: 1.812 ± 0.04315 , WK: 1.33 ± 0.153 and MK: 1.11 ± 0.135 nmol MDA/mg protein) in a manner similar to lansoprazole. No change was observed in the activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). **Conclusion:** The result is a single dose of fermented beverages with water and milk, protected against acute injury induced by HCl / ethanol, which may result, at least in part, by the reduction of oxidative stress, as well as by the formation of a complex Matter which is able to physically protect the gastric epithelium. As such, as fermented beverages, you will be as adjuvant supplement to prevent the development of gastric ulcers.

Keywords: Fermentation, oxidative stress, gastric lesion, TBAR

1. Introdução

O estilo de vida moderno concorre para o surgimento de várias doenças do trato gastrointestinal através de múltiplas etiologias tais como estresse, dieta, consumo de tabaco, álcool, anti-inflamatórios não esteroidais e infecção por *Helicobacter pylori* (Chung & Shelat, 2017; Komar et al. 2018). A presença de uma ou mais dessas circunstâncias, pode promover desequilíbrio entre os fatores protetores e os agressores da mucosa gástrica resultando úlcera péptica (Naghavi et al., 2015; Chung & Shelat, 2017).

A úlcera péptica é a escoriação da mucosa gastrointestinal e é frequentemente encontrada no estômago e duodeno, numa relação de frequência de 1:4 entre elas (Robbins, 2018), contudo pode ainda ser observada no esôfago e no divertículo de Merckel. Acomete entre 5 e 10% da população e sua progressão natural pode evoluir com a cura ou ainda a recidiva e recorrência e por isso as úlceras resultam em morbidade e mortalidade eventual (Naghavi et al., 2015; Chung & Shelat, 2017; Lanas & Chan, 2017). Neste cenário a úlcera péptica alcança relevância entre as doenças humanas, especialmente por levar a inflamação crônica do tecido, o que pode gerar a médio e longo prazo o desenvolvimento de doenças graves como o câncer (Sverdén et al, 2018; Espinoza JL, 2018; Wu CY et al, 2009).

É fundamental para o desenvolvimento do tratamento da úlcera péptica o conhecimento da sua etiopatogênese. Essa pode ser resultado de infecção bacteriana, de rotura da barreira ou ainda de hipersecreção de ácido gástrico (Dong SXM et al, 2018; Kempenich JW & Sirinek KR, 2018).

A úlcera péptica pode ser resultado da infecção por *H. pylori* ou ainda do uso agentes lesionantes da mucosa, como antiinflamatórios e etanol (Souza RF et al, 2018; Lanas A & Chan FKL, 2017). A infecção por *H. pylori* provoca uma lesão direta, tanto em razão do agente bacteriano quanto pela resposta inflamatória secundária do hospedeiro, causando danos na mucosa do estômago e do duodeno. Desta forma, cerca de 10% a 15% dos pacientes apresentarão hipersecreção de ácido gástrico, esse incremento na acidificação do estômago propicia o desenvolvimento de úlceras antrais ou duodenais secundárias. O mecanismo pelo qual a úlcera se desenvolve se deve a inibição da secreção de somatostatina, o que promove o estímulo a liberação

de gastrina. Por outro lado, alguns dos pacientes infectados com *H. pylori* apresentam úlceras gástricas associadas a hipocloridria e atrofia da mucosa (Kao C-Y, 2016).

Por outro lado, o etanol é um agente lesivo importante para o desenvolvimento de úlcera. Os seus efeitos agudos podem ser atribuídos à precipitação de proteínas dos componentes citoplasmáticos nas células superficiais da mucosa gástrica, pela liberação de mediadores vasoativos, como leucotrienos C4 (LTC₄) e histamina, bem como por inibir a liberação de prostaglandina na mucosa. A liberação dos mediadores vasoativos promovem estase do fluxo sanguíneo na microcirculação da membrana mucosa, o que pode contribuir para o aumento das lesões no estômago.

Além disso, o álcool pode solubilizar a mucosa da parede do estômago, aumentar o fluxo de sódio e potássio no lúmen, aumentar a liberação de pepsina e diminuir os níveis teciduais de DNA, RNA e proteínas, o que deixa a membrana mucosa desprotegida, e leva a lesão tecidual. Além disso, o etanol comprovadamente aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres. Sendo assim, a administração de etanol tem a capacidade de perturbar o desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante do organismo, levando ao estresse oxidativo. Acredita-se que a geração de metabólitos de oxigênio, como o superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH⁻), seja importante na patogênese da lesão alcoólica (Fahmy HA, 2015).

O tratamento de escolha para as úlceras pépticas é feito com os inibidores de bomba de prótons como o omeprazol, o lansoprazol, rebeprazol, pantoprazol, esomeprazol e o dexlansoprazol, considerando sua eficácia já foi demonstrada (Vaezi MF et al, 2018; Freedberg DE et al, 2017). Estes medicamentos podem ser utilizados sinergicamente com análogos de prostaglandinas, antagonistas de receptores de histamina e antibióticos. Contudo, seu uso crônico pode produzir efeitos adversos com severidade variável e que determinam a interrupção do seu uso (Lu et al. 2014; Johnson & Greenwood-Van Meerveld, 2017). Dentre os efeitos adversos que podem ser apresentados, encontram-se doença renal crônica, demência, fratura óssea, infarto do miocárdio, disbiose intestinal, infecção por *Campylobacter sp* ou *Salmonella sp*, peritonite bacteriana espontânea, infecção por *Clostridium difficile*, pneumonia, deficiências de micronutrientes e neoplasias gastrointestinais (Vaezi MF et al, 2018; Freedberg DE et al, 2017) . Talvez por esta razão sejam escassas as estimativas

confiáveis dos efeitos dos gastroprotetores em diferentes configurações (Scally et al, 2018).

Nesse contexto, alternativamente, tem sido demonstrado que alterações na dieta e uso de suplementação com produtos naturais podem ter um grande impacto na prevenção e tratamento de doenças gástricas, sugerindo que alimentos funcionais e nutracêuticos, por exemplo, podem contribuir substancialmente para a saúde gastrointestinal (Gadekar et al. 2010; Romano et al. 2012; Nair et al. 2016; Mijan b& Lim, 2018).

Sendo assim, probióticos são alimentos funcionais compostos por organismos vivos, que sendo administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios a saúde do hospedeiro (FAO, WHO, 2001). Estes benefícios resultam da (a) atividade antimicrobiana direta através da produção de bactericidas ou outros inibidores da expressão gênica de bactérias patogênicas, (b) exclusão competitiva de bactérias patogênicas por competir por sítios de ligação ou estimulação da função de barreira epitelial, (c) estimulação de respostas imunes via aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios, e (d) inibição do(s) gene(s) de virulência ou expressão proteica em bactérias patogênicas gastrointestinais (Viteta L et al, 2014). O papel dos probióticos no tratamento das infecções gastrointestinais é cada vez mais documentado (Kao L et al, 2018; Zoumpopoulou G et al, 2017; Dore MP et al, 2015) como uma alternativa ou complemento aos antibióticos, com o potencial de diminuir seu uso e/ou reduzir seus efeitos colaterais (Patel A et al, 2014). Mais recentemente, há consenso crescente de que alimentos fermentados podem melhorar o bem-estar e reduzir o risco de doenças, inclusive do sistema gastrointestinal (Nair et al. 2016, Marco et al. 2017, Rezac et al., 2018).

Uma classe importante de bebidas fermentadas, são aquelas feitas com grãos de kefir, que são uma combinação simbiótica de bactérias e leveduras envolvidas em uma matriz de polissacarídeo e que podem ser cultivadas em substratos diferentes como leite e água/sacarose (Marsh et al. 2014). Estudos sugerem que as condições do meio de fermentação, bem como o local de cultivo do kefir, podem ser importantes para o perfil dos microrganismos, assim como para as características do produto final (Chen et al, 2009; Hsieh et al. 2012).

Os efeitos atribuídos às bebidas fermentadas a partir dos grãos de kefir têm sido atribuídos a sua ação probiótica, resultado das características singulares do perfil de microrganismos da bebida. Adicionalmente, durante o processo de fermentação e desenvolvimento dos microrganismos presentes na matriz do kefir, há a síntese de diferentes compostos bioativos que também são importantes para os efeitos das bebidas (Ebner et al. 2015; Gallego et al. 2018; Toldrá et al. 2018). Por exemplo, peptídios formados pela quebra da caseína são descritos como capazes de induzir diversos efeitos benéficos, tais como antimicrobiano, imunomodulador e antioxidante (Ebner et al., 2015). Brasil et al. (2018) demonstrou que a fração solúvel do leite fermentado pelos grãos de kefir foi capaz de reduzir a pressão arterial de animais espontaneamente hipertensos, indicando a participação de composto bioativos e não de efeito probiótico, uma vez que essa fração é livre de microrganismos. Entretanto, os efeitos do kefir de água ainda são pouco conhecidos.

Nos últimos anos, estudos confirmaram o efeito gastroprotetor das bebidas lácteas fermentadas derivadas do kefir, atribuindo os efeitos benéficos encontrados à ação probiótica do kefir (Fahmy e Ismail, 2015; Barboza et al. 2018). Barboza et al. 2018 observou que bebidas lácteas fermentadas pelos grãos de kefir apresentaram efeito gastroprotetor, reduzindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) em modelo experimental de lesão induzida pela indometacina. Entretanto, não foram encontrados estudos da prevenção aguda da indução de lesão, nem estudos que tenham testado bebida fermentada pelos grãos de kefir em matriz aquosa com sacarose.

Dessa forma, levando em consideração esses aspectos, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar o efeito da administração aguda do kefir de água na prevenção da indução de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos, comparando os efeitos com aqueles produzidos pela pré-tratamento agudo com kefir de leite, além de avaliar o envolvimento de biomarcadores de estresse oxidativo no processo.

2. Material e métodos

2.1. Animais experimentais

Os protocolos foram conduzidos de acordo com as diretrizes para o cuidado e manuseio de animais de laboratório recomendados pelo *National Institutes of Health* (NIH; EUA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da

Universidade Vila Velha (CEUA - Protocolo UVV, nº 456-2017). Os grupos experimentais foram compostos por camundongos *Swiss machos (Mus musculus)* aos dois meses de idade e pesando entre 25 e 30 gramas. Os camundongos foram mantidos em mini isoladores individuais acoplados a Rack ventilado (Alesco®; São Paulo) em temperatura (~ 23 ° C) e níveis de umidade controlados e foram expostos a um ciclo claro / escuro de 12/12h com acesso *ad libitum* a ração e água.

2.2. Preparação e administração do kefir de água e de leite

As bebidas de kefir de leite e de água foram preparadas adicionando-se grãos de kefir na proporção de 4% (p / v) em leite integral ou água misturada com açúcar mascavo (7g / 100mL), respectivamente, e mantidos à temperatura ambiente. Após 24 h, esta mistura foi filtrada e o produto resultante foi refrigerado (~ 8 ° C) para permitir o crescimento de levedura durante 24 horas. No final deste processo, as duas bebidas foram administradas por via oral na dose de 0,3 mL / 100g de peso corporal (Friques et al. 2015), aos respectivos animais experimentais.

2.3. Grupos experimentais e protocolo experimental

Foi induzida a formação de úlcera gástrica aguda por etanol-HCl de acordo com Oyagi et al. (2010). Quarenta camundongos foram distribuídos aleatoriamente e divididos nos seguintes grupos: (a) o grupo controle (C) recebeu veículo e não foi submetido à indução de úlcera; (b) o grupo ulcerado (U) recebeu veículo e foi submetido a indução de úlcera; (c) o grupo lansoprazol (L) recebeu Inibidor da Bomba de Prótons na dose de 30 mg / kg / dia (CHENG et al. 2016); (d) o grupo kefir da água (WK) recebeu 0,3mL de kefir de água / 100g de peso corporal (Friques et al. 2015); (e) o grupo de kefir de leite (MK) recebeu 0,3mL de kefir de leite/100g de peso corporal (Friques et al. 2015). Os grupos C e U receberam volumes iguais de água deionizada de modo a não interferir na indução de úlcera e manter o epitélio gástrico preservado no grupo controle.

2.4. Indução de lesão gástrica pelo HCl/etanol

Os animais foram mantidos em jejum por 24 horas antes dos experimentos. Os grupos receberam uma dose única dos tratamentos e uma hora depois todos os grupos, exceto o grupo C, receberam 0,1 mL / 20g de uma mistura de HCl/etanol, contendo 150mM de HCl em 98% de etanol por gavagem para induzir a lesão gástrica (Oyagi

et al. 2010). Uma hora após a indução, os animais foram eutanasiados por doses elevadas de cloridrato de xilazina 100mg/kg (Rompum® 2mg/mL - Bayer) e cloridrato de cetamina 20mg/kg (Ketalar 10mg/mL- Cristália®), seguida de uma excisão imediata dos seus estômagos (Mizui, Shimono e Doteuchi, 1987).

2.5. Avaliação das lesões gástricas induzidas pelo HCl/etanol

Após a eutanásia, o tecido foi limpo e foram avaliadas as áreas das úlceras como marcadores de lesão. As imagens dos tecidos foram obtidas com uma câmera digital (modelo Canon Power Shot SX10IS). Foi utilizado o programa gratuito de software de imagem (ImageJ 1.35d, NIH, Bethesda, MD, EUA) para determinar a área da lesão e os resultados foram expressos em μm^2 por área total do estômago (Pereira et al. 2017). Em seguida, foi determinado para cada grupo o índice de úlcera (IU) por meio da fórmula: $\text{IU} = [(\text{área da lesão} \times 100) / \text{área total do estômago}]$, o IU foi calculado para cada animal. Para os grupos com pré-tratamento, o percentual de proteção (PP) da área de lesão também foi calculado: $\text{PP} = [(\text{IU do grupo ulcerado} - \text{IU do grupo tratado}) / \text{IU do grupo ulcerado}] \times 100$ (Szelenyi e Thiemer, 1978; Guzmán-Gómez et al. 2018).

Após a coleta das imagens, o estômago foi congelado a -80°C para determinação do estresse oxidativo e mantido em tampão formalina para avaliação histológica. O tecido gástrico foi fixado em solução de formalina tamponada neutra a 10% por pelo menos 24 h e, então, embebido em parafina. Um segmento de 5 μm de espessura foi corado com hematoxilina / eosina. A análise histológica em microscópio ótico foi realizada por patologista cego para os grupos experimentais.

2.6. Preparo de amostras do tecido gástrico

O tecido gástrico foi homogeneizado usando um homogeneizador mecânico em solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7.0) para avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo. O tecido foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min a 4°C . O sobrenadante foi aliqotado em tubos e armazenado a -80°C . A quantidade total de proteínas foi quantificada usando o método de Bradford (Bradford et al. 1976) e foi usada para normalizar os resultados.

2.7. Avaliação da peroxidação lipídica em tecidos gástricos

A peroxidação lipídica no estômago foi estimada usando o ensaio de quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este ensaio baseia-se na reação entre malonaldeído (MDA), subproduto da peroxidação lipídica e o ácido tiobarbitúrico (Balogun ME et al, 2018). Os estômagos, previamente homogeneizados (125 µL) foram misturados com 250 µL de ácido tiobarbitúrico (1%). Após cuidadosa homogeneização, os tubos foram fervidos por 15 minutos e resfriados à temperatura ambiente. Finalmente, 200 µL da mistura foram adicionados aos poços da microplaca e lidos a 532 nm utilizando um leitor de microplacas (FilterMax F3/F5 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, EUA). Os resultados foram expressos como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol MDA) /mg de proteína, com base no uso de uma curva de calibração de MDA.

2.8. Avaliação de produtos de oxidação proteica avançada (AOPP) em tecidos gástricos

A análise de AOPP nos estômagos foi realizada de acordo com o método descrito por Witko-Sarsat *et al.*, 1996 [41]. O homogenato do estômago foi diluído de 1: 5 com tampão fosfato. 40 µL deste homogenato foi adicionado a 10 µL de iodeto de potássio (1,16 M) e 20 µL de ácido acético em uma placa de 96 poços. Após incubação por 6 minutos, a mistura foi lida a 340 nm utilizando um leitor de microplacas (FilterMax F3 / F5 Multi-Mode Microplate Readers, Molecular Devices, USA). A concentração foi expressa em µmol de cloramina-T /mg de proteína total, com base no uso de uma curva padrão de cloramina-T (0-100 µM). Uma amostra em branco foi preparada misturando todos os reagentes, exceto a amostra ou solução padrão.

2.9. Atividade de enzimas antioxidantes

A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) será determinada no plasma sanguíneo e estômago de acordo com o descrito por Aebi (1984) com modificações. Resumidamente, as amostras foram preparadas e acondicionadas em banho de gelo até o momento do ensaio. Numa cubeta de quartzo foram adicionados 3mL de tampão fosfato (0,050 M, pH 7,4) e 60 ul da amostra, a reação foi iniciada pela adição de 40 ul de H₂O₂ (0,066 M). As absorbâncias em 240 nm foram então registradas a cada 15 segundos, pelo intervalo de 1 minuto. A quantificação de proteína foi realizada

previamente pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome metade do peróxido de oxigênio H_2O_2 em um minuto a $25^\circ C$. Os resultados foram expressos como Coeficiente de extinção do peróxido por minuto ($\Delta E \cdot \text{min}/\text{mg}$ proteína).

A determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizada em amostra do estômago pelo método de Misra e Fradovich (1972). O meio de reação foi composto de 1,0 ml de tampão de carbonato (0,2 M, pH 10,2), KCl 0,8 ml (0,015M), 0,1 ml de homogenato e água de modo a atingir o volume final de 3,0 ml. A reação foi iniciada pela adição de 0,2 ml de epinefrina (0,025 M). A alteração na absorbância foi registrada a 480nm em intervalos de 15 segundos durante um minuto a $25^\circ C$. A proteína foi quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A reação consiste na inibição da autooxidação da epinefrina em adenocromo, na presença de SOD. Uma unidade da enzima é definida como a quantidade de enzima que provoca 50% de inibição da auto oxidação de epinefrina. Os resultados foram expressos como Unidade de SOD/mg de proteína,

2.10. Análise estatística

Os dados foram expressos como as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). A avaliação das diferenças entre os grupos foi determinada usando ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey (Prism 6.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Bebidas fermentadas com kefir de leite e de água protegem contra lesões da mucosa gástrica

A figura 1 evidencia que o grupo U apresenta área de dano gástrico maior em relação ao grupo C (U: 44277 ± 6983 vs. C: $3120 \pm 1088 \mu\text{m}^2$, $p < 0,01$), o que demonstra a efetividade das lesões gástricas induzidas pelo HCl / etanol. Demonstra ainda a menor área de lesão em animais que receberam kefir de leite e kefir de água (MK: 4700 ± 1270 e WK: $5181 \pm 1546 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo U ($p < 0,01$). Além disso, os

resultados para os grupos MK e WK foram os mesmos do grupo L, que recebeu o inibidor da bomba de prótons (L: $10820 \pm 6060 \mu\text{m}^2$, $p < 0,01$ em relação ao grupo U). Adicionalmente, de acordo com os dados morfométricos, o IU foi menor nos animais tratados com kefir independentemente do tipo (U: $3,209 \pm 0,31$, WK: $0,2751 \pm 0,032$, MK: $0,322914 \pm 0,03$, L: $0,4087 \pm 0,04$). O PP dos grupos WK e MK foi semelhante ao do medicamento padrão (WK: 91,43%; MK: 89,93%; L: 87,26%).

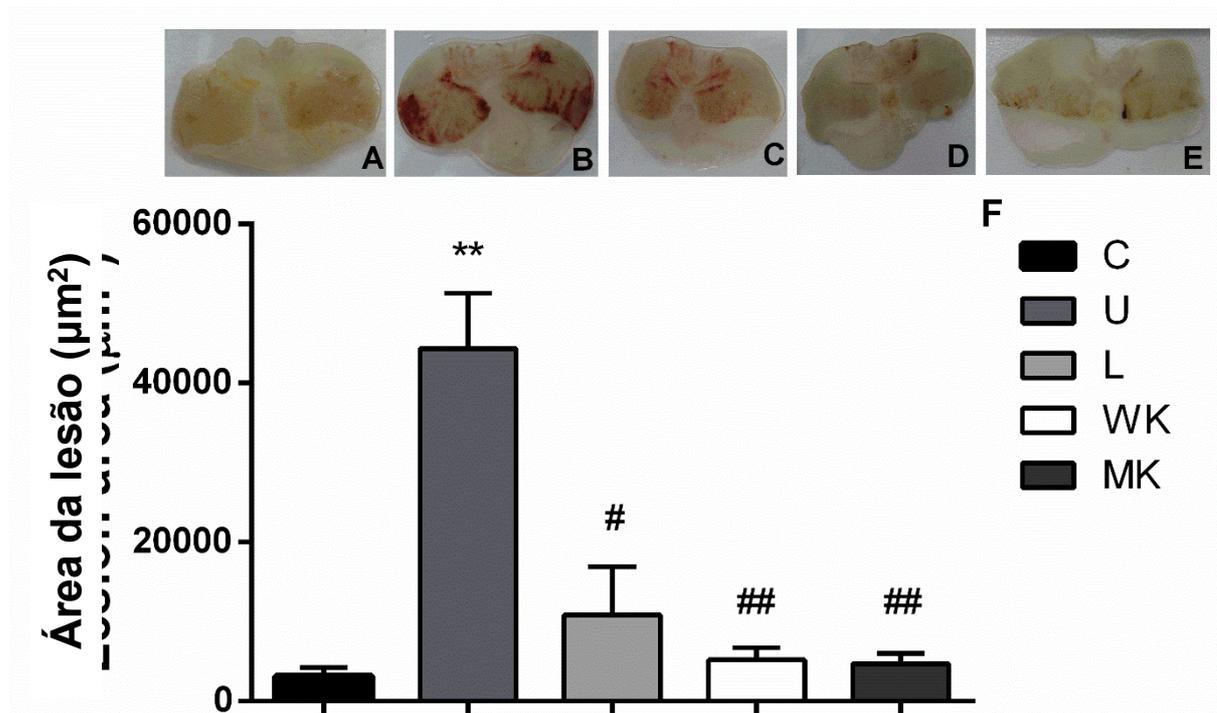


Figura 1. O efeito gastroprotetor do kefir de água e leite após a lesão gástrica. O painel superior, (Painel A - E) apresenta imagens representativas das mucosas gástricas após indução de lesão por HCl / etanol nos diferentes grupos e demonstra proteção nos grupos MK, WK e L. O gráfico de barras (painel F) mostra as áreas médias das lesões gástricas. Os valores são apresentados como as médias \pm E.P.M. C: Grupo controle; U: Grupo Úlcera; L: Grupo Lansoprazol; WK: Grupo kefir de água; MK: Grupo Kefir de leite. para $n = 6-8$ animais por grupo. ** $p < 0,01$ vs. o grupo C, # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ vs. o grupo U.

A análise histopatológica foi realizada em microscópio óptico e demonstrou efeitos gastroprotetores do kefir de ambos os tipos. O grupo U apresenta inflamação acentuada com erosão e ulceração, entretanto, o tratamento com lansoprazol, kefir de leite e kefir de água, promoveram proteção contra lesões, como mostra a presença de inflamação leve semelhante à do grupo controle.

3.2. Bebidas fermentadas com Kefir de leite e kefir de água reduzem a oxidação de proteínas e lipídios

O grupo U apresentou aumento em ambos os marcadores em comparação ao grupo C (AOPP; U = $103,9 \pm 20,57$ vs. C = $42,52 \pm 10,02$ cloramina T / mg de proteína – TBARS; U = $3,108 \pm 0,7534$ vs. C = $0,9667 \pm 0,1281$ nmol MDA / mg de proteína, $p < 0,01$ em relação à C). O kefir de leite e o kefir de água reduziram os níveis de TBARS e AOPP no tecido gástrico. A Figura 2 demonstra que tanto a oxidação de proteínas quanto de lipídios foi inibida após o pré-tratamento com os dois tipos de kefir. No tecido gástrico dos grupos MK e WK, os níveis de produtos oxidativos foram significativamente menores (AOPP; WK = $66,15 \pm 8,72$ e MK = $54,75 \pm 7,253$ cloramina T / mg de proteína – TBARS; WK = $1,33 \pm 0,153$ e MK = $1,11 \pm 0,135$ nmol MDA / mg de proteína, $p < 0,05$ comparados aos do grupo U). Resultados semelhantes foram encontrados para o grupo L (AOPP; L = $9,637 \pm 1,413$ cloramina T / mg de proteína; TBARS = L: $1,812 \pm 0,04315$ nmol MDA / mg de proteína, $p < 0,05$ em relação à U).

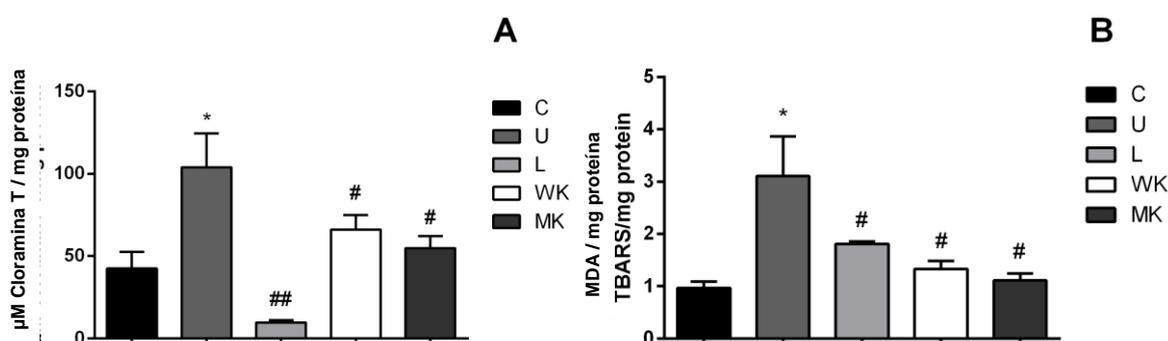


Figura 2. Oxidação proteica e lipídica após indução de lesão gástrica por HCl / etanol. Painel A: níveis de AOPP no tecido gástrico; Painel B: níveis de TBARS no tecido gástrico. Ambos os painéis demonstram uma diminuição nos produtos oxidantes após dose única de kefir de água, kefir de leite ou lansoprazol. Os valores foram apresentados como médias \pm E.P.M. para $n = 6-8$ animais por grupo. * $p < 0,05$ vs. o grupo C; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ vs. o grupo U.

A Figura 3 demonstra que a indução aguda com HCl / etanol não promoveu alterações nas enzimas antioxidante. De igual modo, o Kefir de Leite e o Kefir de Água não promoveram quaisquer alterações na atividade de SOD e CAT no tecido gástrico (SOD; C = $131,6 \pm 50$, U = $95,3 \pm 27,8$, L = $117,3 \pm 949$, WK = $145,4 \pm 30,3$ e MK =

150,9 ± 21,5 USOD mg de proteína⁻¹ – CAT; C = 1,80 ± 0,25, U = 2,03 ± 0,28, L = 1,85 ± 0,18, WK = 1,41 ± 0,21 e MK = 1,68 ± 0,19 ΔE min⁻¹ mg de proteína⁻¹).

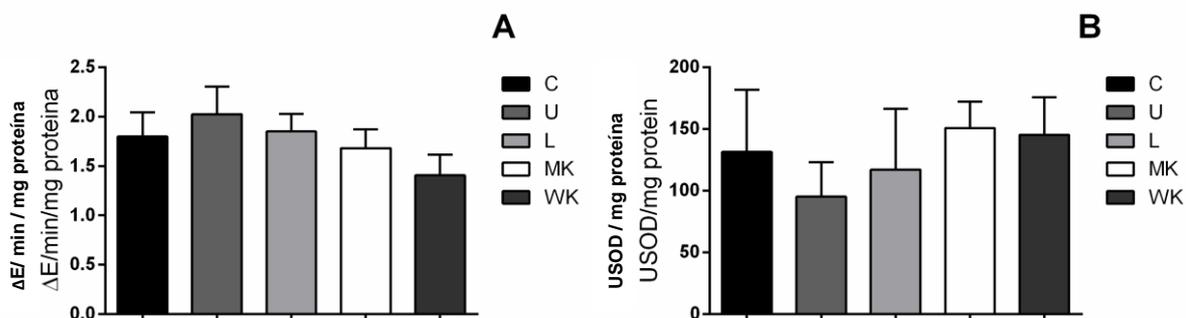


Figura 3. Atividade das enzimas antioxidantes no estômago após os tratamentos e a indução de lesão por HCl / etanol. Painel A: Valores da atividade de catalase; Painel B: Valores da atividade SOD. Os valores foram apresentados como as médias ± E.P.M. para n = 6-8 animais por grupo.

4. Discussão

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito gastroprotetor comparativo de bebidas fermentadas a partir de grãos de kefir. Notavelmente, nosso estudo demonstrou, pela primeira vez, que a dose única dos pré-tratamentos com bebidas fermentadas seguida de indução de úlcera com HCl / etanol protege contra lesão gástrica e inibe a oxidação de proteínas e lipídios. Adicionalmente, o efeito ocorre de forma independente da matriz de fermentação, uma vez que não houve diferença entre os feitos produzidos pelo pré-tratamento com kefir de água e de leite.

As bebidas fermentadas proporcionam benefícios à saúde devido às propriedades nutricionais e terapêuticas por ação probiótica e / ou produção de metabólitos e compostos bioativos (Marsh et al. 2014; Ebner et al. 2015; de Lima et al. 2018). Os probióticos afetam benéficamente a saúde melhorando o equilíbrio microbiano do trato gastrointestinal (Guarner & Schaafsma, 1998).

O efeito gastroprotetor do kefir de leite após pré-tratamento crônico em diferentes modelos de indução de úlcera tem sido demonstrado e sendo sugerida a ação probiótica como responsável por esta proteção (Fahmy e Ismail, 2015; Barboza et al. 2018). Fahmy & Ismail (2015) mostraram efeito protetor do kefir de leite em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos γ-irradiados após 18 dias do pré-tratamento. Barboza et al. (2018) demonstraram que o kefir causou uma diminuição

significativa na extensão das lesões gástricas com o pré-tratamento dos 14 dias usando o modelo de úlcera com indução da indometacina.

Entretanto, não é do conhecimento dos autores deste estudo, a avaliação do efeito agudo de bebidas fermentadas na proteção contra a lesão gástrica. Assim, a novidade deste estudo foi a demonstração de que o pré-tratamento agudo por 1 hora, tanto com bebida láctea, como com bebida aquosa, ambas fermentadas pelos grãos de kefir, foi capaz de proteger a mucosa gástrica contra danos causados pelo etanol em camundongos. Isso indica um efeito que seria independente da ação probiótica. Evidências sustentam que os efeitos probióticos ocorrem de uma maneira dependente do tempo, de 6 a 77 dias (Wang et al. 2016; Wen et al. 2017; Chotivitayatarakorn et al. 2017). Portanto, é provável que os efeitos observados neste estudo não sejam atribuídos à ação probiótica, mas devido aos compostos bioativos produzidos na fermentação.

Nos últimos anos, tem havido atenção crescente aos polissacarídeos como alimentos funcionais e seus efeitos benéficos à saúde (Reginald McDaniel et al. 2018; Tingirikari, 2018; Xiao et al. 2018; Xiong et al. 2018). Pesquisas recentes revelaram potentes propriedades preventivas da úlcera de polissacarídeo bioativo via inibição de neutrófilos, mecanismos antissecretórios, mucoprotetores, anti-inflamatórios e antioxidantes (Da Silva Pantoja et al. 2018; Wang et al. 2018; Rajagopal et al. 2018). Além desses mecanismos, alguns autores sugerem que o polissacarídeo pode formar uma camada protetora na superfície da mucosa que protege o tecido gástrico (Matsumoto et al. 1993; Nergard et al. 2005; Liao et al. 2018).

Evidências indicam a presença de polissacarídeos em grãos e bebidas de kefir, como kefirano e dextrano (Micheli et al. 1999; Waldherr et al., 2010; Fels et al. 2018). O kefirano é um heteropolissacarídeo constituído de resíduos de glicose e galactose sintetizados por *Lactobacillus kefiranofaciens* e também por leveduras dos grãos de kefir (Kooiman, 1968). É importante notar que a literatura indica que o kefirano pode formar filmes transparentes com propriedades mecânicas e de barreira (Piermaria et al. 2009, 2011).

A esse respeito, nossos dados mostraram que as bebidas fermentadas promovem efeitos gastroprotetores na mucosa gástrica que são semelhantes aos do

lansoprazol. Embora este fármaco atue como inibidor da bomba de prótons pelo bloqueio da Hidrogênio potássio ATPase gástrica nas células parietais (Matheson e Jarvis, 2001; Sachs, 1997), o lansoprazol previne o dano da mucosa pelo aumento da barreira mucosa gástrica pela redução da secreção ácida, bem como o aumento de mecanismos defensivos tais como prostaglandinas e compostos sulfidrílicos na mucosa gástrica (Blandizzi et al. 1999; Natale et al. 2004). Além disso, Fahmy & Ismail, 2015 relacionaram o efeito gastroprotetor do kefir do leite a uma diminuição na secreção de HCl pela inibição da hidrogênio potássio adenosina trifosfatase (H^+ , K^+ ATPase) gástrica e a estimulação da secreção mucosa. É possível que os efeitos gastroprotetores agudos das bebidas fermentadas de ambos os kefir atuem formando uma camada protetora sobre a camada epitelial estomacal, devido à presença desses polissacarídeos, prevenindo o dano necrótico observado em nossos resultados.

As lesões agudas da mucosa gástrica induzidas por HCl / etanol são acompanhadas por rápido desenvolvimento das múltiplas erosões hemorrágicas e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que é causada por dano oxidativo direto (Terano et al. 1989). Altos níveis de ERO contribuem para a peroxidação lipídica e oxidação protéica em membranas celulares, alterando sua fluidez e permeabilidade (Birben et al. 2012; Alagozlu et al. 2013).

No presente estudo, uma inibição significativa da oxidação proteica e lipídica no estômago com úlcera induzida pelo etanol, mostrou o potencial antioxidante das bebidas fermentadas a partir do kefir.

Zamberi et al. 2016 demonstrou que kefir de água reduziu com sucesso os níveis de MDA nos tumores dos camundongos, sugerindo que as propriedades antitumorais se devem principalmente ao polissacarídeo e exopolissacarídeos isolados de grãos de kefir, bem como aos componentes liberados durante a fermentação. Além disso, Radhouani et al. 2018 observou que o kefirano extraído de grãos de kefir poderia atuar por mecanismos antioxidantes *in vitro* com capacidade de eliminar radicais livres, fornecendo proteção celular em ambientes de estresse oxidativo e sugeriu o uso desse promissor biopolímero como alternativa ou tratamento adjuvante para promover a reparação tecidual. Em uma revisão, Wang et al 2016 concluíram que os polissacarídeos são de fato antioxidantes eficazes.

É importante ressaltar que a atividade antioxidante das enzimas CAT e SOD não foi aumentada após o pré-tratamento com bebidas fermentadas de kefir. Esse pode ser explicado pelo pré-tratamento que foi agudo, apenas uma hora, e a avaliação realizada após 24 horas. Assim, é possível que não tenha havido tempo suficiente para uma indução de aumento de atividade enzimática antioxidante. O resultado reforça, portanto, a hipótese de que os compostos bioativos produzidos pela fermentação poderiam estar atuando como uma camada protetora sobre o tecido estomacal e neutralizar radicais livres devido às características estruturais (Liang et al. 2016 Radhouani et al. 2018).

Rodrigues et al. 2016 apresentou atividades antiulcerogênicas da cerveja fermentada por kefir após pré-tratamento agudo, mas não observou diferenças nas atividades de catalase e glutathione peroxidase, sugerindo a formação da camada de revestimento mucoso com um maior conteúdo de polímero nos estômagos dos animais tratados com amostras à base de kefir, o que seria semelhante ao observado com os nossos resultados.

O presente estudo é o primeiro a investigar o efeito gastroprotetor agudo de bebidas láctea e aquosa fermentadas pelos grãos de kefir em modelo experimental de úlceras gástricas induzidas pelo etanol em camundongos, com atividade antioxidante nessas lesões gástricas, revelando a preservação da mucosa gástrica e diminuição dos biomarcadores oxidativos, sem, no entanto, alterar a atividade de enzimas antioxidantes

Assim, pode concluir-se que o kefir de água e o de leite kefir podem prevenir danos agudos na mucosa gástrica induzida pelo uso de álcool em animais experimentais e que esta proteção pode ser estabelecida, pelo menos em parte, por atividades de neutralização dos radicais livres pelas bebidas fermentadas. As duas bebidas fermentadas podem ser usadas como adjuvantes para prevenir o desenvolvimento de úlceras gástricas, no entanto, mais pesquisas são necessárias para melhor elucidar os compostos bioativos após a fermentação e os efeitos sobre o tecido gástrico.

5. Limitações do estudo

A limitação deste estudo é que os produtos fermentados de kefir de água e de leite não foram avaliados. Embora a literatura indique a presença de polissacarídeos previamente identificados em ambos grãos os kefir com propriedades mecânicas e de barreira e potencial efeito antioxidante, que se encaixam com os resultados encontrados por nós, mais estudos são necessários para identificar e avaliar o efeito isolado ou sinérgico dos compostos bioativos para se relacionar melhor com sua função biológica.

6. Agradecimentos

Este estudo foi parcialmente financiado pela Fundação de amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e pela Universidade Vila Velha (UVV).

7. Perspectivas futuras

Como perspectivas futuras, a realização dos ensaios de antioxidantes *in vitro*, bem como análises de biologia molecular mais modernos como o western blot, pode auxiliar na elucidação do mecanismo pelo qual o kefir é capaz de reduzir a úlcera péptica. Ademais, a descrição dos componentes proteicos e não proteicos presentes no fermentado formado, podem auxiliar no entendimento dos efeitos benéficos dessa bebida.

8. Referências

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.PMID:6727660.

Alagozlu H, Gorgul A, Bilgihan A, Tuncer C, Unal S. Increased plasma levels of advanced oxidation protein products (AOPP) as a marker for oxidative stress in patients with active ulcerative colitis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2013 Feb;37(1):80-5. doi: 10.1016/j.clinre.2012.03.034. Epub 2012 May 7. PubMed PMID:22572519.

Balogun ME et al. Protective roles of *Vigna subterranea* (Bambara nut) in rats with aspirin-induced gastric mucosal injury. *J Integr Med.* (2018). doi.org/10.1016/j.joim.2018.07.004

Barboza KRM, Coco LZ, Alves GM, Peters B, Vasquez EC, Pereira TMC, Meyrelles SS, Campagnaro BP. Gastroprotective effect of oral kefir on indomethacin-induced acute gastric lesions in mice: Impact on oxidative stress. *Life Sci.* 2018 Sep 15;209:370-376. doi: 10.1016/j.lfs.2018.08.035. Epub 2018 Aug 16. PubMed PMID:30120965.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012 Jan;5(1):9-19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613. Epub 2012 Jan 13. PubMed PMID: 23268465; PubMed Central PMCID: PMC3488923.

Blandizzi C, Natale G, Gherardi G, Lazzeri G, Marveggio C, Colucci R, Carignani D, Del Tacca M. Acid-independent gastroprotective effects of lansoprazole in experimental mucosal injury. *Dig Dis Sci.* 1999 Oct;44(10):2039-50. PubMed PMID: 10548356.

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;72:248-54. PMID:942051.

Chen TH, Wang SY, Chen KN, Liu JR, Chen MJ. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. *J Dairy Sci.* 2009 Jul;92(7):3002-13. doi: 10.3168/jds.2008-1669. PubMed PMID: 19528577.

Chen XY, Chen HM, Liu YH, Zhang ZB, Zheng YF, Su ZQ, Zhang X, Xie JH, Liang YZ, Fu LD, Lai XP, Su ZR, Huang XQ. The gastroprotective effect of pogostone from

Pogostemonis Herba against indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Exp Biol Med.*2016;241(2):193-204. doi:10.1177/1535370215600099. PMID: 26290140.

Chotivitayatarakorn P, Mahachai V, Vilaichone RK. Effectiveness of 7-Day and 14-Day Moxifloxacin-Dexlansoprazole Based Triple Therapy and Probiotic Supplement for *Helicobacter Pylori* Eradication in Thai Patients with Non-Ulcer Dyspepsia: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017 Oct 26;18(10):2839-2843.

Chung KT, Shelat VG. Perforated peptic ulcer - an update. *World J Gastrointest Surg.* 2017 Jan 27;9(1):1-12. doi: 10.4240/wjgs.v9.i1.1. Review. PubMed PMID: 28138363; PubMed Central PMCID: PMC5237817.

da Silva Pantoja P, Assreuy AMS, Silva RO, Damasceno SRB, Mendonça VA, Mendes Dawud FA, Mabrouk MA, Mohammed A, Umar IA. Effect of vitamins C & E on aspirin induced gastric mucosal damage and oxidative stress. *Curr Res J Biol Sci.*2014.6:36–41

de Lima MDSF, da Silva RA, da Silva MF, da Silva PAB, Costa RMPB, Teixeira JAC, Porto ALF, Cavalcanti MTH. Brazilian Kefir-Fermented Sheep's Milk, a Source of Antimicrobial and Antioxidant Peptides. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2018 Sep;10(3):446-455. doi: 10.1007/s12602-017-9365-8. PubMed PMID: 29285743.

Dore MP et al. Is There a Role for Probiotics in *Helicobacter pylori* Therapy? *Gastroenterol Clin N Am* 44 (2015) 565–575. doi.org/10.1016/j.gtc.2015.05.005.

Dong SXM et al. A collection of the etiological theories, characteristics, and observations/phenomena of peptic ulcers in existing data. *Data in Brief* 19(2018)1058–1067. doi.org/10.1016/j.dib.2018.05.022

Ebner, J., Aşçı-Arslan, A., Fedorova, M., Hoffmann, R., Küçükçetin, A., Pischetsrieder, M. Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins

during its production by starter culture or kefir grains. *J Proteomics* 2015;117:41-57. doi: 10.1016/j.jprot.2015.01.005. Epub 2012 Apr 21. PubMed PMID: 22578996.

Espinoza JL et al. Gastric microbiota: An emerging player in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancies. *Cancer Letters* 414 (2018) 147e152. doi 10.1016/j.canlet.2017.11.00

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.

Fels L, Jakob F, Vogel RF, Wefers D. Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydr Polym.* 2018 Jun 1;189:296-303. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.02.037. Epub 2018 Feb 19. PubMed PMID: 29580412.

Freedberg DE et al. The Risks and Benefits of Long-term Use of Proton Pump Inhibitors: Expert Review and Best Practice Advice From the American Gastroenterological Association. *Gastroenterology* 2017;153:35–48. doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.031

Friques 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 Dec 30;13:390. doi: 10.1186/s12967-015-0759-7. PubMed PMID: 26715471; PubMed Central PMCID:PMC4696190.

Gadekar R, Singour PK, Chaurasiya PK, Pawar RS, Patil UK. A potential of some medicinal plants as antiulcer agents. *Pharmacogn Rev.* 2010 Jul;4(8):136-46. doi: 10.4103/0973-7847.70906. PubMed PMID: 22228953; PubMed Central PMCID:PMC3249913.

Gallego M, Mora L, Escudero E, Toldrá F. Bioactive peptides and free amino acids profiles in different types of European dry-fermented sausages. *Int J Food Microbiol.*

2018 Jul 2;276:71-78. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.009. Epub 2018 Apr 5. PubMed PMID: 29674143.

Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol*. 1998 Feb 17;39(3):237-8. PubMed PMID: 9553803.

Guzmán-Gómez O, García-Rodríguez RV, Quevedo-Corona L, Pérez-Pastén-Borja R, Rivero-Ramírez NL, Ríos-Castro E, Pérez-Gutiérrez S, Pérez-Ramos J, Chamorro-Cevallos GA. Amelioration of Ethanol-Induced Gastric Ulcers in Rats Pretreated with Phycobiliproteins of *Arthrospira (Spirulina) Maxima*. *Nutrients*. 2018;10(6).pii: E763.doi:10.3390/nu10060763.PMID:29899291.

Hara N, Okabe S. [Effects of gefarnate on acute gastric lesions in rats]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 1985 Jun;85(6):443-6. Japanese. PubMed PMID: 4029813.

Hsieh HH, Wang SY, Chen TL, Huang YL, Chen MJ. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. *Int J Food Microbiol*. 2012 Jun 15;157(1):73-81. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.014.

Johnson AC, Greenwood-Van Meerveld B. Critical Evaluation of Animal Models of Gastrointestinal Disorders. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;239:289-317. doi:10.1007/164_2016_120. Review. PubMed PMID: 28176046.

Kao L, et al., Beneficial effects of the commercial lactic acid bacteria product, Vigiis 101, on gastric mucosa and intestinal bacterial flora in rats, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* (2018), doi.org/10.1016/j.jmii.2018.06.002

Kao C-Y, et al., *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis, *Biomedical Journal* (2016), doi.org/10.1016/j.bj.2015.06.002

Kempenich JW & Sirinek KR. Acid Peptic Disease. *Surg Clin N Am* 98 (2018) 933–944. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2018.06.003>

Komar OM, Kizlova NM, Trylevych OD, Kravchenko VV. [Risk factors for adverse course of gastric and duodenal peptic ulcer]. *Wiad Lek.* 2018;71(1 pt 2):160-164. Russian. PubMed PMID: 29602925.

Kooiman P. The chemical structure of kefiran: the water-soluble polysaccharide of kefir grain. *Carbohydrate Research*, 1968;7:200–211.

Lanas A, Chan FKL. Peptic ulcer disease. *Lancet* 2017; 390: 613–24.

Liang TW, Tseng SC, Wang SL. Production and Characterization of Antioxidant Properties of Exopolysaccharide(s) from *Peanibacillus mucilaginosus* TKU032. *Mar Drugs*. 2016 Feb 19;14(2). pii: E40. doi: 10.3390/md14020040. PubMed PMID: 26907304; PubMed Central PMCID: PMC4771993.

Liao Z, Zeng R, Hu L, Maffucci KG, Qu Y. Polysaccharides from tubers of *Bletilla striata*: Physicochemical characterization, formulation of buccoadhesive wafers and preliminary study on treating oral ulcer. *Int J Biol Macromol.* 2018 Sep 15. pii: S0141-8130(18)33441-X. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.050. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30227203.

Lu L, Chan RL, Luo XM, Wu WK, Shin VY, Cho CH. Animal models of gastrointestinal inflammation and cancer. *Life Sci.* 2014 Jul 11;108(1):1-6. doi: 10.1016/j.lfs.2014.04.036. Epub 2014 May 11. Review. PubMed PMID: 24825611.

Marco ML, Heeney D, Binda S, Cifelli CJ, Cotter PD, Foligné B, Gänzle M, Kort R, Pasin G, Pihlanto A, Smid EJ, Hutkins R. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr Opin Biotechnol.* 2017 Apr;44:94-102. doi: 10.1016/j.copbio.2016.11.010. Epub 2016 Dec 18. Review. PubMed PMID: 27998788.

Marsh AJ, Hill C, EROs RP, Cotter PD. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology.* 2014 38:13e124. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.002>.

Matsumoto T, Moriguchi R, Yamada H. Role of polymorphonuclear leucocytes and oxygen-derived free radicals in the formation of gastric lesions induced by HCl/ethanol, and a possible mechanism of protection by anti-ulcer polysaccharide. *J Pharm Pharmacol*. 1993 Jun;45(6):535-9. PubMed PMID: 8103101. May 30. PubMed PMID: 29859304.

Micheli L, Uccelletti D, Palleschi C, Crescenzi V. Isolation and characterisation of a rropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999 Dec;53(1):69-74. PubMed PMID: 10645627.

Mijan MA, Lim BO. Diets, functional foods, and nutraceuticals as alternative therapies for inflammatory bowel disease: Present status and future trends. *World J Gastroenterol*. 2018 Jul 7;24(25):2673-2685. doi: 10.3748/wjg.v24.i25.2673. Review. PubMed PMID: 29991873; PubMed Central PMCID: PMC6034142.

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247(10):3170-5. PMID:4623845.

Mizui T, Shimono N, Doteuchi M. A possible mechanism of protection by polyamines against gastric damage induced by acidified ethanol in rats: polyamine protection may depend on its antiperoxidative properties. *Jpn J Pharmacol*. 1987 May;44(1):43-50. PMID: 3041086.

Naghavi M; Wang H; Lozano R; Davis A; Liang X; Zhou M. et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015 Jan 10;385(9963):117-71. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61682-2. Epub 2014 Dec 18. PMID: 25530442.

Nair MR, Chouhan D, Sen Gupta S, Chattopadhyay S. Fermented Foods: Are They Tasty Medicines for *Helicobacter pylori* Associated Peptic Ulcer and Gastric Cancer?

Front Microbiol. 2016 Jul 25;7:1148. doi: 10.3389/fmicb.2016.01148. eCollection 2016. Review. PubMed PMID: 27504109; PubMed Central PMCID: PMC4958626.

Natale G, Lazzeri G, Lubrano V, Colucci R, Vassalle C, Fornai M, Blandizzi C, Del Tacca M. Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 Feb 15;195(1):62-72. PubMed PMID: 14962506.

Nergard CS, Diallo D, Inngjerdingen K, Michaelsen TE, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H, Paulsen BS. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali Anti-ulcer, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. *J Ethnopharmacol.* 2005 Jan 4;96(1-2):255-69. PubMed PMID: 15588678.

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.

Oyagi A et al. Protective effects of a gastrointestinal agent containing Korean red ginseng on gastric ulcer models in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2010, 10:45 <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/10/45>

Patocková J, Krsiak M, Marhol P, Tůmová E. Cerebrolysin inhibits lipid peroxidation induced by insulin hypoglycemia in the brain and heart of mice. *Physiol Res.* 2003;52(4):455-60. PMID:12899658.

Pereira AC, Lenz D, Nogueira BV, Scherer R, Andrade TU, Costa HB, Romão W, Pereira TM, Endringer DC. Gastroprotective activity of the resin from *Virola oleifera*. *Pharm Biol.* 2017;55(1):472-480. PMID:27937036.

Piermaria J, Bosch A, Pinotti A, Yantorno O, Alejandra Garcia M, Graciela Abraham A. Kefiran films plasticized with sugars and polyols: watervapor barrier and mechanical

properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*. 2011; 25(5):1261–1269.

Piermaria J, Pinotti A, García MA, Abraham AG. Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: development and characterization *Food Hydrocolloids*. 2009; 23: 684-690. PMID: PMC5739168.

PMG. The polysaccharide-rich tea of *Ximenia americana* barks prevents indomethacin-induced gastrointestinal damage via neutrophil inhibition. *J Ethnopharmacol*. 2018 Oct 5;224:195-201. doi: 10.1016/j.jep.2018.05.041. Epub 2018

Radhouani H, Gonçalves C, Maia FR, Oliveira JM, Reis RL. Biological performance of a promising Kefiran-biopolymer with potential in regenerative medicine applications: a comparative study with hyaluronic acid. *J Mater Sci Mater Med*. 2018 Jul 26;29(8):124. doi: 10.1007/s10856-018-6132-7. PubMed PMID: 30051294.

Rajagopal HM, Manjegowda SB, Serkad C, Dharmesh SM. A modified pectic polysaccharide from turmeric (*Curcuma longa*) with antiulcer effects via anti-secretory, mucoprotective and IL-10 mediated anti-inflammatory mechanisms. *Int J Biol Macromol*. 2018 Oct 15;118(Pt A):864-880. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.053. Epub 2018 Jun 18. PubMed PMID: 29924982.

Reginald McDaniel H, LaGanke C, Bloom L, Goldberg S, Lages LC, Lantigua LA, Atlas SE, Woolger JM, Lewis JE. The Effect of a Polysaccharide-Based Multinutrient Dietary Supplementation Regimen on Infections and Immune Functioning in Multiple Sclerosis. *J Diet Suppl*. 2018 Oct 4:1-16. doi: 10.1080/19390211.2018.1495675. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30285512.

Rezac S, Kok CR, Heermann M, Hutkins R. Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Front Microbiol*. 2018 Aug 24;9:1785. doi: 10.3389/fmicb.2018.01785. eCollection 2018. Review. PubMed PMID: 30197628; PubMedCentral PMCID: PMC6117398.

Rodrigues KL; Araújo TH; Schneedorf JM; Ferreira CF; Moraes GOI; Coimbra RS; Rodrigues MR. A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. *Journal of Functional Foods* 2016; 21;58–69.doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.035>.

Romano M, Vitaglione P, Sellitto S, D'Argenio G. Nutraceuticals for protection and healing of gastrointestinal mucosa. *Curr Med Chem.* 2012;19(1):109-17. Review.PubMed PMID: 22300083.

Scally B et al. Effects of gastroprotectant drugs for the prevention and treatment of peptic ulcer disease and its complications: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2018 Published Online February 20, 2018 [http://dx.doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30037-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30037-2)

Souza F R et al. Contributions From Gastroenterology : Acid Peptic Disorders, Barrett's Esophagus and Eosinophilic Esophagitis. *Gastroenterology* 2018;154:1209–1214.

Sverdén E, Brusselaers N, Wahlin K, Lagergren J, Time latencies of *Helicobacter pylori* eradication after peptic ulcer and risk of recurrent ulcer, ulcer adverse events, and gastric cancer: a population-based cohort study, *Gastrointestinal Endoscopy* (2018), doi: 10.1016/ j.gie.2017.11.035

Terano A, Hiraishi H, Ota S, Shiga J, Sugimoto T. Role of superoxide and hydroxyl radicals in rat gastric mucosal injury induced by ethanol. *Gastroenterol. Jpn.* 1989. 24, 488 – 493.

Tingirikari JMR. Microbiota-accessible pectic poly- and oligosaccharides in gut health. *Food Funct.* 2018 Oct 3. doi: 10.1039/c8fo01296b. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 30280147.

Toldrá F, Reig M, Aristoy MC, Mora L. Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chem.* 2018 Nov 30;267:395-404. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.119. Epub 2017 Jun 21. PubMed PMID: 29934183.

TS, Morais JAV, de Almeida SL, Teixeira AÉEA, de Souza MHL, Pereira MG, Soares

Vaezi MF et al. REVIEWS IN BASIC AND CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY. *Gastroenterology* 2017;153:35–48. doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.047

Vitetta L et al. Probiotics, prebiotics and the gastrointestinal tract in health and disease. *Inflammopharmacol* (2014) 22:135. DOI 10.1007/s10787-014-0201-4

Waldherr FW, Doll VM, Meissner D, Vogel RF. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiol.* 2010 Aug;27(5):672-8. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.013. Epub 2010 Mar 30. PubMed PMID: 20510787.

Wang H, Lee IS, Braun C, Enck P. Effect of Probiotics on Central Nervous System Functions in Animals and Humans: A Systematic Review. *J Neurogastroenterol Motil.* 2016 Oct 30;22(4):589-605. doi: 10.5056/jnm16018. Review. PubMed PMID: 27413138; PubMed Central PMCID: PMC5056568.

Wang XY, Yin JY, Zhao MM, Liu SY, Nie SP, Xie MY. Gastroprotective activity of polysaccharide from *Herichium erinaceus* against ethanol-induced gastric mucosal lesion and pylorus ligation-induced gastric ulcer, and its antioxidant activities. *Carbohydr Polym.* 2018 Apr 15;186:100-109. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.01.004. Epub 2018 Jan 2. PubMed PMID: 29455967.

Wen J, Peng P, Chen P, Zeng L, Pan Q, Wei W, He J. Probiotics in 14-day triple therapy for Asian pediatric patients with *Helicobacter pylori* infection: a network meta-analysis. *Oncotarget.* 2017 Oct 7;8(56):96409-96418. doi: 10.18632/oncotarget.21633. eCollection 2017 Nov 10. PubMed PMID: 29221216; PubMed Central PMCID: PMC5707110.

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;49(5):1304-13.PMID:8731095.

Wu CY et al. Early *Helicobacter pylori* Eradication Decreases Risk of Gastric Cancer in Patients With Peptic Ulcer Disease. *GASTROENTEROLOGY* 2009;137:1641–1648. PMID: 19664631 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.07.060

Xiao H, Fu X, Cao C, Li C, Chen C, Huang Q. Sulfated modification, characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharides from *Sargassum pallidum*. *Int J Biol Macromol.* 2018 Oct 3. pii: S0141-8130(18)33935-7. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.197. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30291933

Xiong Q, Song Z, Hu W, Liang J, Jing Y, He L, Huang S, Wang X, Hou S, Xu T, Chen J, Zhang D, Shi Y, Li H, Li S. Methods of extraction, separation, purification, structural characterization for polysaccharides from aquatic animals and their major pharmacological activities. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018 Oct 4:1-16. doi: 10.1080/10408398.2018.1512472. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30285473.

Zamberi NR, Abu N, Mohamed NE, Nordin N, Keong YS, Beh BK, Zakaria ZA, Nik Abdul Rahman NM, Alitheen NB. The Antimetastatic and Antiangiogenesis Effects of Kefir Water on Murine Breast Cancer Cells. *Integr Cancer Ther.* 2016 Dec;15(4):NP53 NP66. Epub 2016 May 26. PubMed PMID: 27230756; PubMed Central

Zoumpopoulou G et al. Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health. *International Dairy Journal* 67 (2017) 46e60.