



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

ANA PATRÍCIA DE OLIVEIRA

**EFEITO PROTETOR DO *Lactobacillus reuteri* DSM 17 938 NA
LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM
CAMUNDONGOS: PAPEL DA INIBIÇÃO DO RECEPTOR TRPV1**

PARNAÍBA-PI

2018

ANA PATRÍCIA DE OLIVEIRA

**EFEITO PROTETOR DO *Lactobacillus reuteri* DSM 17 938 NA
LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM
CAMUNDONGOS: PAPEL DA INIBIÇÃO DO RECEPTOR TRPV1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Novas tecnologias e metodologias de diagnóstico e tratamento

Orientador: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros

PARNAÍBA-PI

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

O482e Oliveira, Ana Patrícia de.

Efeito protetor do *Lactobacillus reuteri* DSM 17 938 na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos: papel da inibição do receptor TRPV1 [manuscrito] / Ana Patrícia de Oliveira. – 2018.
102 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros.

1. Etanol. 2. Gastroproteção. 3. Probiótico. 4. Úlcera Gástrica. 5. TRPV1. I. Título.

CDD: 616.3

ANA PATRÍCIA DE OLIVEIRA

**EFEITO PROTETOR DO *Lactobacillus reuteri* DSM 17 938 NA LESÃO
GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS: PAPEL DA
INIBIÇÃO DO RECEPTOR TRPV1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM: 24 / 01 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jand-Venes Rolim Medeiros (Orientador)

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho (Examinador interno)

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dra. Ana Paula Macêdo Santana (Examinador externo)

Centro Universitário INTA - UNINTA

PARNAÍBA-PI

2018

“...Gigantes são os mestres nos ombros dos quais eu me elevei... Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes... Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes... Se conseguir enxergar longe é porque procurei olhar acima dos ombros dos gigantes...” - **Isaac Newton**

Dedico este trabalho aos gigantes da minha vida: Deus, família e membros do

LAFIDG

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela oportunidade de chegar até aqui, e por sempre me guiar em toda a trajetória do mestrado

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros**, pelos sábios ensinamentos e experiências compartilhados, e por sempre estar disponível para tirar dúvidas e dar conselhos, dando todo suporte necessário a esta pesquisa. Sou muito grata pelo “*gigante cujos ombros eu me apoiei*”, por fornecer todas as bases essenciais para minha formação.

Aos integrantes do **LAFIDG**, pela amizade, ajuda nos experimentos, conselhos e ensinamentos, em especial **Simone de Araújo, Luan Kelves, Thiago Lopes, Francisca Beatriz, Irismara e Nayara Alves**, por me acolherem no laboratório e compartilharem as experiências de suas pesquisas, que me ajudaram a despertar a cientista dentro de mim. Aos demais membros: **Kerolayne Melo, Gabriela Pacheco, Bruno Iles, Matheus Sombra e os ICs** que me ajudaram nos experimentos e por deixarem o convívio da rotina ser alegre e agradável.

Aos colaboradores da Universidade Federal do Ceará, **Dr. Renan, Dvison, Conceição, Dra. Gerly Anne e Dr. Marcellus**, por contribuírem para a realização deste trabalho.

A toda **minha família**, em especial minha tia **Socorro Lopes**, por sempre me apoiar incondicionalmente e me ajudar a perseverar no caminho que escolhi, sempre estando ao meu lado. A minha mãe, **Lucinete Ricardo da Silva** (*in memoriam*), e ao meu pai, **José Carlos de Oliveira**, por me ajudarem a dar os primeiros passos, e me ensinarem a sonhar.

Aos meus amigos, em especial os componentes do grupo **PCES**, por me acompanharem em todos estes momentos importantes e me incentivarem na fé.

Aos meus colegas de graduação que ficaram pra vida toda, **Simone, Bruna, Renata, Mariana, Bruno e Eletícia**, pelo apoio e amizade que sempre me deram, mesmo quando distantes. Aos meus colegas de **turma do mestrado**, por compartilharmos sonhos, dúvidas e ansiedade para conseguir este sonhado título.

Aos membros da banca, **Dra. Ana Paula Macêdo Santana e Dr. José Delano Barreto Marinho Filho**, pelas considerações realizadas na qualificação deste trabalho, e por aceitarem novamente avaliá-lo. Obrigada pelo tempo e atenção que vão ser dedicados para isto.

**À Universidade Federal do Piauí e o Programa de Pós
Graduação em Ciências Biomédicas.**

**À agência de fomento CAPES e Conselho Nacional de Desenvolvimento
Tecnológico e Científico –CNPq pelo concedimento da bolsa. À Fundação de
amparo a pesquisa do Piauí-FAPEPI, pelo auxílio às pesquisas realizadas pelo
laboratório.**

A todos, meu muito obrigada!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

-Arthur Schopenhauer

RESUMO

O etanol tem a capacidade de lesar diretamente a mucosa gástrica, e um dos mecanismos pelos quais ele causa este dano é através da ativação dos receptores de potencial transitório do tipo vanilóide 1 (TRPV1), liberação de Substância P (SP) e ativação do receptor de neuroquinina tipo 1 (NK1). Algumas bactérias ácido-lácticas e seus produtos possuem atividade gastroprotetora em lesões induzidas pelo etanol, com diminuição dos níveis de SP. Além disso, a estirpe DSM 17938 do *Lactobacillus reuteri*, exibe atividades terapêuticas por meio da inibição do TRPV1. Assim, este estudo avaliou o efeito do *Lactobacillus reuteri* nas lesões gástricas induzidas por etanol e seu possível mecanismo de ação. Camundongos swiss (25-30g) foram pré-tratados oralmente com solução salina (0,9%) ou 10^8 UFC de *Lactobacillus reuteri* por 3, 7 e 14 dias. No quarto, oitavo e décimo quinto dia, os animais suplementados com *Lactobacillus reuteri* e solução salina receberam etanol a 50% (0,5 mL / 25 g v.o.) ou solução salina. Para avaliar o papel da inibição da ativação do TRPV1 ou do NK1, os camundongos suplementados com *Lactobacillus reuteri* receberam capsaicina ou resiniferatoxina (3 nmol/kg) via oral com etanol a 50%, e 1 μ mol/L para 20 g, via i.p. de SP no quarto dia, respectivamente. As amostras de cada estômago foram removidas para avaliação macroscópica, histopatológica e análises bioquímicas (Malondialdeído-MDA, Nitrito- Nox, Glutathione-GSH e Superóxido dismutase-SOD). Foi realizada imunohistoquímica para TRPV1, e a concentração de substância P foi mensurada por ELISA. Também foi avaliado o muco aderido à parede gástrica e a secreção ácida. *Lactobacillus reuteri* reduziu o dano gástrico induzido pelo etanol ($P < 0,001$). 3 dias de pré- tratamento com *Lactobacillus reuteri* apresentou taxa de inibição da lesão de 90,26%. *Lactobacillus reuteri* também reduziu os níveis de MDA e nitrito quando comparado ao grupo lesado ($P < 0,01$) e manteve os parâmetros antioxidantes basais de GSH e SOD ($P < 0,001$). Os efeitos da suplementação com *L. reuteri* foram significativamente revertidos com a administração de RTX, com aumento de MDA e Nox ($P < 0,001$) e diminuição de GSH e SOD ($P < 0,0001$). *Lactobacillus reuteri* não foi capaz de prevenir a lesão causada pela administração de SP e etanol. A expressão de TRPV1 foi significativamente menor no grupo tratado, quando comparado ao grupo lesionado. O conteúdo de substância P no tecido gástrico foi reduzido com *Lactobacillus reuteri*, em comparação ao grupo lesado ($P < 0,05$). Além disso, o *Lactobacillus reuteri* elevou os níveis de muco na mucosa gástrica e manteve os níveis basais de secreção de ácido ($p < 0,05$). Assim, o estudo demonstra os efeitos protetores de *Lactobacillus reuteri* no dano gástrico induzido pelo etanol, que em parte se dá pela inibição da ativação do receptor TRPV1, com redução de substância p e do estresse oxidativo.

Palavras-chave: Etanol, gastroproteção, probiótico, úlcera gástrica, TRPV1

ABSTRACT

Ethanol has the ability to directly injure the gastric mucosa, and one of the mechanisms by which it causes gastric damage is through the activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1), release of Substance P (SP) and activation of the neurokinin 1 (NK1) receptor. Some lactic acid bacteria and their products have gastroprotective activity in ethanol-induced lesions, with a decrease in SP levels. In addition, the DSM 17938 of *Lactobacillus reuteri*, exhibits therapeutic activities by inhibiting TRPV1. Thus, this study evaluated the effect of *Lactobacillus reuteri* on gastric lesions induced by ethanol and its possible mechanism of action. Swiss mice (25-30g) were pre-treated orally with saline solution (0.9%) or 10^8 CFU of *Lactobacillus reuteri* for 14, 7 and 3 days. On the fourth, eighth and fifteenth day, animals supplemented with *Lactobacillus reuteri* and saline received 50% ethanol (0.5 mL / 25 g v.o.) or saline. To evaluate the role of inhibition of TRPV1 or NK1 activation, *Lactobacillus reuteri* supplemented mice received capsaicin or resiniferatoxin (3 nmol / kg) orally with 50% ethanol, and 1 μ mol / L for 20 g, i.p. of SP on the fourth day, respectively. Samples from each stomach were removed for histopathological evaluation and biochemical analyzes (Malondialdehyde-MDA, Nitrite, Glutathione- GSH and Superoxide dismutase-SOD). Immunohistochemistry was performed for TRPV1, and the concentration of substance P was measured by ELISA. Mucus adhered to the gastric wall and acid secretion were also evaluated. *Lactobacillus reuteri* has reduced gastric damage induced by ethanol ($P < 0.001$). 3 days of pre- treatment with *Lactobacillus reuteri* group has shown a 90.26% ulcer inhibition rate. *L. reuteri* has also reduced the levels of MDA and nitrite when compared to the injured group ($P < 0.01$) and maintained the basal antioxidant parameters of GSH and SOD ($P < 0.001$). The effects of *L. reuteri* supplementation were significantly reversed with RTX administration, with increased MDA and Nitrite ($P < 0.001$) and decreased GSH and SOD ($P < 0.0001$). *Lactobacillus reuteri* was not able to prevent injury caused by the administration of SP and ethanol. TRPV1 expression was significantly lower in the treated group when compared to the injured group. The substance P content in the gastric tissue has been reduced with *Lactobacillus reuteri* in comparison to the damaged group ($P < 0.05$). In addition, *Lactobacillus reuteri* has increased mucus levels in the gastric mucosa and maintained basal levels of acid secretion ($P < 0.005$). Thus, the study demonstrates the protective effects of *Lactobacillus reuteri* on gastric damage induced by ethanol, which is partially due to the inhibition of TRPV1 receptor activation, with reduction of substance p and of oxidative stress.

Keywords: Ethanol, gastroprotection, probiotic, gastric ulcer, TRPV1

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	REPRESENTAÇÃO ILUSTRATIVA DAS REGIÕES ANATÔMICAS DO ESTÔMAGO.....	19
FIGURA 2	REPRESENTAÇÃO ILUSTRATIVA DA PAREDE GÁSTRICA E DAS CÉLULAS DA GLÂNDULA GÁSTRICA.....	20
FIGURA 3	REPRESENTAÇÃO ILUSTRATIVA DOS FATORES DE PROTEÇÃO DA MUCOSA GÁSTRICA.....	23
FIGURA 4	SISTEMA ANTIOXIDANTE ENDÓGENO.....	28
FIGURA 5	CORTE HISTOLÓGICO DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGO APÓS INGESTÃO DE ETANOL 50%.....	33
FIGURA 6	REPRESENTAÇÃO DOS MECANISMOS DO ETANOL NA LESÃO GÁSTRICA.....	37
FIGURA 7	CÉLULAS DE <i>LACTOBACILLUS REUTERI</i> DSM 17938.....	42
FIGURA 8	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL REALIZADO NO PRESENTE TRABALHO.....	47
FIGURA 9	EFEITOS MACROSCÓPICOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM <i>L. REUTERI</i> DSM 17938 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL.....	57
FIGURA 10	ANÁLISE MACROSCÓPICA DA SUPLEMENTAÇÃO COM <i>L. REUTERI</i> DSM 17938 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL.....	58
FIGURA 11	EFEITOS MACROSCÓPICOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM <i>L. REUTERI</i> DSM 17938 NOS ANIMAIS TRATADOS COM CAPSAICINA OU RESINIFERATOXINA E ETANOL	59
FIGURA 12	EFEITO DO TRATAMENTO COM CAPSAICINA OU RTX SOBRE OS EFEITOS PROTETORES DE <i>L. REUTERI</i> DSM 17938 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL.....	60
FIGURA 13	EFEITOS MACROSCÓPICOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM <i>L. REUTERI</i> DSM 17938 NOS ANIMAIS TRATADOS COM SUBSTÂNCIA P E ETANOL.....	61
FIGURA 14	EFEITO DO TRATAMENTO COM SP SOBRE OS EFEITOS PROTETORES DE <i>L. REUTERI</i> DSM 17938 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL	62
FIGURA 15	ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NA MUCOSA DO ESTÔMAGO NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS..	64
FIGURA 16	IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA O RECEPTOR TRPV1 NA MUCOSA GÁSTRICA DOS ANIMAIS TRATADOS.....	67
FIGURA 17	NÍVEIS DE SUBSTÂNCIA P NA MUCOSA GÁSTRICA DOS ANIMAIS TRATADOS.....	68
FIGURA 18	EFEITO PROTETOR DO DSM NOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E PARÂMETROS ANTIOXIDANTES.....	70

FIGURA 19 ESQUEMATIZAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE *L. REUTERI*/DSM 17938 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL..... **79**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS DA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL EM CAMUNDONGOS.....	65
TABELA 2	EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM DSM (10^8 UFC/G DE PESO/DIA POR 3 DIAS) NOS NÍVEIS DE MÚCO E SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA EM CAMUNDONGOS.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE's	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
ANOVA	Análise de variância
DAB	3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloroeto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido Ditio-Nitrobenzóico
DSM	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17 938
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunabsorbância Ligado a Enzima
EROs	Espécies Reativas de Oxigênios
EtOH	Etanol
Gpx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa
H&E	Hematoxilina e eosina
i.p	Intraperitoneal
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
MDA	Malondialdeído
NK1	Neuroquinina Tipo 1
PBS	Tampão Fosfato salino
PGE₂	Prostaglandina E2
PGI₂	Prostaciclina
RTX	Resiniferatoxina
SOD	Superóxido dismutase
SP	Substância P
SUS	Sistema Único de Saúde
TFF	Fator Trefoil
TGI	Trato gastrointestinal
TRPV1	Receptores de Potencial Transitório do Tipo Vanilóide 1
v.o.	Via oral
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 ESTÔMAGO.....	19
2.1.1 Aspectos Morfológicos	19
2.1.2 Fisiologia da secreção gástrica	21
2.1.3 Fatores de defesa da mucosa gástrica.....	23
2.1.4 Moduladores da mucosa gástrica.....	27
2.1.5 Defesas antioxidantes da mucosa.....	28
2.2 ÚLCERA GÁSTRICA.....	31
2.2.1 Etiologia da úlcera gástrica.....	31
2.3 ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA PELO ETANOL	32
2.3.1 Consumo excessivo de álcool.....	32
2.3.2 Efeitos do etanol na mucosa gástrica.....	33
2.3.3- Receptores transientes vanilóides 1 e receptores de neuroquinina 1 no estresse oxidativo da lesão gástrica induzida por etanol.....	35
2.3.4- Estresse oxidativo na lesão gástrica induzida por etanol	37
2.4. ABORDAGEM TERAPÊUTICA DAS ÚLCERAS GÁSTRICAS	38
2.5. PROBIÓTICOS NA SAÚDE DO TRATO GASTROINTESTINAL	39
2.6. <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17 938.....	41
3 OBJETIVOS	45
3.1. OBJETIVO GERAL.....	45
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 DROGAS E REAGENTES	46
4.2 ANIMAIS.....	46
4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	47
4.4. ATIVIDADE DA SUPLEMENTAÇÃO POR <i>LACTOBACILLUS REUTERI</i> DSM 17 938 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL	48
4.4.1. Indução da lesão gástrica por etanol e análise macroscópica das lesões .	48
4.5. AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPV1 NO EFEITO GASTROPTOTETOR DE <i>L. reuteri</i> DSM 17 938 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL	49

4.6. AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR NK1 NO EFEITO GASTROPROTETOR DE <i>L. reuteri</i> DSM 17 938 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL	49
4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	50
4.8 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA O RECEPTOR TRPV1	50
4.8.1 Análise da imuno-histoquímica para TRPV1	51
4.9 MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE SUBSTÂNCIA P	51
4. 10 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS A PARTIR DA MUCOSA GÁSTRICA DOS CAMUNDONGOS	52
4.10.1. Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica.	52
4.10.2. Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica	52
4.10.3. Determinação dos níveis da superóxido dismutase (SOD) na mucosa gástrica	53
4.10.4 Mensuração dos níveis de nitrito e nitrato (Nox)	53
4.11 QUANTIFICAÇÃO DO MUCO ADERIDO À MUCOSA GÁSTRICA	54
4.12 SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA	54
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5. RESULTADOS.....	56
5.1 EFEITO DO <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 SOBRE DANOS GÁSTRICOS INDUZIDOS PELO ETANOL.....	56
5.2 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR TRPV1 NOS EFEITOS PROTETORES DO <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS PELO ETANOL.....	59
5.3 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR NK1 NOS EFEITOS PROTETORES DO <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS PELO ETANOL.....	61
5.4 EFEITO DO <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 NAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS CAUSADAS PELO ETANOL NA MUCOSA GÁSTRICA	63
5.5 EFEITO DO <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 NA EXPRESSÃO DO RECEPTOR TRPV1 NO DANO GÁSTRICO INDUZIDO PELO ETANOL.....	66
5.6 EFEITO DO <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 NOS NÍVEIS DE SUBSTÂNCIA P EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS PELO ETANOL.....	68
5.7 EFEITO PROTETOR DE <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 SOBRE OS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E PARÂMETROS ANTIOXIDANTES	69
5.8 EFEITO DO <i>L. reuteri</i> DSM 17938 NOS NÍVEIS DE MUCO ADERIDO À PAREDE GÁSTRICA E SECREÇÃO ÁCIDA.....	72

6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXO	101
CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	102

1 INTRODUÇÃO

O consumo excessivo de álcool etílico é um importante problema de saúde pública, estando relacionado com o risco de desenvolvimento de várias doenças, resultando em 3,3 milhões de mortes por ano (WHO, 2014). Altas concentrações de etanol presentes nas bebidas alcoólicas têm a capacidade de lesar diretamente a mucosa do trato gastrointestinal (TGI), resultando em danos agudos e crônicos, como gastrite hemorrágica erosiva e úlceras pépticas (BUJANDA, 2000; STERMER, 2002). Como o etanol é uma das drogas psicoativas mais comumente aceitas e abusadas (NELSON; MCNALL, 2016), a lesão gástrica gerada por seu abuso é uma consequência preocupante.

A administração aguda de etanol rompe a barreira de muco-bicarbonato, reduz as defesas antioxidantes, modula o sistema de óxido nítrico e reduz o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (ABDEL-SALAM *et al.*, 2001; MIZUI *et al.*, 1987; NANJI *et al.*, 1995; ROSS; TURNBERG, 1983). Um mecanismo importante pelo qual o etanol medeia essas ações prejudiciais à mucosa gástrica é através da ativação do receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 1 (TRPV1), que está presente nos nervos sensoriais do estômago (GAZZIERI *et al.*, 2007). A ativação desse receptor causa a liberação de neuropeptídeos, como a Substância P (SP), que é capaz de ativar o receptor de neuroquinina tipo 1 (NK1) em células epiteliais gástricas, e aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são os principais agentes citotóxicos da mucosa gástrica (GAZZIERI *et al.*, 2007; HAYASHI *et al.*, 1996; KARMELI *et al.*, 1991).

EROs causam a peroxidação de componentes lipídicos na membrana celular e quantidades aumentadas desses radicais livres, juntamente com inibição de enzimas antioxidantes e depleção de glutathione, o etanol causa danos e morte celular (GETZOFF *et al.*, 1983; KWIECIEN *et al.*, 2014). Assim, os agentes que inibem a via de geração de radicais livres mediada pelo etanol, como os antagonistas dos receptores TRPV1 e NK1, possuem um grande potencial na proteção contra lesões gástricas induzidas pelo etanol (GAZZIERI *et al.*, 2007).

No que diz respeito ao tratamento deste tipo de lesão, são utilizados principalmente inibidores da bomba de prótons, porém este agente pode reduzir a absorção de certos nutrientes, além de outros efeitos indesejáveis (FARRELL *et al.*, 2011). Isso motiva a busca de novas abordagens terapêuticas para prevenção e tratamento de lesões induzidas pelo etanol e, neste contexto, os probióticos são potenciais candidatos, pois apresentam diversas atividades benéficas ao trato gastrointestinal, com poucos efeitos colaterais e resistência ao pH estomacal (HILL *et al.*, 2014). Mesmo com número limitado de investigações sobre a ação dos probióticos no tratamento de úlceras gástricas, estudos experimentais demonstram resultados promissores desses microrganismos tanto no tratamento como na prevenção destas úlceras (KHODER *et al.*, 2016). Em particular, as bactérias ácido-láticas e seus produtos são os probióticos mais validados na atividade gastroprotetora em lesões induzidas pelo etanol, uma vez que diminuem os níveis de SP e peroxidação lipídica (AZMI *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2009; SENOL *et al.*, 2011; SUO *et al.*, 2016).

Uma bactéria ácido-láctica que vem se destacando como probiótico, sendo bastante investigada quanto a seus benefícios para a saúde humana é o *Lactobacillus reuteri*, um bacilo gram-positivo que habita o TGI de humanos e outros mamíferos (ROSANDER *et al.*, 2008). Muitas pesquisas experimentais e clínicas mostram sua eficácia no tratamento de algumas enfermidades do trato digestivo (SHORNIKOVA *et al.*, 1997; SAVINO *et al.*, 2010; EMARA *et al.*, 2014). Em especial, a estirpe *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 apresenta atividade antinociceptiva visceral em roedores por um mecanismo dependente dos neurônios sensoriais, inibindo a ativação dos receptores TRPV1 (PEREZ-BURGOS *et al.*, 2015).

Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de *L. reuteri* DSM 17938 em lesões gástricas induzidas pelo etanol, e avaliar se o seu possível mecanismo de ação está relacionado à inibição da ativação de TRPV1 pelo etanol, e consequente redução de SP, minimizando o estresse oxidativo e a lesão gástrica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

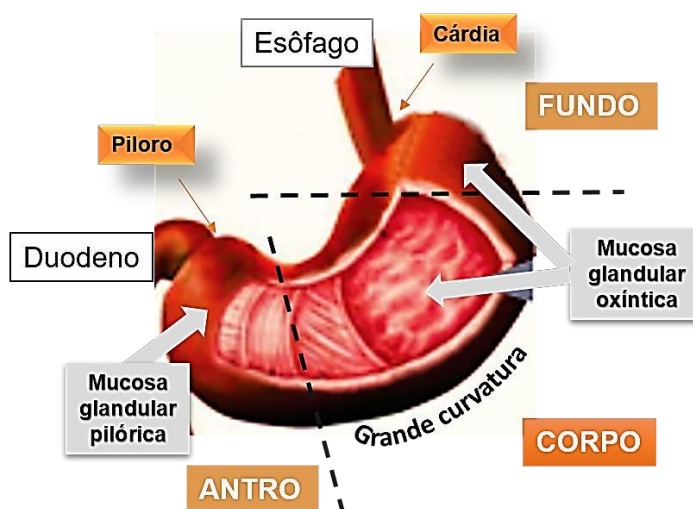
2.1 ESTÔMAGO

O estômago, presente no trato gastrointestinal superior, desempenha importante função na digestão dos alimentos e sua entrega ao intestino, para que haja a absorção dos nutrientes necessários ao organismo. Além disto, este órgão envia sinais que ajudam a coordenar a fome e saciedade (WILLET; MILLS, 2016).

2.1.1 Aspectos Morfológicos

O estômago pode ser anatomicamente subdividido em três regiões topográficas: Fundo, corpo e antro, sendo limitado na porção superior pelo esfíncter esofágico inferior (Cárdia), e pelo esfíncter pilórico, na porção inferior do estômago (HOGBEN *et al.*, 1974), como demonstrado na **figura 1**.

Figura 1- Representação ilustrativa das regiões anatómicas do estômago



Autoria própria, 2017

Em termos de funcionalidade, o estômago pode ser dividido em duas regiões glandulares: Área oxíntica, compreendendo 80% da superfície gástrica

proximal do estômago (Fundo e corpo), e mucosa antral ou pilórica, que compreende 20% da área total do órgão (CHOI *et al.*, 2014).

A **figura 2** representa um corte transversal da parede gástrica, expondo os diferentes tecidos que a constituem. Histologicamente, a parede do estômago pode ser subdividida nas seguintes camadas teciduais:

- ✓ **Camada mucosa** → Camada mais interna, composta por tecido epitelial prismático simples, formando as glândulas gástricas, e pela lâmina própria (tecido conjuntivo);
- ✓ **Camada submucosa** → Constituída por tecido conjuntivo frouxo irrigado por vasos sanguíneos e plexo nervoso;
- ✓ **Camada muscular** → Composta pelas camadas musculares oblíqua, circular, longitudinal e pelo plexo mioentérico;
- ✓ **Camada serosa** → Camada mais externa, formada por tecido conectivo. (BOCK; RICHARDS; WITTS, 1963; OWEN, 1986)

Figura 2- Representação ilustrativa da parede gástrica e das células da glândula gástrica

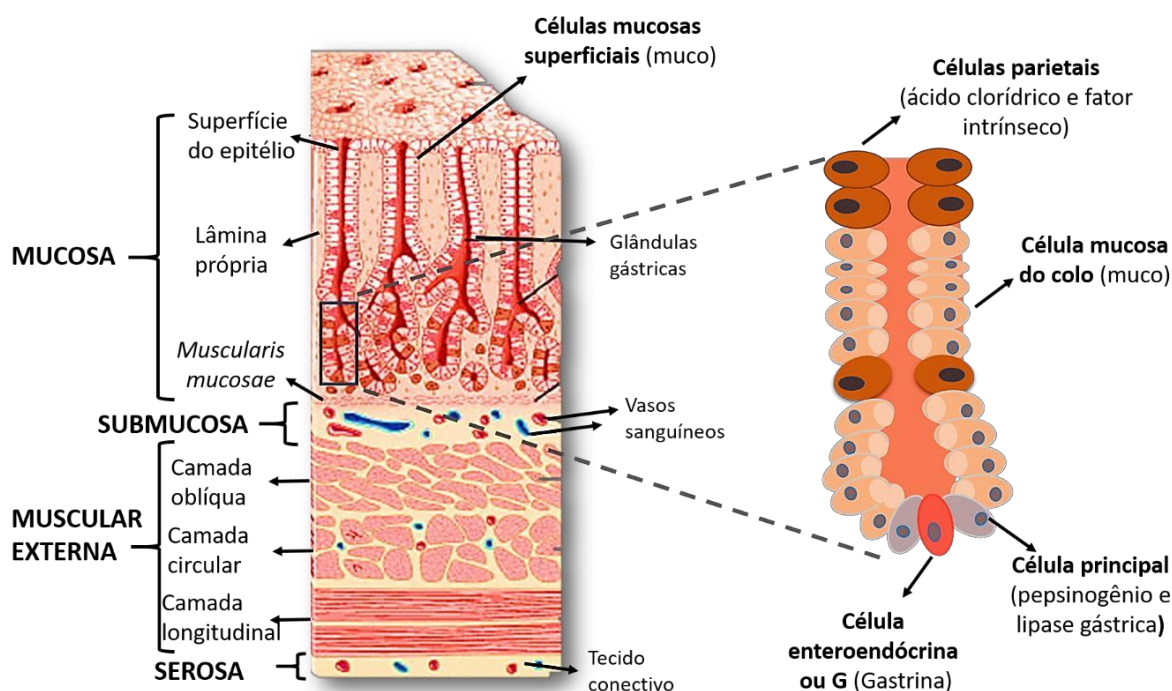


Imagem: Modificada e adaptada de *Encyclopædia Britannica, Inc*, 2003.

As glândulas oxínticas da camada mucosa, presentes na superfície interna corpo e fundo do estômago, possuem uma abertura denominada istmo,

tendo em seu interior células mucosas superficiais e células mucosas do colo, localizadas no colo glandular (PARADISO; TSIEN; MACHEN, 1987; FELDMAN *et al.*, 2010). Elas também são constituídas principalmente por células parietais (secretoras de ácido clorídrico e fator intrínseco), células principais ou pépticas (secretoras de pepsinogênio), localizadas mais profundamente (PRINZ *et al.*, 1992; CHOI *et al.*, 2014), como ilustrado na **figura 2**. A porção oxíntica ainda possui as células D, que secretam somatostatina, e células tipo- enterocromafim, que secretam histamina e estão associadas à secreção gástrica (ZAKI *et al.*, 2002; PRINZ *et al.*, 1993; SCHUBERT; PEURA, 2008). A mucosa pilórica (antro gástrico) não apresenta células parietais, mas possui as células G ou enteroendócrinas, que estimulam a liberação do hormônio gastrina, também importante para o controle da secreção gástrica (SAFFOURI *et al.*, 1979; SCHUBERT; PEURA, 2008; SCHUBERT, 2015).

O estômago ainda possui o Sistema Nervoso Entérico (SNE), responsável pela liberação de mediadores envolvidos na regulação fisiológica da secreção gástrica, motilidade, proteção e resposta a excitações químicas e mecânicas (GREEN; DOCKRAY, 1988; CLARKE; DAVISON, 1978; BERTHOUD; POWLEY, 1992).

2.1.2 Fisiologia da secreção gástrica

Uma das principais funções secretórias do estômago é a secreção de ácido gástrico, que tem a capacidade de eliminar microrganismos e inibir o crescimento bacteriano, promover a digestão de proteínas e facilitar a absorção de ferro, cálcio e vitamina B12 (GIANNELLA; BROITMAN; ZAMCHECK, 1969; JACOBS; MILES, 1969; MARCUARD; ALBERNAZ; KHAZANIE, 1994; BO-LINN *et al.*, 1984; WALDUM *et al.*, 2015; SCHUBERT, 2016).

A secreção gástrica é regulada pela via neuronal, através da acetilcolina, via parácrina, por meio da histamina, e endócrina, através da gastrina (MCINTOSH *et al.*, 1981; WALDUM *et al.*, 1991). Com a chegada do alimento ao estômago, ocorre uma distensão na região antral e no fundo deste órgão, que leva a ativação de receptores de estiramento, que intensificam as respostas secretoras, por meio da liberação de gastrina pelas células G, e liberação de

acetilcolina e histamina (GROSSMAN; ROBERTSON; IVY, 1948; SCHUBERT; MAKHLOUF, 1993; WEIGERT *et al.*, 1997; RAMSAY; CARR, 2011). As células parietais possuem receptores específicos para acetilcolina (receptores muscarínicos do tipo 3- M_3), para histamina (receptores histaminérgicos do tipo 2- H_2) e gastrina (receptor de colecistocinina do tipo do tipo 2- CCK_2) (PFEIFFER *et al.*, 1990; MAJOR; SCHOLLES, 1978; KOPIN *et al.*, 1992; SCHUBERT, 2016).

A ativação de neurônios intrínsecos provoca a liberação de acetilcolina, que ativa receptores M_3 , e induz a liberação de Ca^{++} na porção apical das células secretoras, que culmina no aumento de secreção de H^+ por troca ativa com K^+ , e facilita a inserção de mais bombas de prótons (H^+/K^+ - ATPase), uma enzima que provoca o transporte ativo de prótons H^+ na membrana apical das células parietais (AIHARA *et al.*, 2005). Além disto, novos estudos mostram que a secreção ácida também pode ser regulada por meio de receptores M_4 , que inibem a liberação de somatostatina, minimizando os efeitos inibitórios da acidez gástrica (TAKEUCHI *et al.*, 2016).

A liberação de histamina pelas células tipo-enterocromafim leva à ativação de receptores H_2 nas células parietais, que provoca a elevação de AMP cíclico, que causa, por meio da liberação de Ca^{++} , exocitose de vesículas ricas em H^+/K^+ - ATPase para a membrana apical das células parietais, trocando-o por K^+ (SAHOO *et al.*, 2017). Receptores histamínicos do tipo 3 também estão associados com o aumento da secreção ácida, por inibir somatostatina (VUYYURU; SCHUBERT, 1997).

A gastrina é o principal hormônio estimulatório de secreção na digestão alimentar, que medeia suas ações pelo receptor CCK_2 , que além de estar presente e estimular secreção nas células parietais por liberação de Ca^{++} , este receptor está presente em células do tipo- enterocromafim, e quando ativados estimulam a secreção de histamina por essas células, o que contribui indiretamente para o aumento da secreção (TRIPATHI *et al.*, 2015; SCHUBERT, 2016).

Além destes principais agentes estimulantes da secreção gástrica no organismo, a grelina e a motilina contribuem para o aumento da acidez gástrica, através da liberação de histamina (MASUDA *et al.*, 2000; KONTUREK *et al.*, 1976; SCHUBERT, 2016). O sulfeto de hidrogênio, mediador gasoso envolvido

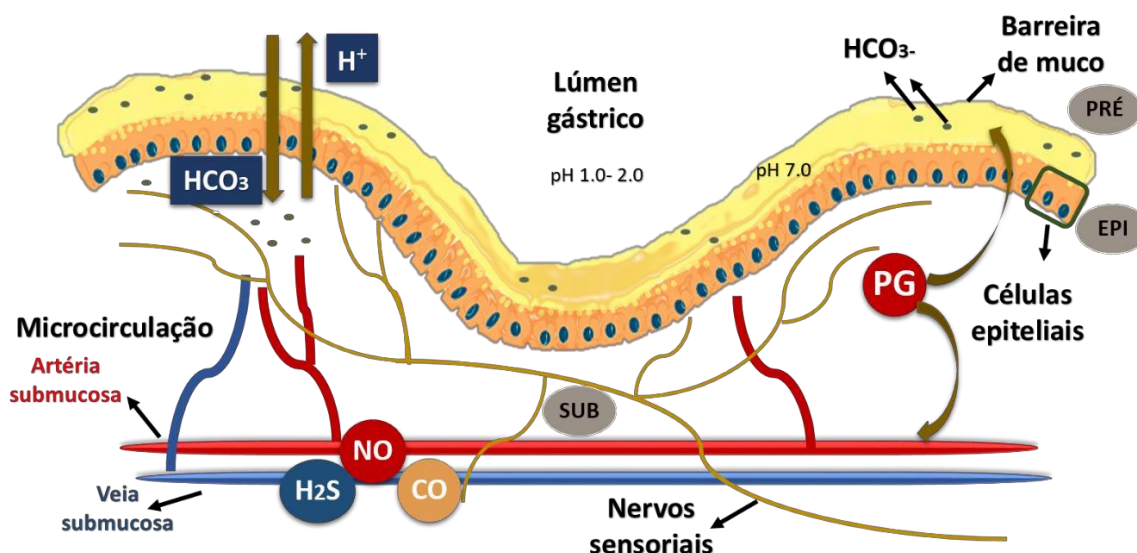
na proteção gástrica, também contribui para o aumento da secreção gástrica diretamente nas células parietais, por mecanismos intracelulares que envolvem a via dos canais de K_{ATP} e ativação de AMP cíclico, que culmina no aumento da acidez gástrica, devido ao aumento de prótons H^+ (SUN *et al.*, 2016).

A inibição fisiológica da acidez gástrica ocorre por meio da liberação de somatostatina das células D, que atuam sobre as células G, reduzindo a liberação da gastrina. Além disto, agonistas do receptor GLP-1 inibem a secreção gástrica e diminuem a concentração de glicose pós-prandial (RAPTIS *et al.*, 1975; SMITS *et al.*, 2016; SCHUBERT, 2016).

2.1.3 Fatores de defesa da mucosa gástrica

A mucosa gástrica é continuamente exposta a fatores agressivos endógenos, como ácido clorídrico, pepsina e sais biliares presentes no ambiente estomacal, e é susceptível ao contato com fatores externos nocivos à mucosa, como bebidas alcólicas, medicamentos (AINE'S e Bifosfonatos) e bactérias (WALLACE, 2008; BLANK *et al.*, 1997). A mucosa do estômago apresenta elementos de defesa contra os agentes nocivos em condições fisiológicas que podem ser classificados como: Fatores de defesa da mucosa pré-epiteliais, epiteliais e sub-epiteliais (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015), como ilustrado na **figura 3**.

Figura 3- Representação ilustrativa dos fatores de proteção da mucosa gástrica



A figura ilustra os mecanismos de defesa da mucosa gástrica pré-epiteliais (PRÉ), representados na imagem pela barreira de muco e bicarbonato (HCO_3^-), que garantem o pH neutro na mucosa; Epiteliais (EPI), representado pelas células epiteliais justapostas; Sub-epiteliais (SUB), representados pela microcirculação (vasos sanguíneos) e nervos sensoriais. Agentes moduladores importantes para a manutenção da mucosa gástrica, como os mediadores gasosos (Óxido nítrico-NO; Sulfeto de Hidrogênio- H_2S ; Monóxido de Carbono- CO), e as prostaglandinas (PG), também estão representados. Autoria própria, 2017.

2.1.3.1 Fatores de defesa pré-epiteliais

A camada de muco e bicarbonato é considerada um fator de proteção pré-epiteliais mecânica da mucosa gástrica, atuando como primeira linha de defesa contra agentes agressores externos e contra o próprio suco gástrico (ROSS; TURNBERG, 1983; LAINE *et al.*, 2008). O muco, um gel viscoso e aderente, secretado no estômago, desempenha um papel de barreira protetora contra a pepsina, mantendo pH neutro (BAHARI; ROSS; TURNBERG, 1982; ROSS; TURNBERG, 1983; SCHADE *et al.*, 1994; PHILLIPSON *et al.*, 2002).

O muco é formado por 95% de água e 5% de mucinas, que são glicoproteínas, que se polimerizam em um gel viscoso, e que possuem a capacidade de reter o bicarbonato secretado pelas células epiteliais (ATUMA *et al.*, 2001). MUC5AC e MUC6 são produtos de genes da mucina gástrica, que se polimerizam, formando multímeros de mucina, e formam uma camada de muco interna e uma camada de muco livre na mucosa do estômago (OTA; KATSUYAMA, 1992; GENDLER; SPICER, 1995; ATUMA *et al.*, 2001; ALLEN; FLEMSTROM, 2005). A secreção de muco pelas células epiteliais é estimulada pelos hormônios gastrina, secretina e pelas prostaglandinas E_2 (PGE_2) e por agentes colinérgicos (BOLTON; PALMER; COHEN, 1978; TAKAFUMI *et al.*, 1993; TANI *et al.*, 2002; LAINE *et al.*, 2008).

Um outro importante agente para o gel de muco é o fator trefoil de baixa massa molecular da família de peptídeos (TFF), que é secretado juntamente com o muco, pelas células epiteliais da mucosa gástrica (SANDS; PODOLSKY, 1996) e estão envolvidos no empacotamento das mucinas e na defesa epitelial da mucosa (PALILEO; KAUNITZ, 2011; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015). Além disto, a barreira de muco é revestida por uma película surfactante de

fosfolipídios, criando uma natureza hidrofóbica, que retarda a difusão de H^+ (SHUCHUN *et al.*, 1996; TARNAWSKI *et al.*, 2013; LAINE *et al.*, 2008).

As células epiteliais presentes nesta camada de muco secretam bicarbonato (HCO_3^-), liberando-o para o interstício das células parietais (secretoras de ácido clorídrico), onde tamponam o excesso de H^+ , ocasionando um pH neutro próximo ao epitélio, enquanto a faixa de pH do lúmen gástrico está entre 1 e 2 (FLEMSTROM; GARNER, 1982).

Esta camada mucosa do estômago apresenta concentrações significantes de glutathiona reduzida, um agente sulfídrico não-proteico, que protege a mucosa, prevenindo a ação tóxica de radicais livres (TAKEUSHI *et al.*, 1989; POSSENTI, *et al.*, 2011).

2.1.3.2 Fatores de defesa epiteliais

Quando os componentes pré-epiteliais de defesa da mucosa gástrica não são capazes de protegê-la, o componente epitelial atua como uma segunda barreira de defesa. As células epiteliais formam uma barreira que impede a difusão do ácido gástrico, da pepsina e outros agentes agressores, por estarem intimamente interligadas por junções comunicantes e pela presença de fosfolipídios nestas células (VALNES *et al.*, 1984; KWIECIEN *et al.*, 2014).

Além destas células serem capazes de secretar muco, bicarbonato e produzirem prostaglandinas, em condições estressantes, como a presença de espécies reativas de oxigênio, fatores de transcrição das proteínas do choque térmico (HSPs) são gerados, o que impede a desnaturação proteica, evitando a apoptose das células epiteliais (MORIMOTO, 1998; LEUNG *et al.*, 2015). O epitélio também secreta fatores TFFs, que regulam a reepitelização e defesa epitelial (HERNANDEZ *et al.*, 2009; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

2.1.3.3 Fatores de defesa subepiteliais

✓ **Microcirculação**

O fluxo sanguíneo é requerido para a entrega de nutrientes, oxigênio, hormônios gastrointestinais e manutenção da integridade da mucosa gástrica, sendo importante para a produção de muco, bicarbonato, e proteção contra agentes agressores (STARLINGER *et al.*, 1981; HUI *et al.*, 1993; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015; TARNAWSKI *et al.*, 2012). A microcirculação responde a agentes agressores que penetram a camada sub-epitelial, com o aumento do fluxo sanguíneo, impedindo que esses agentes danosos alcancem camadas mais profundas da mucosa (HOLZER *et al.*, 1991a; TARNAWSKI *et al.*, 2012).

O endotélio vascular da mucosa gástrica tem a capacidade de gerar vasodilatadores potentes como os mediadores gasosos endógenos óxido nítrico (NO), sulfeto de hidrogênio (H₂S), monóxido de carbono (CO), prostaciclina (PGI₂) e prostaglandina E₂ (PGE₂) para proteger a mucosa e a microvasculatura de agentes constritores e agressores, mantendo a perfusão tecidual (MACNAUGHTON *et al.*, 1989; PAPAPETROPOULOS *et al.*, 2009; SHIBUYA *et al.*, 2009; THORUP *et al.*, 1999; GERBER *et al.*, 1982; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

✓ **Inervação sensorial**

O sistema nervoso entérico também desempenha funções importantes na mucosa gástrica, podendo ser influenciado por diferentes mediadores (HOLZER *et al.*, 1991a; HOLZER *et al.*, 1991b). A mucosa gástrica e os vasos submucosos são inervados por neurônios sensoriais aferentes, e suas fibras alcançam as células epiteliais (STROFF *et al.*, 1995; LAINE *et al.*, 2008). Estas terminações nervosas detectam a presença de ácido, e a ativação destes nervos afeta as arteríolas submucosas, e regulam o fluxo sanguíneo (GUTH, 1992).

Os receptores TRPV1, presentes nesses neurônios aferentes primários, quando ativados por pequenas doses de seus agonistas, desempenham atividade gastroprotetora, aumentando o fluxo sanguíneo e secreção de muco e bicarbonato, e seus terminais periféricos podem liberar neuropeptídios como a

substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), um poderoso vasodilatador. (WARZECHA *et al.*, 2011; SZOLCSANYI; BARTHO, 2001). Porém, uma ativação exacerbada deste receptor prejudica a hiperemia, e causa danos a mucosa gástrica (LAINE *et al.*, 2008; GAZZIERE *et al.*, 2007). Os efeitos do vasodilatador CGRP são mediados pelo óxido nítrico, tendo assim um importante papel para a regulação da proteção da mucosa gástrica (ABDEL-SALAM *et al.*, 1999). A literatura também mostra que em parte os efeitos citoprotetores da ativação dos neurônios sensoriais é dependente de prostaglandinas endógenas (TAKEUCHI *et al.*, 2003).

2.1.4 Moduladores da mucosa gástrica

Hoje sabe-se que moléculas gasosas como o óxido nítrico, sulfeto de hidrogênio e monóxido de carbono desempenham papéis fisiológicos na manutenção gástrica e proteção contra agentes agressores (MAGIEROWSKI *et al.*, 2015).

O óxido nítrico pode ser produzido pelo endotélio vascular, células epiteliais e nervos sensoriais, através da atividade da enzima sintase de Óxido Nítrico neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzida (iNOS), responsável pela grande produção de NO, presente em macrófagos, neutrófilos e células endoteliais (MA; WALLACE, 2000). O óxido nítrico é um regulador da secreção de muco no estômago de grande importância, e age através da estimulação da adenilato ciclase nas células epiteliais (BROWN *et al.*, 1993; KWIECIEN *et al.*, 2014). Este mediador gasoso ativa a enzima guanilato ciclase, levando a formação de GMP cíclico, que ativa proteínas quinase G, e dispara uma cascata de fosforilação para promover vasodilatação (DENNINGER; MARLETTA, 1999; MONCADA *et al.*, 1991; BRZOWSKI *et al.*, 2008). Este mediador gasoso também estimula a síntese de prostaglandinas, levando ao aumento de muco e bicarbonato, e participa do processo de cicatrização de úlceras gástricas (BRZOWSKI *et al.*, 1997a; BRZOWSKI *et al.*, 1997b; MA; WALLACE, 2000). Porém, em altas concentrações, o NO está associado com uma resposta inflamatória na mucosa gástrica, bem como alterações na barreira de muco protetora (SHAH *et al.*, 2004).

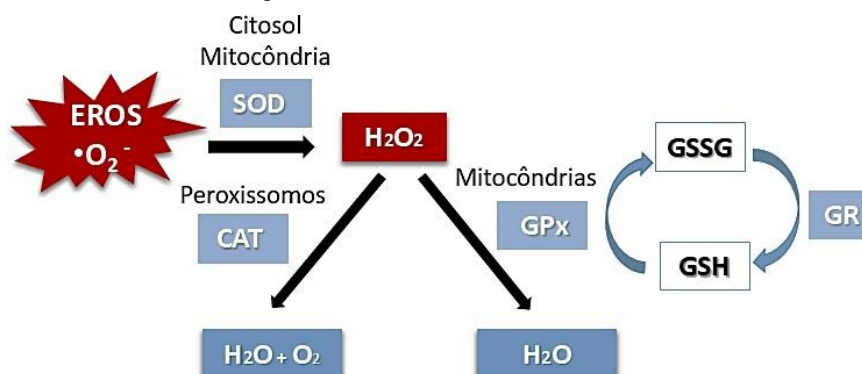
Estudos mostram que outros mediadores gasosos endógenos como o sulfeto de hidrogênio e monóxido de carbono estão igualmente envolvidos na manutenção e proteção gástrica, como a modulação do endotélio vascular gástrico (MEDEIROS *et al.*, 2009; BECKER *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2010; (MACNAUGHTON *et al.*, 1989; PAPAPETROPOULOS *et al.*, 2009; SHIBUYA *et al.*, 2009; THORUP *et al.*, 1999; GERBER *et al.*, 1982; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015). Além disso, recentes estudos mostram que o NO, CO e H₂S interagem entre si para desempenhar esses efeitos fisiológicos na mucosa gástrica (MILLER *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2009; LUCETTI *et al.*, 2017).

As prostaglandinas, especialmente a prostaglandina E₂ (PGE₂) e prostaciclina I₂ (PGI₂), também são importantes na regulação da integridade da mucosa, secreção de muco e bicarbonato, regulação do fluxo sanguíneo e da secreção ácida (HALL; VAN DEN HOVEN, 1987; TAKEUCHI, 2014). Estas são produzidas a partir do ácido araquidônico dos fosfolípidios das membranas celulares pela isoenzima ciclooxigenase-1 (COX-1), e a inibição de sua produção provoca o surgimento de úlceras gástricas (CRYER; FELDMAN, 1999; SINHA *et al.*, 2015)

2.1.5 Defesas antioxidantes da mucosa

Outro mecanismo de defesa que organismo possui para a manutenção da mucosa gástrica contra agentes lesivos endógenos ou exógenos, são sistemas antioxidantes endógenos como superóxido dismutase, catalase glutaciona peroxidase, glutaciona-redutase e glutaciona (L-γ-glutamil-L-cistenilglicina) (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014), como esquematizado na **Figura 4**.

Figura 4: Sistema antioxidante endógeno



Defesas antioxidantes no organismo. Efeito das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) presente no citosol e nas mitocôndrias, da catalase (CAT) nos peroxissomos, da glutathione peroxidase (GPx) presente nas mitocôndrias, glutathione-reductase (GR) na eliminação de espécies reativas de oxigênio. A autoria própria, 2017.

Espécies reativas de oxigênio são radicais livres produtos do metabolismo normal celular, ou podem ser geradas devido a componentes externos tóxicos (INDO *et al.*, 2007; WEINBERG *et al.*, 2010; GONZÁLEZ; PARIENTE; SALIDO, 2007; BELHADJ *et al.*, 2014). Os radicais superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são os mais comuns, sendo os primeiros altamente reativos e com período de vida curto, enquanto o H_2O_2 apresenta menos reatividade, o que lhe dá mais tempo para se locomover ao núcleo celular, sendo mais prejudicial ao DNA (ASADA; KANEMATSU, 1976; WINTERBOURN.; METODIEWA, 1999; TSANG *et al.*, 2014).

Um aumento descontrolado de EROs gera o estresse oxidativo, que afeta indiscriminadamente proteínas, lipídeos, polissacarídeos, DNA, e desencadeiam a via intrínseca da apoptose (STADTMAN; LEVINE, 2000; RUBBO *et al.*, 1994; RICHTER *et al.*, 1988; LEDOUX *et al.*, 1999). Além disto, agentes lesivos que desencadeiam estresse oxidativo, junto com o aumento da produção de radicais $NO\bullet$ se tornam deletérios ao organismo, pois a reação do $NO\bullet$ com o O_2^- gera o peroxinitrito ($ONOO^-$), que é altamente reativo, podendo reagir com grupamentos de proteínas celulares, lipídios ou DNA (RUBBO *et al.*, 1994; SZABÓ; OHSHIMA, 1997; BURNEY *et al.*, 1999; PACHER *et al.*, 2007). Devido a esses efeitos deletérios, as células desenvolveram um sistema antioxidante para eliminação desses radicais livres, composto pela superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e glutathione (GSH) (SALIN; MCCORD, 1975; MICHIELS *et al.*, 1994; APEL, 2004).

A Superóxido Dismutase são metaloenzimas que catalisam a reação de dismutação que transformam ânions superóxido em peróxido de hidrogênio, desempenhando um importante papel na eliminação de espécies reativas de oxigênio (GETZOFF *et al.*, 1983). Os mamíferos possuem 3 isoformas de SOD, de acordo com o metal em seu sítio ativo: a CuZn-SOD (Cobre e zinco; SOD1), a Mn-SOD (Manganês; SOD2) e a SOD extracelular ou EC-SOD (Ferro) (MELOV *et al.*, 1998; SCANDALIOS, 1993). A redução da atividade de SOD está

relacionada com a úlcera gástrica, confirmando os efeitos prejudiciais de espécies reativas de oxigênio e a importância do sistema antioxidante (NAITO *et al.*, 1992; GÖTZ *et al.*, 1996; BHATTACHARYYA *et al.*, 2014).

A enzima tetramérica Catalase, encontrada nos peroxissomos, presente em todos os organismos vivos, converte H_2O_2 em H_2O e O_2 , sem para isso desgastar agentes redutores celulares (AEBI, 1984). Ela metaboliza o H_2O_2 de forma rápida e eficiente, tendo um papel importante contra os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio (CHANCE, 1947; SIRAKI *et al.*, 2002).

Outro processo antioxidante importante é feita pela Glutathione peroxidase (GPx), que converte a glutathione em glutathione oxidada (GSSG), e nesse processo reduz H_2O_2 a H_2O e lipídios hidroperóxidos ($\text{ROOH}\cdot$) em álcoois estáveis, apresentando importante papel na proteção das células contra os efeitos do peróxido de hidrogênio. Já a Glutathione reductase reduz a glutathione oxidada para GSH (MCCAY *et al.*, 1976; BOMPART *et al.*, 1990; BHATTACHARYYA *et al.*, 2014).

O GSH atua como um cofator da GPx, otimizando a redução de H_2O_2 a H_2O . Além disto, este tripeptídeo reage de modo não enzimático com o radical hidroxila, N_2O_3 , e com o peroxinitrito, tendo assim uma atividade antioxidante própria (GRIFFITH, 1999). O seu núcleo do resíduo cistetilglicina tem a capacidade de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical $\text{GS}\cdot$ que é dimerizado em GSSG, que é então reduzido pela glutathione reductase novamente em GSH (KRETZSCHMAR, 1996; JÚNIOR *et al.*, 1998). A glutathione detoxifica hidroperóxidos a partir da seguinte reação:



Desta forma, vê-se a importância deste sistema antioxidante endógeno, e que uma redução dos níveis destes componentes antioxidantes leva ao aumento do estresse oxidativo e lesão celular, causando injúrias como gastrite e úlcera gástrica.

2.2 ÚLCERA GÁSTRICA

As úlceras gástricas são definidas como lesões na mucosa que se estendem até 5 mm de diâmetro, podendo afetar camadas mais internas (HUNT *et al.*, 2015). Os principais sinais e sintomas das úlceras são dor epigástrica, queimação e desconforto, porém muitas vezes ela não apresenta sintomatologia clínica, e em alguns casos complicações como hemorragia e perfuração podem aparecer, sendo responsável pelos casos de internação hospitalar (SIPPONEN *et al.*, 1990; BARKUN; LEONTIADIS, 2010).

A úlcera péptica está relacionada com a perda da qualidade de vida e produtividade no trabalho, gerando grandes gastos para os sistemas de saúde (BARKUN; LEONTIADIS, 2010). No Brasil, segundo o Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH-SUS), só nos anos de 2014 a 2016 as úlceras gástricas e duodenais geraram um gasto de 37.523.154,77 reais, sendo registrado um número de 34.443 internações hospitalares devido a úlceras neste período. O número de óbitos registrados no sistema foi de 3.065, sendo a região sudeste do país a com maior número de casos e óbitos pela doença ulcerosa.

Visto isto, percebe-se que esta desordem gastrointestinal é um grande problema de saúde pública, que afeta a qualidade de vida de muitos brasileiros, e estudos que visem diminuir os efeitos desta injúria ou preveni-la, podem contribuir para a diminuição dos casos e gastos gerados pela doença e suas complicações.

2.2.1 Etiologia da úlcera gástrica

As úlceras gástricas são desordens comuns do trato gastrointestinal, que ocorrem devido a um desequilíbrio entre fatores agressores a mucosa gástrica (ácido gástrico, secreção de pepsina, radicais livres, leucotrienos, endotelinas, e fatores exógenos) e fatores defensivos (Muco gástrico, bicarbonato, fluxo sanguíneo normal, prostaglandina E₂, o óxido nítrico, e enzimas antioxidantes) (TYTGAT, 2000; SHEEBA *et al.*, 2016). Com a diminuição da proteção da mucosa gástrica, a secreção normal de ácido clorídrico e pepsina podem lesionar esta região (HARBISON; DEMPSEY, 2005).

O aumento na incidência das úlceras gástricas dar-se principalmente devido a exposição a fatores agressivos exógenos para a mucosa gástrica como o etanol, estresse, tabagismo e consumo frequente de AINES (LEVENSTEIN *et al.*, 2015; KANNO *et al.*, 2015; SOSTRES *et al.*, 2015; CHOUHAN *et al.*, 2016; BELAICHE *et al.*, 2001).

Uma das principais causas para o desenvolvimento desta doença é a infecção por *Helicobacter pylori*, que diminuiu nos últimos anos devido a diminuição da infecção pela bactéria. No entanto, o consumo abusivo de álcool e AINES, além do envelhecimento populacional, têm contribuído para o aumento da sua incidência e o surgimento de complicações (LEVENSTEIN *et al.*, 2015; KANNO *et al.*, 2015; SOSTRES *et al.*, 2015; YUAN *et al.*, 2006; LAU *et al.*, 2011; AHSBERG *et al.*, 2011).

2.3 ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA PELO ETANOL

2.3.1 Consumo excessivo de álcool

O consumo excessivo de álcool vem se mostrando como um grande problema de saúde pública, visto que só no ano de 2012, mais de 3 milhões de mortes foram atribuídas a seu consumo elevado, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2014). Ainda segundo dados da mesma organização, em 2010, 16% da população apresentaram um comportamento abusivo de álcool. De acordo com o *Center for Behavioral Health Statistics and Quality* (2016), em 2015, 138,3 milhões de pessoas acima de 12 anos eram usuários frequentes do álcool nos Estados Unidos. Além disso, 17,3 milhões americanos alegam abuso no consumo de álcool em 2015. No Brasil, do ano de 2006 a 2012, segundo o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD), houve um aumento no número de pessoas que consomem de forma nociva esta droga, com ingestão de quatro unidades de álcool para mulheres e cinco unidades para homens, em um período de até duas horas (LARANJEIRA *et al.*, 2014).

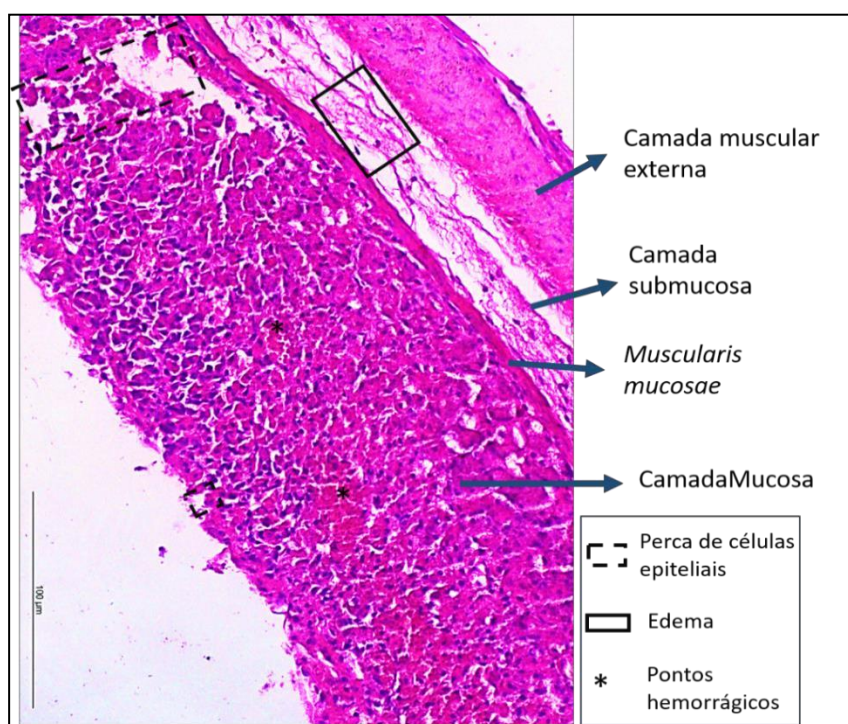
Muitos distúrbios agudos e crônicos são advindos do consumo abusivo desta substância, como distúrbios do trato gastrointestinal (WHO, 2014), especialmente as úlceras gástricas, que podem gerar complicações, se não

tratadas. Como o álcool é uma das drogas psicoativas mais abusadas e aceitas pela população, a injúria gástrica devido a este agente é uma questão preocupante (NELSON; MCNALL, 2016).

2.3.2 Efeitos do etanol na mucosa gástrica

A ingestão de grande quantidade de etanol, presente nas bebidas alcólicas, tem a capacidade de lesar diretamente a mucosa do estômago, resultando em uma gastrite do tipo hemorrágica, causando edema, hemorragias subepiteliais e esfoliação celular (GUSLANDI, 1987), como mostra a **figura 5**.

Figura 5- Corte histológico da mucosa gástrica de camundongo após ingestão de etanol 50%



Fotomicrografia dos efeitos do tratamento agudo com etanol a 50% em na mucosa gástrica. O etanol causou na mucosa uma lesão do tipo hemorrágica, com perca celular e edema. Aumento de 200x. Autoria própria, 2017.

. O etanol também estimula a produção de mediadores inflamatórios como leucotrienos, prostanoídes e produtos de mastócitos, que cooperam para a gravidade da injúria (WALLACE *et al.*, 1985; PESKAR *et al.*, 1988). Além disso,

outros fatores contribuem para a lesão gástrica causada pelo etanol. Uma importante via ligada a sua patogênese na lesão gástrica é através da geração de espécies reativas de oxigênio (MIZUI *et al.*, 1987; CHOI *et al.*, 2016).

Este agente causa este tipo de injúria por mecanismos que envolvem diferentes mediadores, alterando fatores de proteção gástrica, como a produção de muco e a circulação sanguínea, geração de radicais livres, aumento da peroxidação lipídica, diminuição da proliferação celular e resposta inflamatória aumentada, e aumenta a liberação de histamina (CHOI *et al.*, 2009; AMARAL *et al.*, 2013).

De acordo com a literatura, o etanol afeta a barreira de muco protetora da mucosa gástrica, abolindo a hidrofobicidade e o efeito tampão do bicarbonato, deixando as células da mucosa expostas ao ácido (MORRIS, 1981). Além disso, o etanol aumenta a permeabilidade vascular, causa estase do fluxo sanguíneo, e conseqüente hiperemia no local, o que contribui para a lesão hemorrágica (GUTH *et al.*, 1984).

Ainda, o etanol está relacionado com a diminuição dos grupos sulfidrilas, que são importantes para eliminação de EROs e manutenção das membranas celulares (MILLER *et al.*, 1985). As EROs geradas pelo etanol também causam ainda uma diminuição das enzimas antioxidantes SOD, CAT e da glutathione (BAST *et al.*, 1991; HALLIWELL *et al.*, 1995).

Além disso, sabe-se que a mucosa gástrica é innervada por neurônios sensoriais aferentes, e sua ativação afeta as arteríolas submucosas, que regulam o fluxo sanguíneo, por meio da liberação de neuromoduladores como a substância P e o CGRP (LAINE *et al.*, 2008). Os receptores TRPV1, presentes nesses neurônios são ativados pelo etanol, o que pode ser determinante para as ações centrais e periféricas causadas pelo etanol (BLEDNOV; HARRIS, 2009).

2.3.3- Receptores transientes vanilóides 1 e receptores de neuroquinina 1 no estresse oxidativo da lesão gástrica induzida por etanol

Os Receptores de Potencial Transitório (TRP) fazem parte da família de canais iônicos, e podem ser ativados por diversos mecanismos, variando na seletividade aos cátions (SCHAEFER, 2005). Esses canais iônicos são formados por 6 domínios transmembranares, que tem a permeabilidade para cátions, principalmente cálcio, onde a abertura destes TRP provoca o influxo dos íons. Os íons Ca^{++} possuem uma importante função em muitos processos celulares, como a contração muscular, liberação de transmissores, proliferação celular, transcrição genética e morte celular (BERRIDGE *et al.*, 2000; LATORRE *et al.*, 2009).

O TRPV1 é um transdutor polimodal da família TRP, que tem alta permeabilidade a íons de cálcio. Ele pode ser ativado pela capsaicina, lipídios, endocanabinóides e calor nocivo, que provocam a liberação de substância P (SP), neuroquinina A e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CRGP) (CATERINA *et al.*, 1997; ZYGMUNT *et al.*, 1999). O TRPV1 parece participar também na fisiopatologia de doenças ulcerosas do trato gastrointestinal, como o refluxo gastroesofágico, a colite ulcerativa e úlcera gástrica (GUARINO *et al.*, 2010; HOLZER, 2008; GAZZIERI *et al.*, 2007).

Estudos comprovaram que o etanol é capaz de ativar os receptores TRPV1, provavelmente presentes nos neurônios aferentes da mucosa gástrica, e que a ativação deste receptor leva a liberação de taquicininas, como a Substância P, através do influxo de cálcio, e essas substâncias levam ao extravasamento plasmático e infiltração de granulócitos, sendo os principais causadores da inflamação neurogênica e nocicepção causada pelo etanol (TREVISANI *et al.*, 2002; GAZZIERI *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2008). Além disto, MINOWA e colaboradores (2005) mostram em seu estudo que o receptor TRPV1 quando ativado estimula a secreção ácida gástrica em ratos.

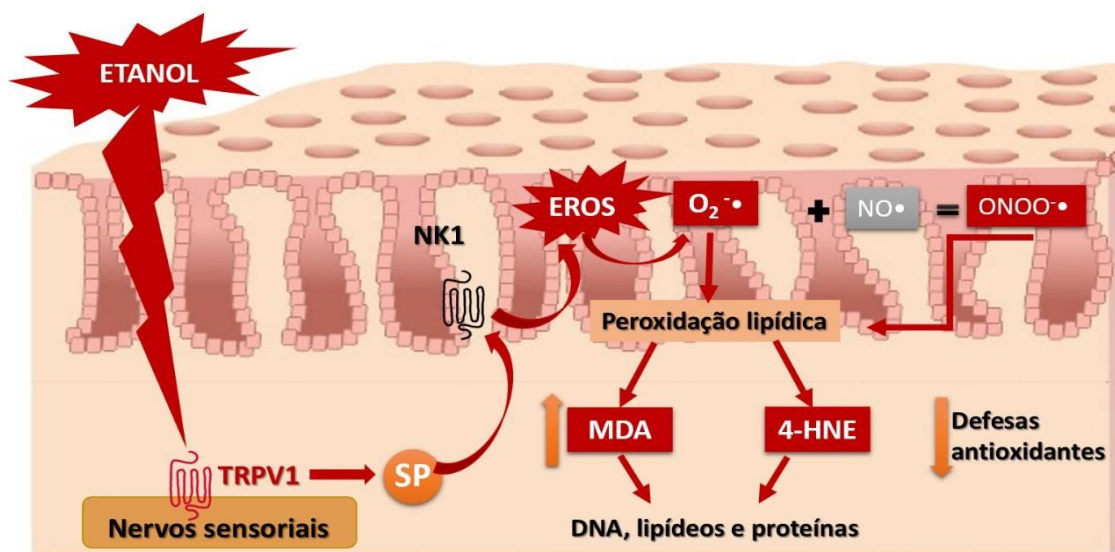
A administração da substância P, um neuropeptídeo da família das taquicininas, exacerba a lesão causada pelo etanol, e antagonistas do receptor acoplado a proteína G deste neuropeptídeo, o receptor de neuroquinina 1 (NK1), reduzem as lesões causadas por etanol (KARMELI *et al.*, 1991). Este receptor é encontrado no sistema nervoso entérico, plexo mioentérico, músculo liso e

fibroblastos do trato gastrointestinal, onde medeia as ações da SP (STERNINI *et al.*, 1995; SMITH *et al.*, 2000). Além disso, esse receptor é expresso nas células epiteliais gástricas, próximo às fibras nervosas sensoriais de onde são liberadas as taquicininas que irão ativá-lo e promover geração de EROs no epitélio gástrico (VIGNA *et al.*, 1989; GAZZIERI *et al.*, 2007). A substância P atua diretamente na vasculatura gástrica, diminuindo o fluxo sanguíneo da mucosa e liberando leucotrienos, como o Leucotrieno C4 por meio da degranulação de mastócitos da mucosa, e assim os danos gástricos são exacerbados (HAYASHI *et al.*, 1996; YOKOTANI; FUJIWARA, 1985).

O trabalho de GAZZIERI e colaboradores (2007), mostra que a ativação do receptor TRPV1 pelo etanol nas terminações nervosas da mucosa, provocam a liberação da substância P, e que a geração das lesões hemorrágicas acontece por um mecanismo dependente do receptor TRPV1. Sabe-se que a geração de radicais livres está relacionada com a ativação do receptor de NK1 pela substância P em lesões inflamatórias de outros órgãos (SPRINGER; FISCHER, 2003), e sabendo-se que a geração de espécies reativas de oxigênio está intimamente ligada às lesões hemorrágicas gástricas do etanol, GAZZIERI e colaboradores (2007) sugerem que o etanol aumenta a geração de EROs por mecanismo dependente do TRPV1, liberação de SP e ativação do receptor de NK1 nas células epiteliais gástricas, já que antagonistas destes receptores aboliram a formação de EROs.

Dessa forma, substâncias que atuam inibindo a ativação destes receptores tem um grande potencial na prevenção e tratamento de lesões gástricas geradas pelo etanol. A **figura 6** abaixo ilustra os principais mecanismos envolvidos na lesão gástrica causada pelo etanol, desde a ativação do receptor TRPV1, até as alterações encontradas na mucosa.

Figura 6- Representação dos mecanismos do etanol na lesão gástrica.



O etanol ativa e estimula o receptor TRPV1 presente nos neurônios sensoriais a liberar substância P, que ativa os receptores NK₁R ou NK1 nas células epiteliais. A ativação deste receptor leva a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que provocam danos celulares. Os radicais de oxigênio reagem com o óxido nítrico (NO) e formam o peroxinitrito (ONOO⁻), que levam a peroxidação lipídica, formação de MDA e 4-HNE que reagem com componentes celulares. Concomitante a isto, há uma diminuição das defesas antioxidantes. Autoria própria, 2017.

2.3.4- Estresse oxidativo na lesão gástrica induzida por etanol

Estes danos na mucosa gástrica são causados por efeito tóxico direto do etanol e seus metabólitos, e ou devido a geração de EROs como o superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais de óxido nítrico, que danificam biomoléculas importantes, como ácido nucléico, lipídios, proteínas, ácidos graxos poli-insaturados e DNA (CERUTTI, 1991; RUBBO *et al.*, 1994; GIESEG; DUGGAN; GEBICKI, 2000; TAMBOLI; MORE, 2016). Além disso, simultaneamente a produção destes radicais, há a diminuição da atividade antioxidante, contribuindo ainda mais para a lesão tecidual.

Estes radicais causam peroxidação dos componentes lipídicos da membrana celular, e formação de radicais de ácido graxo, que se prende à carga de molécula de oxigênio na geração do radical peroxil, que tem a capacidade de separar átomos de hidrogênio para gerar peróxidos lipídicos (RUBBO *et al.*,

1994; FARMER; MUELLER, 2013; KWIECIEN *et al.*, 2002; KWIECIEN *et al.*, 2014). Devido a alta reatividade dos radicais peróxil com moléculas de lipídios, e a instabilidade química dos peróxidos lipídicos, rapidamente estes radicais reagem com a maioria dos lipídios na membrana celular (GIESEG; DUGGAN; GEBICKI, 2000; KWIECIEN *et al.*, 2014). Os peróxidos lipídicos são metabolizados, via caminho de oxidação β para malondialdeído e 4-hidroxinonenal, que reagem com grupos de proteínas celulares de tiol e amina, resultando em distúrbios metabólicos das células (GUTTERIDGE; QUINLAN, 1983; ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1991; KWIECIEN *et al.*, 2010; AWASTHI *et al.*, 2003).

O aumento destes radicais livres, juntamente com a inibição das enzimas antioxidantes como a CAT e SOD, e depleção da glutathiona, provoca danos e morte celular, sendo um dos principais mecanismos agressivos do etanol (MUTOH *et al.*, 1990; KONO; FRIDOVICH, 1982; TERANO *et al.*, 1989; BOLIGON *et al.*, 2014).

Como visto na **figura 6** acima, o etanol medeia seus efeitos lesivos na mucosa gástrica principalmente através da geração de radicais livres, e substâncias que eliminam espécies reativas de oxigênio como N-acetilcisteína, ácido lipóico e ácido ascórbico, diminuem drasticamente os danos na mucosa gástrica causados por este agente (GAZZIERI *et al.*, 2007).

GAZZIERI *et al.*, 2007 ainda mostram em seu trabalho que apesar do pequeno aumento de neutrófilos causados pela administração de etanol ou substância P, estes não são os responsáveis pelo aumento de EROs nesse tipo de lesão. Além disso, etanol estimulou a formação de radicais livres na parte superficial da mucosa gástrica, onde não havia infiltração neutrofílica.

2.4. ABORDAGEM TERAPÊUTICA DAS ÚLCERAS GÁSTRICAS

Uma das principais abordagens terapêuticas para o tratamento das úlceras pépticas é o controle farmacológico da secreção do ácido gástrico, através de antagonistas dos receptores da histamina tipo 2 (H₂) (Cimetidina, ranitidina, nizatidina e famotidina) (DYCK *et al.*, 1978; LANCASTER-SMITH; JADERBERG; JACKSON, 1991; LEVINE; CLOUD; ENAS, 1993; WALT *et al.*, 1992), que com o tempo foram substituídas por uma classe que inibe a secreção

de forma mais potente, como inibidores da bomba de prótons H⁺/K⁺ ATPase das células parietais (Omeprazol, lansoprazol, pantoprazol e esomeprazol) (ERIKSSON *et al.*, 1995; ARAKAWA *et al.*, 2012; YEOMANS *et al.*, 1998; NG *et al.*, 2010; QIN; LOU; RYDHOLM, 2017). Porém essa última classe de fármacos, se utilizada a longo prazo pode gerar efeitos adversos como hipersensibilidade, arritmia, doenças hematopoiéticas e impotência (ABRAHAM, 2012; SHEEN; TRIADAFILOPOULOS, 2011).

Devido a esses efeitos adversos relacionados ao tratamento convencional da úlcera gástrica, é de grande importância a pesquisa de novas substâncias que atuem de forma eficaz, e por mecanismos que causem menos efeitos colaterais aos pacientes. Além disso, sabendo-se que a geração de espécies reativas de oxigênio é uma das principais vias de lesão gástrica advindas do consumo de álcool, um importante fator ocasionador de úlceras pépticas atualmente, produtos que tenham a capacidade de diminuir o estresse oxidativo, seja por mecanismos antioxidantes, ou inibindo a via de geração desses radicais livres, através do bloqueio do receptor da substância P ou do receptor TRPV1, são potenciais candidatos no tratamento e prevenção desse tipo de lesão hemorrágica.

Atualmente, probióticos vêm sendo muito estudados, devido a seus comprovados efeitos benéficos à saúde humana e animal, principalmente no trato gastrointestinal. Pesquisas apontam que estes microrganismos apresentam atividade antiulcerogênica contra diversos agentes, como o etanol (KHODER *et al.*, 2016).

2.5. PROBIÓTICOS NA SAÚDE DO TRATO GASTROINTESTINAL

Probióticos são microrganismos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro, e muitos são propostos como terapia opcional para diversas doenças do trato gastrointestinal (HILL *et al.*, 2014). De acordo com RIJKERS e colaboradores (2011), nas duas últimas décadas houve um aumento no interesse das pesquisas clínicas e experimentais com probióticos, com artigos publicados em revistas médicas e científicas de alto impacto. É importante salientar que já foi demonstrado que microrganismos mortos também conferem efeitos benéficos, e

certos mecanismos de ação, como a entrega de enzimas ao intestino, podem não necessitar destas células vivas (SANDERS, 2008; HARZALLAH; BELHADJ, 2013).

Vários estudos demonstram que bactérias medeiam seus efeitos por meio de diferentes mecanismos, como a modulação da microbiota intestinal, sintetizando e potenciando a biodisponibilidade de nutrientes, podendo ser aplicados principalmente no tratamento e prevenção de infecções e doenças do TGI (WANG *et al.*, 2015; DOLPADY *et al.*, 2016; URDACI *et al.*, 2016; HAILESELASSIE *et al.*, 2016; NAGPAL *et al.*, 2016).

Um grupo de microrganismos dominantes no TGI, especialmente no intestino delgado são os do gênero *Lactobacillus*, que compreende um grupo de bactérias gram-positivas, anaeróbias facultativas, com morfologia bacilar, e que produzem ácido láctico como produto final do metabolismo da lactose, e de outros carboidratos (FU; MATHEWS, 1999; PATTEN; LAWS, 2015). Além disso, estas bactérias podem estabelecer relações simbióticas com o hospedeiro, estimulando o sistema imune, e tem a capacidade de produzir antimicrobianos ou peróxido de hidrogênio, que podem eliminar patógenos gástricos e intestinais (LJUNGH; WADSTRÖM, 2006; HAILESELASSIE *et al.*, 2016; COMAN *et al.*, 2014; LANGA *et al.*, 2018; DORE *et al.*, 2016). Este grupo de bactérias são as mais estudadas quanto aos efeitos na saúde humana e animal, principalmente do trato gastrointestinal, apresentando grande potencial farmacológico e imunomodulatório. Os probióticos do gênero *Lactobacillus* mais comumente utilizados são o *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus reuteri*, podendo estar contidos como aditivos concentrados em comidas ou bebidas, inoculado dentro destes, ou como concentrado de células dessecadas em suplementos alimentares (ISOLAURI, 2001).

O estômago humano é um órgão do TGI pouco colonizado por microrganismos, devido a sua alta acidez, porém, estudos mostram que algumas espécies bacterianas ingeridas tem a capacidade de residir no estômago, especialmente as do gênero *Lactobacillus* (BIK *et al.*, 2006; ROOS *et al.*, 2005), e dessa forma, podem exercer efeitos benéficos na mucosa gástrica. Muitos estudos indicam que probióticos podem ser utilizados no tratamento de úlceras pépticas, e erradicação do *H. pylori* (UCHIDA; KURAKAZU, 2004; LAM *et al.*, 2007; LAZO *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2009; SENOL *et al.*, 2011a; SENOL *et al.*,

2011b; SUO *et al.*, 2016; DORE *et al.*, 2016; KHODER *et al.*, 2016). Por exemplo, estudos pré-clínicos com estes microrganismos demonstram que: A administração de 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) de *Lactobacillus rhamnosus* GG protege a mucosa gástrica dos danos induzidos por etanol (LAM *et al.*, 2007); A suplementação com *Lactobacillus fermentum* atenua a lesão induzida por HCl/Etanol (SUO *et al.*, 2016); O *Lactobacillus acidophilus* apresenta atividade gastroprotetora na lesão gástrica induzida por indometacina (LAZO *et al.*, 2007); Uma mistura diversas cepas probióticas na lesão induzida por aspirina (SENOL *et al.*, 2011a) e por etanol (SENOL *et al.*, 2011b).

Além disso, foi evidenciada a proteção gástrica de bactérias ácido-lácticas e seus produtos fermentados, como o iogurte contendo *Lactobacillus gasseri* OLL2716, que protege o estômago da injúria por Hcl (UCHIDA; KURAKAZU, 2004), e o leite de soja fermentado contendo 10^9 UFC de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum*. (LIU *et al.*, 2009). A maioria destes estudos mostram que o uso destes probióticos diminui os níveis de substância P e peroxidação lipídica causada por agentes agressores ao estômago, como o etanol, e aumentam os níveis de enzimas antioxidantes, como o GSH, CAT e SOD, quando comparados com o grupo lesado (LAM *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2009; SENOL *et al.*, 2011b; SUO *et al.*, 2016).

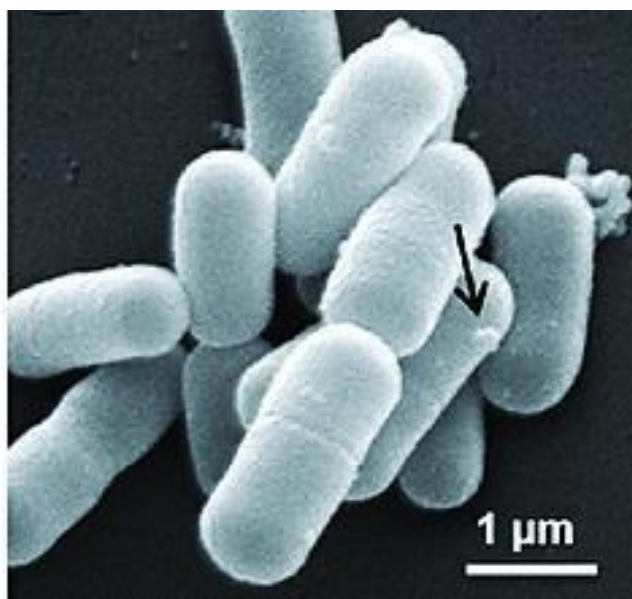
Apesar de seu grande potencial na prevenção de danos gástricos causados por etanol, ainda existem poucos estudos com estes microrganismos na proteção gástrica. Visto que estes possuem baixos efeitos tóxicos, grande segurança e efeitos benéficos comprovados ao TGI, eles são potenciais candidatos na proteção do estômago contra úlceras

2.6. *Lactobacillus reuteri* DSM 17 938

O *Lactobacillus reuteri* é uma bactéria gram-positiva, heterofermentativa, e apresenta formato bacilar, como mostrado na **Figura 7**, sendo encontrada no TGI de humanos, bem como no leite de mama e no trato urogenital de humanos (THOMAS *et al.*, 2016). Este apresenta resistência a enzimas proteolíticas e viáveis em uma ampla faixa de pH, com capacidade de produzir compostos hidrossolúveis como a reuterina e reutereciclina, que apresentam atividade antimicrobiana de amplo espectro, além de produzir compostos orgânicos que

regulam as respostas imunológicas do hospedeiro (TALARICO *et al.*, 1988; GÄNZLE *et al.*, 2000; THOMAS *et al.*, 2016), e muitas de suas cepas são consideradas probióticas, sendo amplamente utilizadas clinicamente. É importante destacar que cepas probióticas exercem seus efeitos no hospedeiro através de uma variedade de mecanismos que são únicos para cada estirpe de cada espécie (PENNER *et al.*, 2005).

Figura 7- Células de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.



Microscopia eletrônica de varredura evidenciando o formato bacilar das células de *L. reuteri* DSM 17938. GRANDE *et al.*, 2017.

Para sua colonização e ação no TGI, os lactobacilos utilizam proteínas de ligação ao muco como mecanismo de aderência no hospedeiro, e as cepas de *L. reuteri* apresentam em seu genoma os genes destas proteínas, importantes para sua fixação na mucosa, porém que apresentam heterogeneidade entre as estirpes (MACKENZIE *et al.*, 2010). Quanto aos mecanismos pelos quais esta espécie produz atividade biológica, estudos mostram que ambas as estirpes desta bactéria produzem reuterina, através da desidrogenação do glicerol, que é capaz de induzir o estresse oxidativo em muitos patógenos do trato gastrointestinal (TALARICO *et al.*, 1988)

Este lactobacilo que tem sido usado por muitos anos com segurança como suplementação probiótica, e muitos efeitos benéficos do TGI têm sido atribuídos

ao *L. reuteri*, através de estudos pré-clínicos e clínicos, como a redução das cólicas infantis (SAVINO *et al.*, 2007), efeitos benéficos na constipação e na diarreia (OUWEHAND *et al.*, 2002), proteção contra gastroenterites (SHORNIKOVA *et al.*, 1997), e imunomodulação do trato gastrointestinal (VALEUR *et al.*, 2004). Além disso, sua suplementação é bem tolerada por crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas, sendo considerado um organismo probiótico ideal (ANG *et al.*, 2016).

A estirpe de *L. reuteri* DSM 17938 é derivada da cepa *L. reuteri* ATCC 55730, estirpe com atividades promotoras da saúde bem documentadas, comercialmente disponível, porém que apresenta grande resistência a antibióticos, como a resistência a Beta-lactamases, com risco de transferência desta resistência a outras bactérias patogênicas (ROSANDER *et al.*, 2008; EGERVÄRN *et al.*, 2007). A partir da remoção de plasmídeos contendo genes de resistência a antibióticos, Rosander e colaboradores (2008) observaram em seus estudos que o DSM 17938, possui o mesmo padrão de fermentação, produção de reuterina, morfologia, taxa de crescimento, tolerância a ácido, aderência ao muco que a cepa mãe, ATCC 55730.

O *L. reuteri* DSM 17938, é comercialmente disponibilizado como *L. reuteri* Protectis, com já demonstrada eficácia na terapêutica de muitas doenças, como no tratamento e prevenção da diarreia em crianças (WANKE; SZAJEWSKA, 2012; KOŁODZIEJ; SZAJEWSKA, 2017), na diminuição da cólica infantil (CHAU *et al.*, 2015; SAVINO *et al.*, 2010), na redução da constipação crônica (COCCORULLO *et al.*, 2010), na prevenção da enterocolite necrozante (HUNTER *et al.*, 2012), e no tratamento de gastroenterites (SZAJEWSKA *et al.*, 2014). Além disso, o uso de 10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 por 8 semanas apresentou alta taxa de erradicação de *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica, principal fator de risco para desenvolvimento de gastrite crônica (DORE *et al.*, 2016). Uma outra atividade benéfica gástrica que o probiótico apresenta é a diminuição da frequência de regurgitação e aumento do esvaziamento gástrico, em crianças com regurgitação funcional (INDRIO *et al.*, 2017).

Os efeitos de DSM 17938 no trato gastrointestinal, além da produção de antimicrobianos como a reuterina, são ocasionados principalmente devido a estimulação do sistema imune, como mostrado em estudos experimentais,

através da modulação das respostas de células dendríticas (HAILESELASSIE *et al.*, 2016). No modelo de enterocolite necrosante experimental, esta estirpe de *L. reuteri* reduziu significativamente a inflamação intestinal, inibindo a expressão do receptor TLR4 e NF-KB, além de modular as células T efetoras e T reguladoras, mostrando que pelo menos em parte o sistema imune mucoso desempenha um importante papel nos efeitos benéficos provocados pelo probiótico (LIU *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014).

Recentemente, Perez-Burgos e colaboradores (2015), relataram em seu trabalho que a bactéria em questão, DSM 17938, inibe a expressão do receptor TRPV1, mecanismo envolvido em sua atividade antinociceptiva em roedores tratados com 1×10^9 UFC por 9 nove dias. A literatura também relata que o *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus fermentum* inibem a expressão de TRPV1 em seu efeito terapêutico intestinal (ZHAO *et al.*, 2015; SUO, *et al.*, 2014).

Desta forma, vê-se que o *L. reuteri* DSM 17938 apresenta grande potencial terapêutico devido a suas características adaptativas ao trato gastrointestinal e segurança clínica, sua modulação do sistema imune, e antagonismo dos efeitos deletérios causados pela ativação do receptor TRPV1, sendo potencial candidato para o estudo de gastropatias, como a lesão gástrica induzida por etanol.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do *Lactobacillus reuteri* DSM 17 938 na lesão gástrica induzida por etanol, e estudar se os possíveis mecanismos gastroprotetores estão relacionados com a inibição da ativação do receptor TRPV1 e/ou NK1, com consequente diminuição do estresse oxidativo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar a atividade gastroprotetora de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, no modelo de lesão gástrica aguda induzida por etanol em camundongos;
- ✓ Investigar a possível inibição da ativação do receptor TRPV1 por *Lactobacillus reuteri*, no modelo de lesão gástrica aguda induzida por etanol em camundongos;
- ✓ Investigar a possível inibição da ativação do receptor NK1 por *Lactobacillus reuteri*, no modelo de lesão gástrica aguda induzida pela coadministração de Substância P e etanol em camundongos;
- ✓ Determinar os níveis de substância P na mucosa após o tratamento com *Lactobacillus reuteri* DSM 17 938, na lesão gástrica induzida por etanol;
- ✓ Verificar um possível efeito protetor da suplementação por *Lactobacillus reuteri* DSM 17 938 na mucosa gástrica, através da dosagem de marcadores do estresse oxidativo, como a concentração de Malondialdeído (MDA), e de enzimas antioxidantes, como a glutathiona reduzida (GSH), e Superóxido dismutase (SOD) e metabólitos do óxido nítrico (nitrito/nitrato);
- ✓ Avaliar a influência da suplementação com *Lactobacillus reuteri* na secreção de muco e ácido gástrico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DROGAS E REAGENTES

No presente estudo foi utilizado como teste o *Lactobacillus reuteri* DSM 17 938 (COLIKIDS) da BioGaia®. O agonista do receptor TRPV1 (Resiniferatoxina- RTX), acetato de substância P hidratado, Capsaicina, o antagonista do receptor NK1 (WIN 62,577) e o etanol, foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os outros compostos químicos utilizados foram de grau analítico, e comprados de fornecedores comerciais padrão. 1 miligrama de RTX foi dissolvido em 1 mL de etanol 95% e armazenado a -20° C. Quando necessário, essa solução foi diluída em salina (0,9%), para obter a concentração requerida. WIN 62,577 foi dissolvida em DMSO, e os outros compostos em salina, quando necessário.

4.2 ANIMAIS

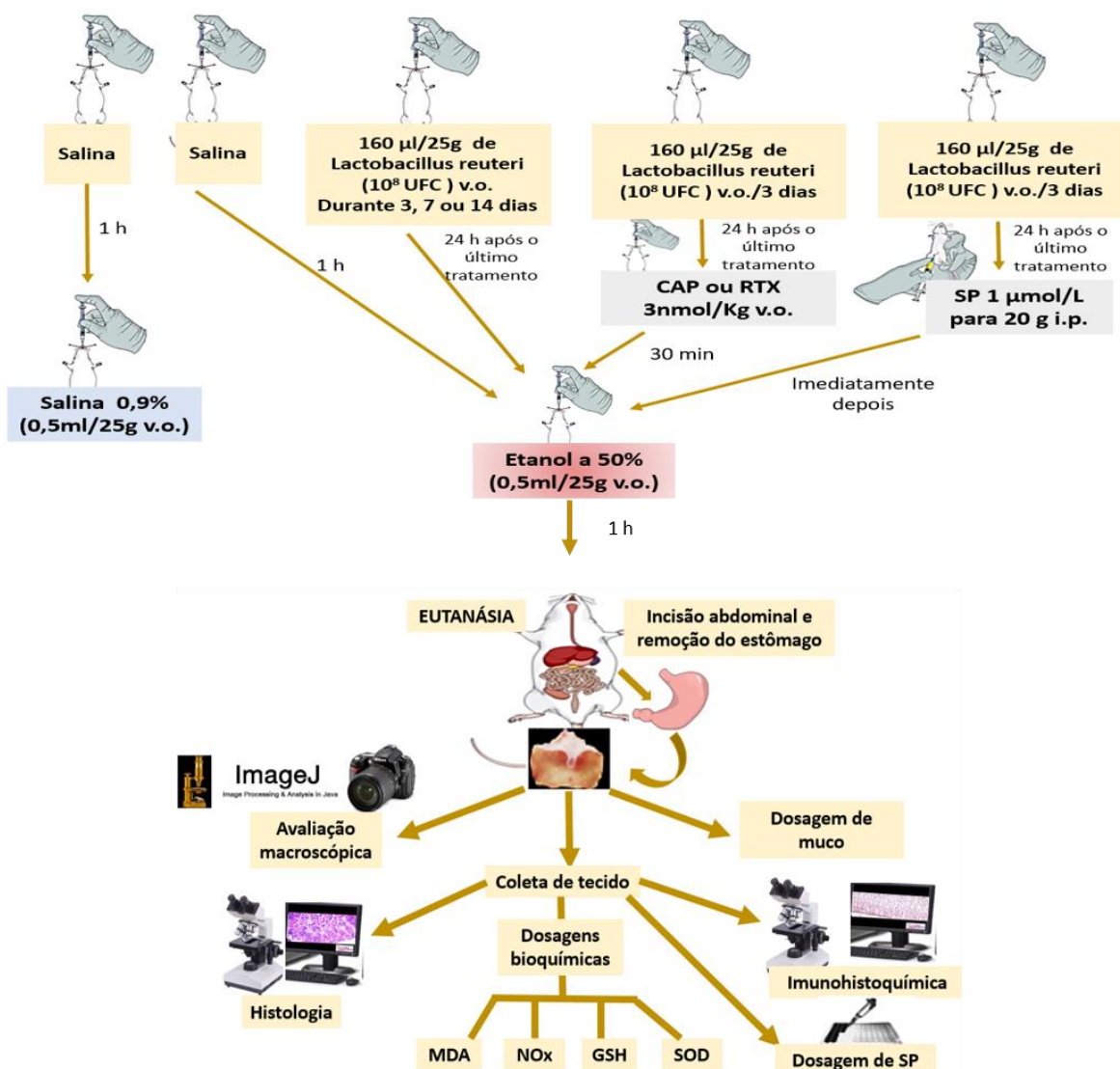
Foram utilizados neste estudo camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem swiss (fêmeas e machos), com peso entre 20-25 gramas em todos os experimentos. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em ambiente com fotoperíodo de 12 horas, temperatura de aproximadamente 22 °C, com água e ração comercial ofertadas *ad libitum*. Além disso, os animais foram privados de alimentação 18 a 20 horas antes da realização dos experimentos, por recomendação dos protocolos experimentais utilizados.

Os procedimentos foram executados como especificado pelo Guia de Cuidado e Uso com Animais de Laboratório (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI (CEEAA-UFPI), sob o número de protocolo 292/17, e os experimentos foram conduzidos em concordância com este.

4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Abaixo está ilustrado o delineamento experimental realizado no presente trabalho (**Figura 8**), ilustrando as administrações realizadas nos animais, bem como as metodologias realizadas. No plano experimental serão utilizados como controles animais que serão pré-tratados apenas com solução salina 0,9% por via oral sem indução de lesão gástrica, e com indução de lesão com etanol a 50%. Esses grupos serão analisados comparativamente com os grupos testados.

Figura 8. Representação esquemática do delineamento experimental realizado no presente trabalho



A imagem acima esquematiza os tratamentos que foram administrados nos camundongos, e testes que foram realizados para as avaliações deste trabalho.

4.4. ATIVIDADE DA SUPLEMENTAÇÃO POR *LACTOBACILLUS REUTERI* DSM 17 938 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL

Para a investigação de um possível efeito protetor do *L. reuteri* na mucosa gástrica, foi utilizado o protocolo de lesão gástrica induzida por etanol de Robert e colaboradores (1979), com modificações. Inicialmente, os camundongos (n=5-7) foram pré-tratados, através da suplementação com 10⁸ UFC por grama de peso por dia de *Lactobacillus reuteri* DSM 17 938 liofilizadas (correspondendo a 160 µl do probiótico comercial) por via oral (v.o.) durante 3, 7 ou 14 dias. Neste mesmo período de tempo, outros animais foram tratados com solução salina por v.o., sendo utilizados como grupo controle saudável (n=5-7) e controle lesado (n=5-7).

4.4.1. Indução da lesão gástrica por etanol e análise macroscópica das lesões

Os animais pré-tratados com *L. reuteri*, foram submetidos a administração com etanol a 50% ou salina na dose de 0,5 ml/25 g do peso corporal via oral, no quarto, oitavo e décimo quinto dia, 24 horas após o último dia da suplementação com o *L. reuteri* ou salina. Eles foram eutanasiados uma hora após a indução da lesão por etanol.

Foi realizada uma incisão abdominal para a remoção do estômago, que foi cuidadosamente lavado e aberto ao longo da curvatura maior, estirado em um suporte para ser fotografado com câmera digital (Canon Professional Eos Rebel EF-S 18-135, 18MP) para a análise macroscópica (MEDEIROS, 2009). A área das lesões hemorrágicas foi analisada por meio do software *Image J* versão 2.1. Também foram retiradas amostras do corpo do estômago para análises histológicas e dosagens bioquímicas de todos os grupos.

Os demais testes foram realizados com 3 dias de pré-tratamento com *L. reuteri*, visto que este menor tempo de suplementação mostrou atividade gastroprotetora significativa na lesão gástrica induzida por etanol.

4.5. AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPV1 NO EFEITO GASTROPROTECTOR DE *L. reuteri* DSM 17 938 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL

Sabendo-se que o *L. reuteri* DSM 17 938 tem a capacidade de modular o receptor TRPV1, inibindo sua ativação, e promovendo assim sua atividade antinociceptiva visceral, este trabalho também objetivou-se avaliar uma possível modulação deste receptor sensorial na mucosa gástrica lesionada por etanol, visto que este agente lesivo atua ativando o TRPV1.

Para tal fim, foi investigado o envolvimento deste receptor através da sua ativação com seus agonistas seletivos, a capsaicina e a resiniferatoxina (RTX), ambos na dose de 3 nmol/kg, conforme TRAMONTANA e colaboradores (1994), com modificações. Os animais foram suplementados com *Lactobacillus reuteri*, e 24 horas após o último dia do tratamento, estes foram tratados com 3 nmol/kg de capsaicina juntamente com etanol a 50%, ou RTX via intragástrica, e 30 minutos depois seguido da administração de etanol a 50%. Após uma hora os animais foram eutanasiados conforme já descrito no item 4.4.1.

4.6. AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR NK1 NO EFEITO GASTROPROTECTOR DE *L. reuteri* DSM 17 938 NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL

Com o intuito de avaliar se o efeito protetor da suplementação com *L. reuteri* DSM 17 938 é devida a uma possível inibição da ativação de NK1, receptor necessário para os efeitos deletérios da substância P na mucosa gástrica, avaliou-se o efeito da lesão gástrica induzida pela administração de SP e etanol.

Inicialmente, os animais foram suplementados com *Lactobacillus reuteri* como descrito nas seções anteriores, ou com o antagonista da substância P, WIN-62577 (20 mg/kg *i.p.*). Os camundongos foram então tratados com Substância P na dose 1 μ mol/L para 20 g, via *i.p.*, imediatamente seguida da administração intragástrica de etanol a 50%, conforme KARMELI *et al.* (1991), com modificações. Após uma hora, os animais foram eutanasiados como já descrito no item 4.4.1. A coadministração de substância P e etanol aumenta o índice de lesão gástrica causada por etanol, e substâncias que antagonizam o receptor NK1 minimizam estes efeitos lesivos.

4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Fragmentos do estômago dos animais foram colhidos e fixados em formol a 10 % por 24 horas, para análise histológica. O material biológico foi desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico, processado e embocado em parafina. Posteriormente foram obtidos cortes que foram transferidos para lâminas, e corados com hematoxilina-eosina, e armazenados para posterior análise no microscópio óptico.

Para a análise histopatológica dos estômagos, de acordo com Laine e Weinstein (1988), foram avaliadas os escores de: perda de células epiteliais (0-3), edema na superfície da mucosa (0-4), hemorragia (0-4) e infiltração de células inflamatórias (0-3), sendo 14 o escore histopatológico máximo.

4.8 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA O RECEPTOR TRPV1

Para confirmar a modulação da expressão do TRPV1 na mucosa gástrica de camundongos tratados com *L. reuteri*, foi realizada a técnica de imunohistoquímica. Amostras do tecido gástrico foram retiradas e fixadas em formol a 10%, e realizados os procedimentos para processamento e cortes histológicos descritos anteriormente. Os cortes foram desparafinizados, reidratados e submetidos a recuperação antigênica, e colocados solução de bloqueios de ligação inespecíficos (leite desnatado a 1% em PBS; e solução de bloqueio de peroxidase endógena: H₂O₂ 3% diluída em metanol). As amostras foram então lavadas em PBS e incubadas com anticorpos policlonais de TRPV1 de coelho diluídos 1: 1000 overnight a 4 ° C. As lâminas de tecido foram lavadas, incubadas com um anticorpo secundário biotilado (1:400) em PBS-BSA, lavadas novamente e foram incubadas com um conjugado de avidina-biotina-peroxidase e substrato de peroxidase para análise com o cromógeno 3,3' Diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB), que forneceu a lâmina a cor marrom típica da reação. As lâminas foram contrastadas com a hematoxilina de Harris. As seções de controle negativo foram processadas ao mesmo tempo como descrito, mas sem anticorpo TRPV1 (BUCKINX *et al.*, 2013).

4.8.1 Análise da imuno-histoquímica para TRPV1

As imagens para a análise foram adquiridas de uma câmera com um sistema de aquisição LAZ 3.5 (LEICA DM1000, Alemanha) acoplado a um microscópio de luz. As imagens microscópicas resultantes foram submetidas a subtração de fundo e correção de cor.

A intensidade de coloração do TRPV1 foi estimada com o software ImageJ versão 2.1, de acordo com o método qualitativo e não subjetivo descrito por Helps e colaboradores (2012). Os vetores de componentes de hematoxilina e DAB foram separados em imagens de seção, com uma ampliação final de 100 x, pelo plugin ImageJ Color deconvolution (H-DAB). Este método demonstra uma correlação linear entre o aumento da concentração de anticorpos e o peso DAB (DABwt) (HARFORD-WRIGHT *et al.*, 2014). Os resultados são expressos como DABwt%.

4.9 MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE SUBSTÂNCIA P

O conteúdo de SP no tecido gástrico foi analisado por meio de um imunoenensaio enzimático utilizando um kit comercialmente disponível pela Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, EUA). O teste do tipo ELISA competitivo foi utilizado para a pesquisa do antígeno nas amostras. A substância P foi quantificada a partir da sua habilidade em competir com a Substância P conjugada à acetilcolinesterase para um número limitado de locais de ligação de anticorpo específicos para Substância P.

Para isso, primeiramente os poços da placa foram pré-incubados com IgG anti-coelho monoclonal, onde foi adicionado 50 ul de anticorpo para substância P, 50 ul de substância P conjugada, 50 ul de homogenato da amostra ou do padrão, onde cada amostra foi diluída e testada em triplicata. Após isso, a placa é lavada para remoção dos reagentes não ligados, e então é adicionado em cada poço 200 ul do Reagente Ellman (que contém o substrato para AChE e 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzóico, e produzem ácido 5-tio-2-nitrobenzóico). O produto desta reação enzimática tem uma cor amarela, que pode ser lida a 412 nm. A intensidade desta cor, determinada espectrofotometricamente, é proporcional à quantidade de Substância P conjugada ligada ao poço, que é inversamente

proporcional à quantidade de Substância P livre presente no poço durante a incubação.

4. 10 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS A PARTIR DA MUCOSA GÁSTRICA DOS CAMUNDONGOS

Todos os grupos foram analisados quanto ao nível de estresse oxidativo, capacidade antioxidante, bem como mensuração dos níveis de metabólitos do óxido nítrico, por meio de dosagens bioquímicas a partir do tecido coletado após a eutanásia. Foram utilizados para essas análises os tecidos dos corpos dos estômagos dos animais tratados, que foram então pesados e homogeneizados para serem realizadas as dosagens.

4.10.1. Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica

Para mensurar a injúria tecidual ocorrida nos tecidos após os tratamentos, a metodologia foi feita de acordo com Mihara & Uchiyama (1978). Amostras da região glandular do estômago foram homogeneizadas a 10% em KCl a 1,15%, e alíquotas de 250 µl do homogenato foram adicionadas a tubos contendo 1,5 mL de H₃PO₄ a 1% e 500 µl de uma solução de ácido tiobarbitúrico. A mistura foi aquecida em banho-maria a 100°C, e depois do resfriamento foram adicionados 2 mL de n-butanol, e feita a centrifugação das amostras. Nesta análise, a absorbância do sobrenadante foi mensurada em 520 e 535 nm. As concentrações de MDA foram expressas como nmol/g de tecido.

4.10.2. Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica

A concentração de glutathiona reduzida nos tecidos do estômago como sulfidrilos não protéicos, foi estimada utilizando a técnica descrita por SEDLAK & LINDSAY (1968). Um fragmento glandular de cada estômago foi homogeneizado em EDTA 0,02 M (1 mL/100 mg de tecido). Em seguida, foram misturados 400 µL do homogeneizado de tecido com 320 µL de água destilada

e 80 µL de ácido tricloroacético 50% (p/v), e centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos. Foram misturados quatrocentos microlitros dos sobrenadantes resultantes com 800 µL de tampão Tris-HCl (0,4 M, pH 8,9) e 20 µL de ácido 5,5-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB; 0,01 M). Posteriormente, as amostras foram agitadas durante 3 min, e a absorbância a 412 nm foi medida num espectrofotômetro. A concentração de GSH foi expressa como µg de GSH/g de tecido úmido.

4.10.3. Determinação dos níveis da superóxido dismutase (SOD) na mucosa gástrica

A concentração da superóxido dismutase foi mensurada utilizando um ensaio espectrofotométrico modificado (DAS *et al.*, 2000). Neste método, a atividade enzimática é calculada pela quantidade de SOD capaz de inibir a formação de nitrito em 50%. Para isso, um fragmento glandular de cada estômago foi homogeneizado em 1 mL/100 mg de tampão de fosfato de tecido (50 mM, pH 7,4). 100 µL do homogeneizado foram adicionados a 1110 µL de tampão de fosfato, 75 µL de L-metionina (20 mM), 40 µL de Triton X-100 (1% v/v), 75 µL de cloreto de hidroxilamina (10 mM) e 100 µL de EDTA (50 µM). Esta solução foi incubada num banho maria a 37 ° C durante 5 minutos, depois foram adicionados 80 µL de solução de riboflavina (50 µM) e expostos à luz durante 10 minutos. A partir desta solução, foram retirados 100 µL da amostra e outros 100 µL de reagente de Griess foram adicionados em poços, e após 10 minutos, a absorbância foi lida a 550 nm por espectrofotometria em um leitor de ELISA. Além disso, a quantidade de proteínas totais foi determinada com um kit comercial da Labtest. Os resultados foram expressos como U SOD/µg de proteína.

4.10.4 Mensuração dos níveis de nitrito e nitrato (Nox)

Para mensuração de Nox, faz-se sua medida de forma indireta, através de seus metabólitos, nitrito e nitrato, utilizando o reagente de Griess, de acordo com o método descrito por GREEN e colaboradores (1982). As amostras de

tecido foram homogeneizadas em KCl 0,15 M (1 mL/100 mg de tecido), e o homogenato foi centrifugado sob refrigeração. Depois, 100 µL do sobrenadante foram misturados com 100 µL de reagente de Griess. A absorbância a 540 nm foi medida após 10 minutos de incubação. Os níveis de nitrato/nitrito foram expressos como micromoles de nitrito e nitrato (NO_x).

4.11 QUANTIFICAÇÃO DO MUCO ADERIDO À MUCOSA GÁSTRICA

O muco aderido à parede gástrica no modelo de lesão gástrica induzida por etanol foi determinado conforme CORNE e colaboradores (1974). Inicialmente os animais foram tratados e foi induzida lesão gástrica por etanol, conforme já demonstrado acima. A fim de se quantificar o muco do tecido gástrico, a região glandular do estômago foi separada, pesada e imersa em 10 mL do corante de Alcian Blue a 0,1%, que tem afinidade em corar mucina, por um período de 2 horas. Após isto, estas amostras do estômago foram submetidas a duas lavagens sucessivas em sacarose à 0,25M, com duração de 15 e 45 minutos, para ser removido o excesso do corante. Depois deste procedimento, estas porções dos estômagos foram transferidas para uma solução contendo 10 mL de MgCl₂ 0,5M, em um período de 2 horas, para extrair-se o corante complexado com o muco na parede glandular. Foi realizada uma emulsão a partir de 4ml do sobrenadante desta solução alcian blue e 4ml de éter etílico, que foi centrifugada a 3600 rpm por 10 minutos. As absorbâncias das porções do estômago coradas foram lidas no espectrofotômetro a 598 nm.

4.12 SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA

O método de ligadura de piloro foi utilizado para avaliar a secreção de ácido gástrico (SHAY *et al.*, 1945). Inicialmente, os camundongos foram suplementados com *L. reuteri* e solução salina. Após 24 horas de jejum, os animais foram anestesiados via *i.p.* com uma combinação de cloridrato de xilazina (5 mg/kg) e quetamina (60 mg/kg). Um grupo foi tratado com etanol a 50% 1 hora antes do procedimento a seguir. A solução salina foi injetada no lúmen duodenal em camundongos que receberam *L. reuteri*, solução salina ou etanol a 50%. Em outro grupo, o omeprazol (5 mg/kg) também foi injetado no

lúmen duodenal. Após 4 horas, os animais foram sacrificados, os estômagos foram abertos e o conteúdo gástrico foi coletado. A acidez total do suco gástrico foi avaliada com 0,01 N de NaOH, utilizando 2% de fenolftaleína como indicador, e o volume final e o pH foram mensurados diretamente na mucosa do estômago.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm SEM de pelo menos cinco animais por grupo, e foi realizada através do software GraphPad Prism 6, utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Newman-Keuls, quando necessário. Além disso, o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, seguido do teste de Dunn, foi utilizado em análises histopatológicas. A diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa quando $P < 0,05$

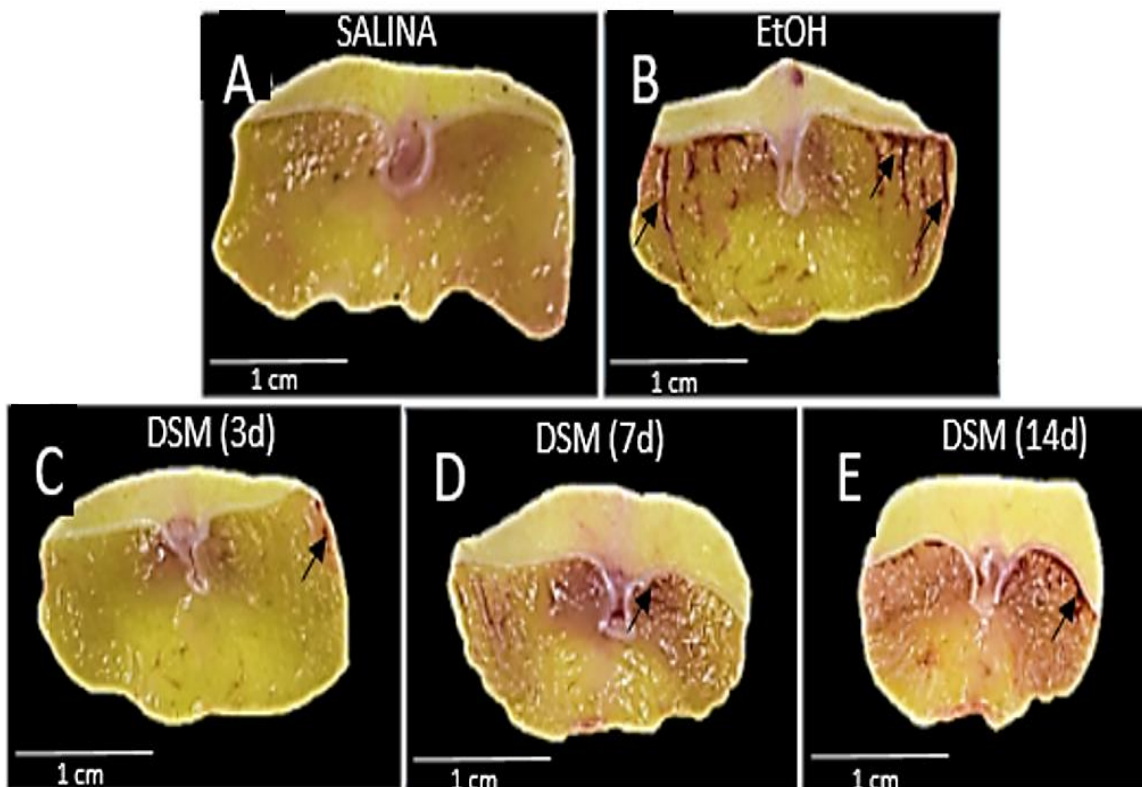
5. RESULTADOS

5.1 EFEITO DO *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 SOBRE DANOS GÁSTRICOS INDUZIDOS PELO ETANOL

A suplementação com *L. reuteri* impediu significativamente a lesão gástrica induzida pelo etanol. A **Figura 9** mostra as fotografias e a **figura 10** a análise macroscópica da mucosa gástrica. Os camundongos tratados com apenas com etanol a 50% (0,5 mL/25 g v.o), apresentaram dano gástrico altamente significativo ($19,920 \pm 1,650$ mm² de área de lesão hemorrágica; **figura 9, B; figura 10**), em comparação com os animais tratados somente com salina (controles saudáveis; figura 8, painel A).

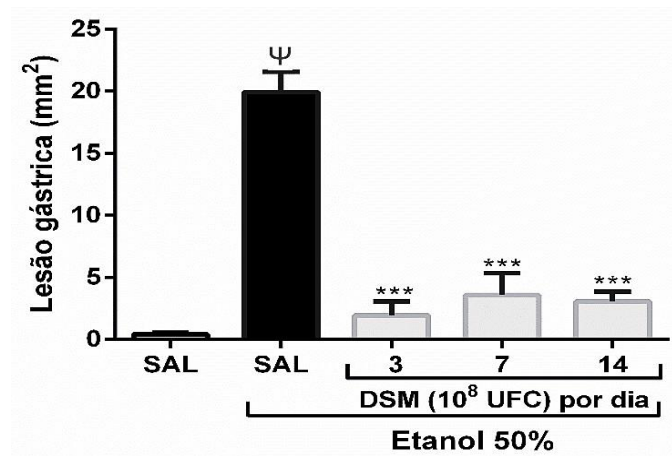
O pré-tratamento com *L. reuteri* durante 3, 7 e 14 dias causou uma proteção altamente significativa na mucosa gástrica na lesão induzida pelo etanol (**figura 9, C-E; figura 10**, respectivamente; $P < 0,0001$). Considerando que o menor tempo de pré-tratamento com *L. reuteri* reduziu significativamente a área da lesão (1.940 ± 1.121 mm²), com taxa de inibição da lesão de 90,26%, todos os outros protocolos experimentais para avaliar os possíveis mecanismos de proteção gástrica foram realizados com 3 dias de pré-tratamento com *L. reuteri*.

Figura 9: Efeitos macroscópicos da suplementação com *L. reuteri* DSM 17938 na lesão gástrica induzida por etanol



Imagens macroscópicas da lesão gástrica induzida por etanol. A: Grupo normal (salina). B: Grupo lesado (etanol- EtOH). C-E: Camundongos suplementados com 10^8 UFC/g de peso/dia de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (DSM) por 3 dias (C), 7 dias (D), e 14 dias (E), seguido da administração de etanol 50%. As setas (\rightarrow) indicam as lesões hemorrágicas na mucosa do estômago.

Figura 10: Análise macroscópica da suplementação com *L. reuteri* DSM 17938 na lesão gástrica induzida por etanol

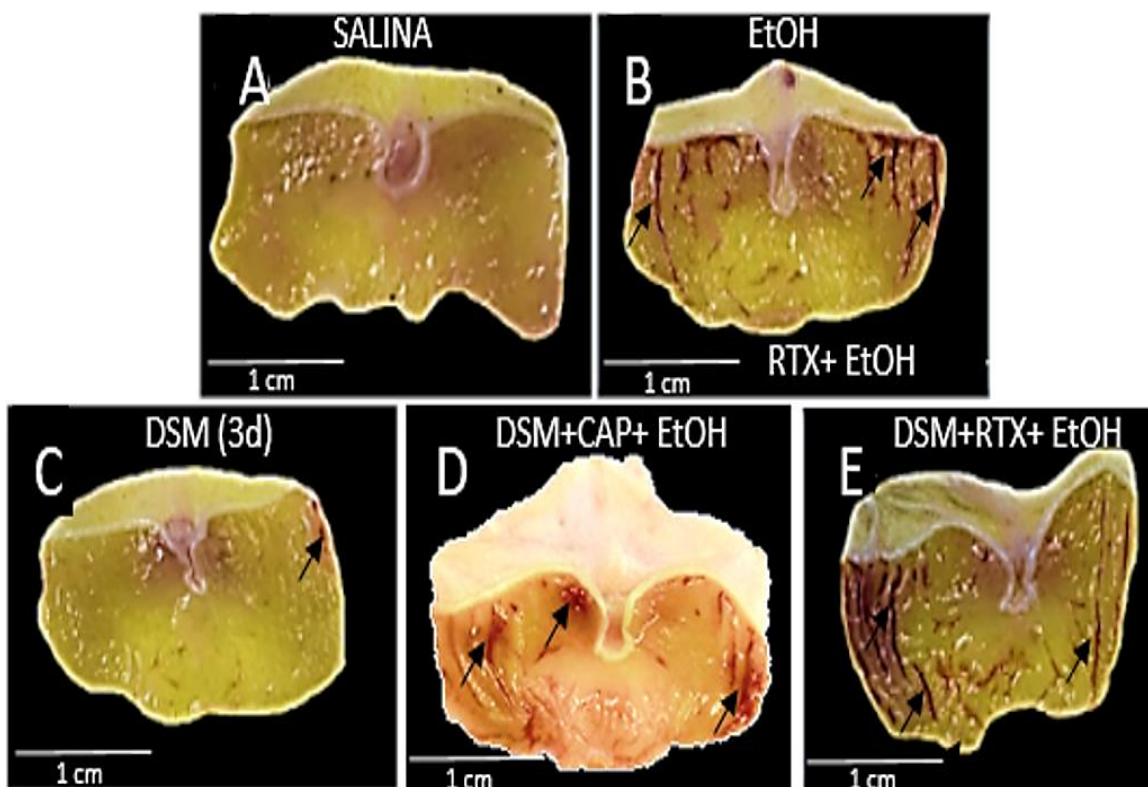


Camundongos pré-tratados com 10⁸ UFC/g de peso/dia de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (DSM) durante 3, 7 e 14 dias demonstraram significativa melhora dos danos gástricos hemorrágicos induzidos pela administração de etanol a 50%. Os resultados foram expressos como média ± S. E. M. n=5-7 camundongos por grupo. ΨP<0.0001 quando comparado com o grupo saudável; ***P<0.0001 quando comparado com o grupo etanol. Análise de variância e teste de Newman-Keuls foram utilizados para a avaliação.

5.2 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR TRPV1 NOS EFEITOS PROTETORES DO *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS PELO ETANOL

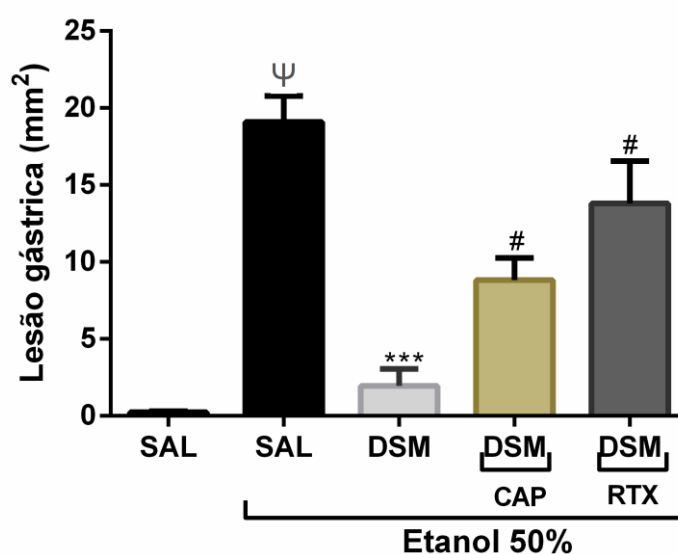
Para investigar o possível envolvimento da inibição da ativação do receptor TRPV1 na proteção mediada por *L. reuteri* contra lesões gástricas agudas induzidas pelo etanol, o efeito do tratamento com os agonistas seletivos para TRPV1, Capsaicina e RTX (3 nmol/kg v.o.) com etanol 50% em animais suplementados com *L. reuteri* foi avaliado. A **figura 11** mostra macroscopicamente o resultado dos tratamentos na mucosa do estômago dos animais. A avaliação macroscópica feita a partir destas imagens revelou que o tratamento com capsaicina juntamente com etanol ou RTX e etanol apresentaram lesões significativas ($8,827 \pm 1,425$ e $13,800 \pm 2,753$ mm² de área de lesão hemorrágica, respectivamente, **figura 12**), revertendo os efeitos protetores da suplementação com *L. reuteri*. Ainda, vê-se que o RTX foi mais potente que a capsaicina na diminuição dos efeitos benéficos do probióticos na mucosa gástrica (**figura 12**).

Figura 11: Efeitos macroscópicos da suplementação com *L. reuteri* DSM 17938 nos animais tratados com capsaicina ou resineratoxina e etanol



Imagens macroscópicas do efeito dos tratamentos na lesão gástrica induzida por etanol. A: Grupo normal (salina). B: Grupo lesado (etanol-EtOH). C: Camundongos suplementados com 10^8 UFC/g de peso/dia de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (DSM) por 3 dias e tratados com etanol. D: Camundongos suplementados com 10^8 UFC/g de peso/dia de *Lactobacillus reuteri* tratados com 3 nmol/kg v.o de Capsaicina (CAP) e etanol. E: Camundongos suplementados com 10^8 UFC/g de peso/dia de *Lactobacillus reuteri* e tratados com RTX seguido da administração de etanol 50%. As setas (\rightarrow) indicam as lesões hemorrágicas na mucosa do estômago.

Figura 12: Efeito do tratamento com capsaicina ou RTX sobre os efeitos protetores de *L. reuteri* DSM 17938 na lesão gástrica induzida por etanol

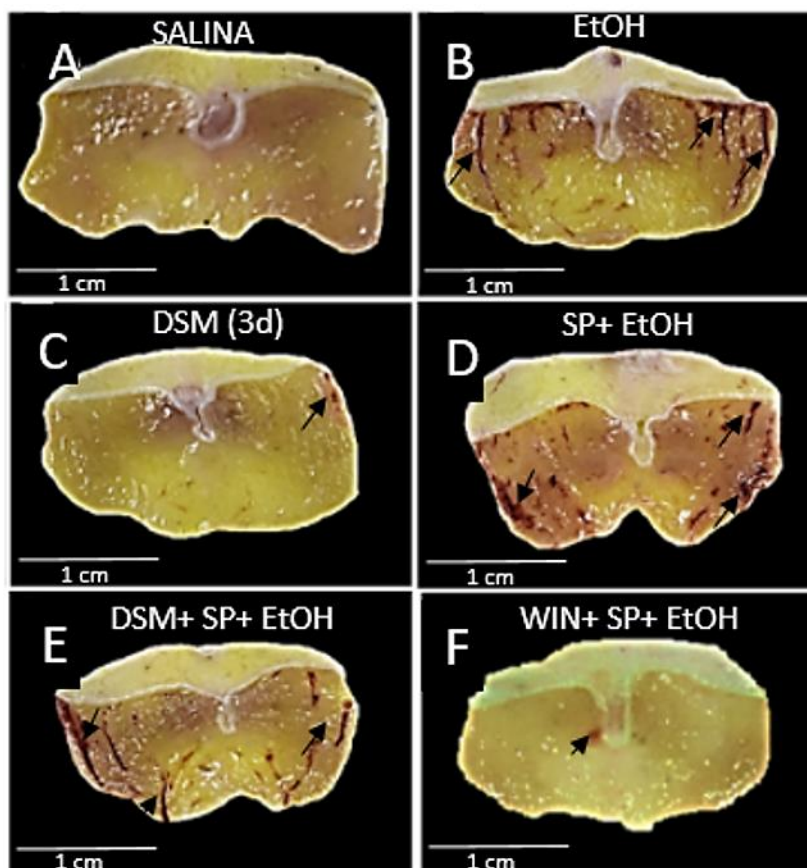


Os agonistas do receptor TRPV1 Capsaicina (CAP) e RTX revertem significativamente o efeito gastroprotetor de camundongos pré-tratados com 10^8 UFC/g de peso/dia de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (DSM). Os resultados foram expressos como média \pm S. E. M. n=5-7 camundongos por grupo. $\Psi P < 0.0001$ quando comparado com o grupo saudável; $***P < 0.0001$ quando comparado com o grupo etanol; # $P < 0,01$ e # $P < 0.0001$ quando comparado com o grupo DSM. Análise de variância e teste de Newman-Keuls foram utilizados para a avaliação.

5.3 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR NK1 NOS EFEITOS PROTETORES DO *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS PELO ETANOL

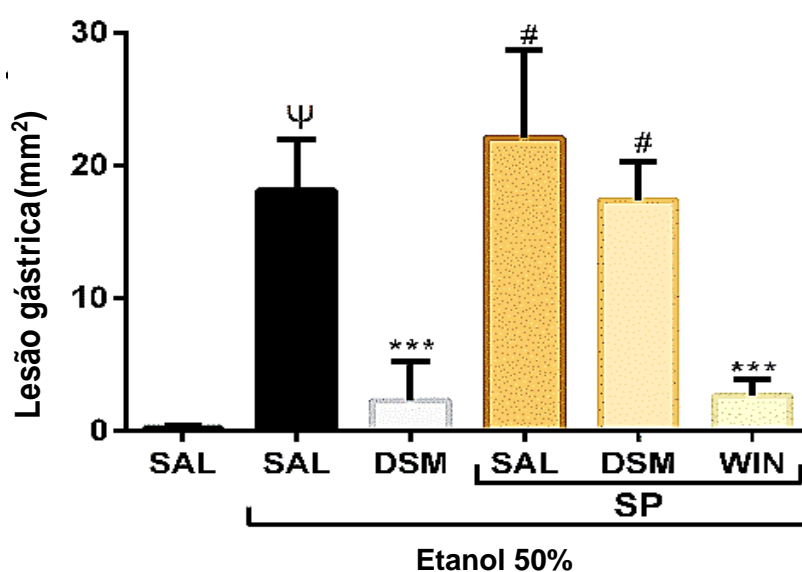
De forma a investigar o possível envolvimento da inibição da ativação do receptor NK1 na proteção da mucosa gástrica mediada por *L. reuteri*, administrou-se Substância P (1 $\mu\text{mol/L}$ para 20 g *i.p.*) imediatamente antes ao etanol 50%. Como se vê na **figura 13 (D) e figura 14**, a coadministração de SP e etanol causou grande dano hemorrágico à mucosa gástrica dos animais ($22,130 \pm 2,92 \text{ mm}^2$), e o pré-tratamento com *L. reuteri* (**13, E**) não protegeu a mucosa nestas circunstâncias ($17,420 \pm 1,28 \text{ mm}^2$). O antagonista do receptor NK1, WIN 62,577 foi capaz de reverter a área de lesão gástrica causada por SP coadministrada com etanol de forma significativa ($2,673 \pm 0,63 \text{ mm}^2$), como demonstrado nas **figuras 13 (F) e 14**.

Figura 13: Efeitos macroscópicos da suplementação com *L. reuteri* DSM 17938 nos animais tratados com Substância P e etanol



Imagens macroscópicas do efeito dos tratamentos na lesão gástrica induzida por etanol. A: Grupo normal (salina). B: Grupo lesado (etanol-EtOH). C: Camundongos suplementados com 10^8 UFC/g de peso/dia de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (DSM) por 3 dias e tratados com etanol. D: Camundongos tratados com SP na dose $1 \mu\text{mol/L}$ para 20 g i.p. antes da administração de etanol 50%. E: Camundongos suplementados com 10^8 UFC/g de peso/dia de *Lactobacillus reuteri* e tratados com SP seguido da administração de etanol 50%. F: Camundongos pré-tratados com WIN 62,577 e tratados com SP seguido da administração de etanol 50%. As setas (\rightarrow) indicam as lesões hemorrágicas na mucosa do estômago.

Figura 14: Efeito do tratamento com SP sobre os efeitos protetores de *L. reuteri* DSM 17938 na lesão gástrica induzida por etanol



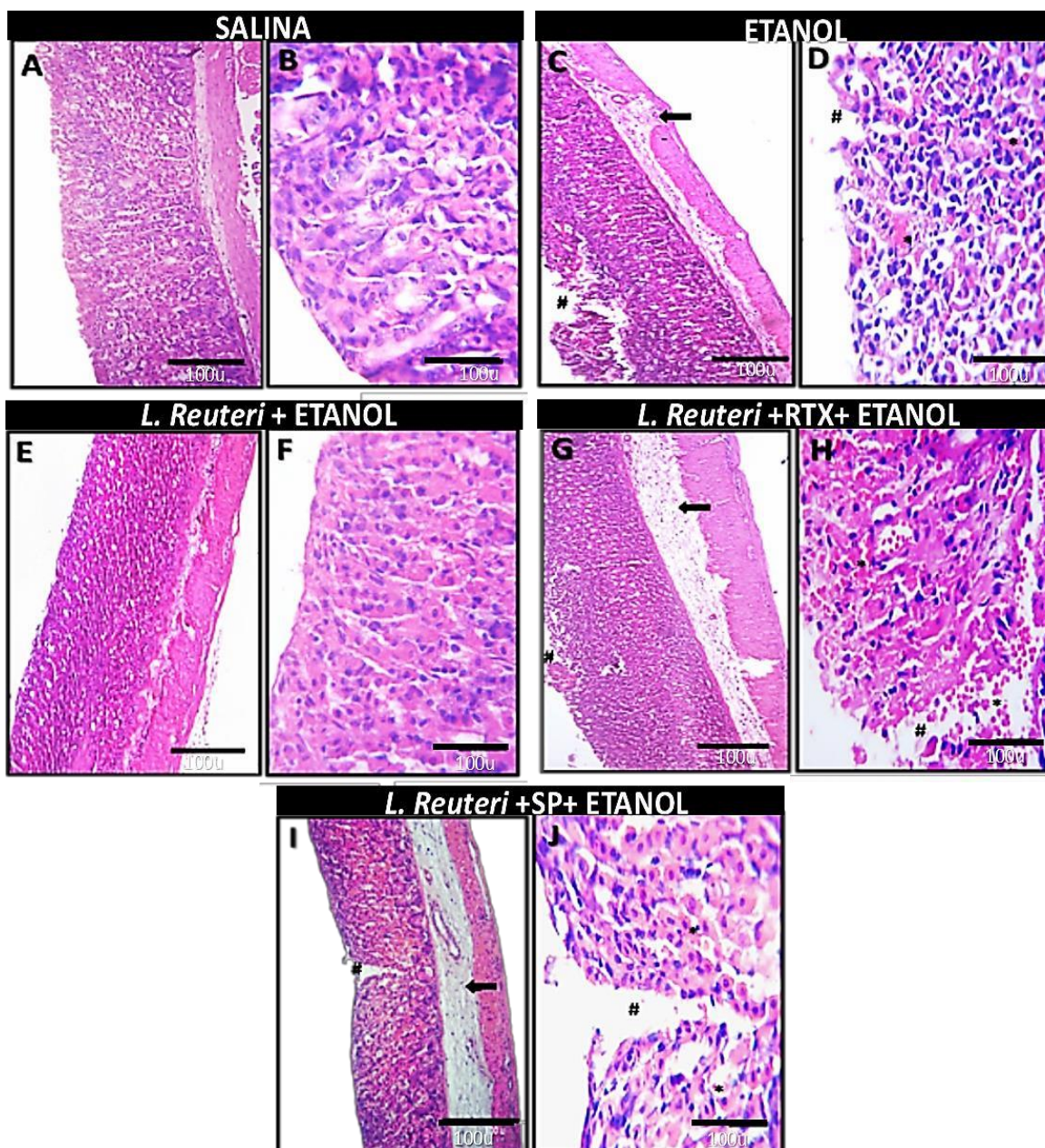
O agonista do receptor NK1 (SP) coadministrado com etanol a 50% causou lesão gástrica significativa nos animais tratados. A administração de 10^8 UFC/g de peso/dia de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (DSM) não protegeu a mucosa gástrica na lesão induzida pela coadministração de SP e etanol. Os resultados foram expressos como média \pm S. E. M. n=5-7 camundongos por grupo. $\psi P < 0.0001$ quando comparado com o grupo normal; *** $P < 0.0001$ quando comparado com o grupo etanol; # $P < 0.0001$ quando comparado com o grupo DSM. Análise de variância e teste de Newman-Keuls foram utilizados para a avaliação.

5.4 EFEITO DO *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 NAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS CAUSADAS PELO ETANOL NA MUCOSA GÁSTRICA

A avaliação histológica confirmou que nenhum dano foi observado na mucosa gástrica de camundongos tratados somente com solução salina (**Figura 15, A e B**). Os animais tratados com etanol a 50% exibiram a mucosa gástrica danificada, com perda de células epiteliais, edema e hemorragia (**Figura 15, C-D**). A suplementação com *L. reuteri* inibiu significativamente estes efeitos deletérios microscópicos causados pelo etanol na mucosa gástrica (**Figura 15, E-F**). A administração de RTX com etanol a 50% reverteu significativamente os efeitos protetores do *L. reuteri* na mucosa gástrica, como demonstrado nas fotomicrografias (**Figura 15, G-H**). Já a coadministração de SP e etanol causou danos microscópicos na mucosa do estômago que o pré-tratamento com *L. reuteri* não foi capaz prevenir (**Figura 15, I-J**).

A **tabela 1** apresenta a pontuação dos escores histopatológicos dos animais tratados de acordo com os critérios de LAINE & WEINSTEIN (1998), que são: escores de hemorragia (0-4), edema (0-4), perda de células epiteliais (0-3) e infiltrado inflamatório (0-3). O somatório total destes escores demonstrou que o etanol aumentou de forma significativa esses parâmetros histopatológicos. *L. reuteri* diminuiu os escores microscópicos de forma significativa, porém a administração de RTX reverteu esse resultado. *L. reuteri* não foi capaz de diminuir as alterações histopatológicas causadas pela coadministração de SP e etanol. Estes resultados microscópicos corroboram com os achados macroscópicos.

Figura 15: Alterações histopatológicas na mucosa do estômago na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos



Fotomicrografias de secções da mucosa gástrica. Imagens com aumento de 100x (A, C, E, G, I), e com aumento de 400x (B, D, F, H e J). Barra de 100 μ m. Painel A-B: Grupo controle salina, evidenciando a integridade da mucosa; C-D: Grupo lesado (etanol 50%); E-F: Suplementação com *L. reuteri* (10^8 UFC/g de peso/dia) na lesão gástrica induzida por etanol; G-H: Efeito do tratamento com RTX e etanol nos camundongos suplementados com *L. reuteri*. I-J: Efeito do tratamento com *L. reuteri* na lesão gástrica induzida por Substância P e etanol. Setas contínuas (→) edema; Tags (#): perda de células epiteliais; Asterisco (*): hemorragia.

Tabela 1- Análises histopatológicas da lesão gástrica induzida por etanol em camundongos

Grupo experimental (n=5-8)	Dano hemorrágico (Escore 0-4)	Edema (Escore 0-4)	Perda de células epiteliais (Escore 0-3)	Infiltrado inflamatório (Escore 0-3)	Total (Escore 0-14)
Salina	0	0	0	0	0
Etanol	3 (3-4) ^ψ	4 (3-4) ^ψ	3 (2-3) ^ψ	1 (0-1)	9(9-11) ^{ψψ}
<i>L. reuteri</i> + Etanol	1 (0-1) [*]	0,5 (0-1) [*]	1 (0-1) [*]	1 (0-1)	3 (0-3) [*]
<i>L. reuteri</i> + RTX+ Etanol	3 (3-4) [#]	4 (3-4) [#]	3 (2-3) [#]	1 (0-1)	9 (7-10) [#]
<i>L. reuteri</i> +SP+ Etanol	3 (2-3)	4 (2-4) [#]	3 (2-3) [#]	1 (0-2)	9 (8-10) [#]

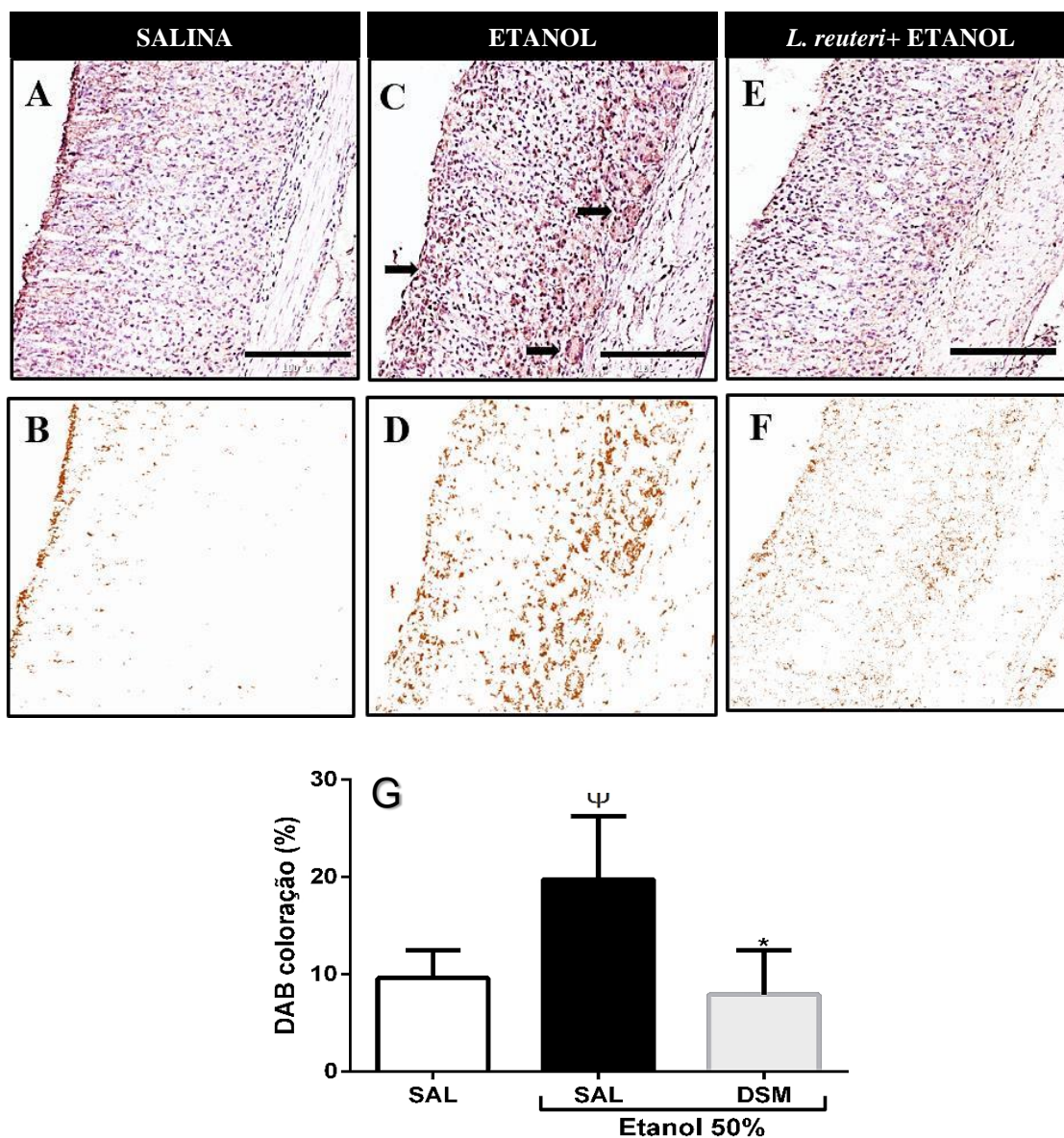
Os dados apresentados são medianas com os escores mínimos e máximos (indicados entre parênteses). O teste não paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do teste de Dunn, foram utilizados para as comparações múltiplas na avaliação histológica. ^ψP<0,05 e ^{ψψ}P<0,01 quando comparado com o grupo salina; ^{*}P<0.05 quando comparado com o grupo lesado (etanol); [#]P<0.05 quando comparado com o grupo pré-tratado com *L. reuteri*.

5.5 EFEITO DO *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 NA EXPRESSÃO DO RECEPTOR TRPV1 NO DANO GÁSTRICO INDUZIDO PELO ETANOL

Os tecidos gástricos dos animais tratados com salina, etanol e *L. reuteri* foram examinados por meio de imuno-histoquímica para determinar a localização do receptor TRPV1 (**Figura 16**). No grupo controle salina (**16, A e B**), a imunorreatividade para TRPV1 foi discreta, enquanto que a intensidade da coloração DAB foi evidente na mucosa gástrica após tratamento com etanol 50%, com áreas marcadas na superfície do epitélio e na submucosa (**16, C e D**). Contudo, a intensidade de coloração TRPV1 mais baixa foi observada em camundongos tratados com DSM (**16, E e F**).

Conforme mostrado na **Figura 16 (G)**, a análise da deconvolução da cor da coloração H-DAB confirmou que o tratamento com etanol aumentou significativamente a intensidade de DAB (19.750 ± 2.903 % DABwt), quando comparado aos grupos salina e *L. reuteri* (9.623 ± 1.404 % DABwt; 7.922 ± 2.046 % DABwt, respectivamente).

Figura 16: Imuno-histoquímica para o receptor TRPV1 na mucosa gástrica dos animais tratados

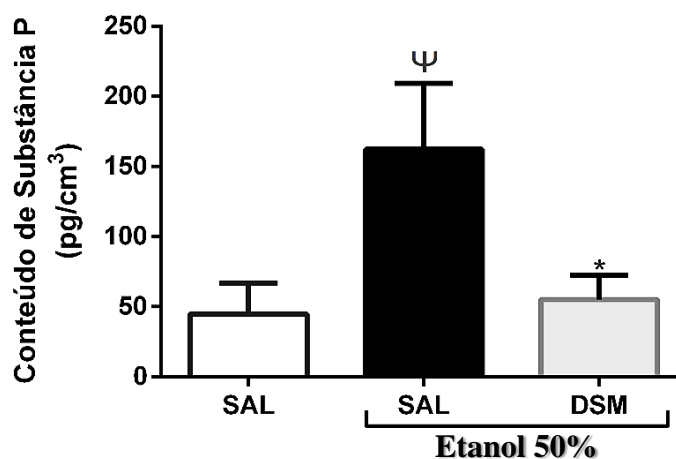


Imagens da imuno-histoquímica para o receptor TRPV1 na mucosa gástrica (A, C e E). Barra de 100 μ m. As fotomicrografias sofreram processo de deconvolução de cor para evidenciar a coloração com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (B, D e F). Painel A e B: imunorreatividade para TRPV1 detectada na mucosa gástrica normal. Painel C e D: Aumento da imunorreatividade para TRPV1 no grupo lesionado (etanol a 50%). Painel E e F: Diminuição da imunorreatividade na mucosa gástrica em animais pré-tratados com *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (DSM) uma vez por dia durante 3 dias em danos gástricos induzidos pelo etanol. Painel G: Análise da deconvolução da cor da coloração DAB para TRPV1 na mucosa gástrica. Ψ $P < 0,05$ versus grupo saudável; * $P < 0,01$ versus grupo lesionado. As setas indicam o aumento da intensidade da marcação. Análise de variância e teste de Newman-Keuls foram utilizados para a avaliação.

5.6 EFEITO DO *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 NOS NÍVEIS DE SUBSTÂNCIA P EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS PELO ETANOL

Os níveis de SP foram significativamente reduzidos em camundongos pré-tratados com *L. reuteri*, quando comparados com os animais tratados somente com etanol 50% ($55,010 \pm 7,827$ pg / cm³ versus $162.200 \pm 21,090$ pg / cm³, respectivamente, $P < 0,05$), como mostrado na **Figura 17**. Estes resultados sugerem que a suplementação com *L. reuteri* diminui significativamente os níveis de SP na mucosa gástrica na lesão gástrica induzida pelo etanol.

Figura 17: Níveis de substância P na mucosa gástrica dos animais tratados



Efeito da suplementação de DSM nos níveis de Substância P na lesão gástrica induzida por etanol. A quantidade de substância P na mucosa gástrica foi estimada por ELISA e os resultados foram expressos em pg / cm³. Os dados apresentados são a média \pm SEM de pelo menos 5-7 camundongos por grupo. O grupo saudável foi tratado apenas com solução salina. A administração de etanol promoveu um aumento significativo da concentração gástrica de substância P. Este efeito foi revertido significativamente quando os animais foram suplementados com *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (DSM) (10^8 UFC /g de peso/dia durante 3 dias). $\Psi P < 0,05$ versus grupo saudável; * $P < 0,05$ versus grupo lesionado. Análise de variância e teste de Newman-Keuls foram utilizados para a avaliação.

5.7 EFEITO PROTETOR DO *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 SOBRE OS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E PARÂMETROS ANTIOXIDANTES

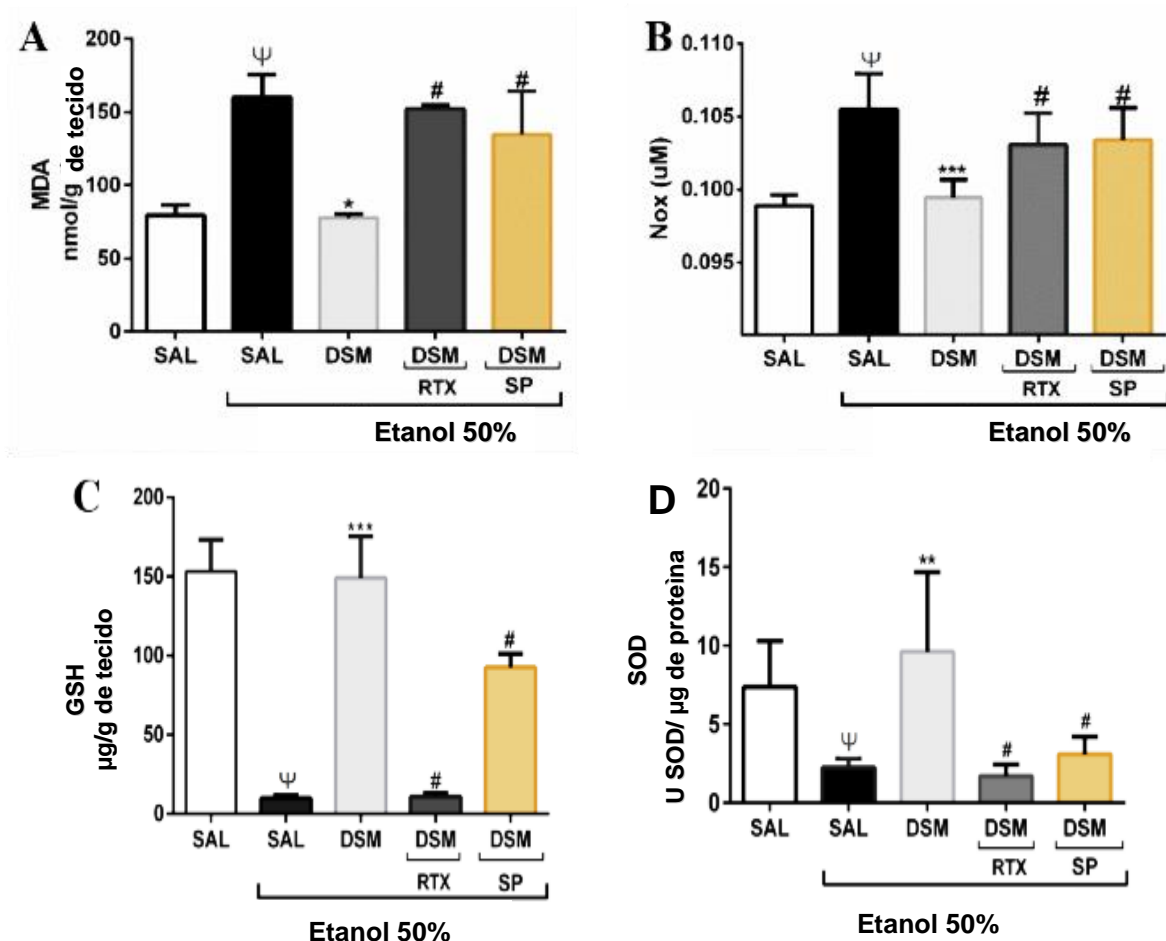
O malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica, foi mensurado para avaliar o estresse oxidativo. O tratamento com etanol a 50% aumentou a concentração de MDA na mucosa gástrica, como mostrado na **Figura 18, A** (160.400 ± 15.210 nmol/g). *L. reuteri* reduziu significativamente os níveis de MDA no dano gástrico induzido pelo etanol ($74,940 \pm 2,675$ nmol / g). Além disso, a administração do agonista seletivo para TRPV1 (RTX) com etanol reverteu este efeito protetor (152.300 ± 2.425 nmol/g). A administração de etanol também aumentou os níveis de NOx na mucosa gástrica ($0,105 \pm 0,001$ μ M, **figura 18, B**), quando comparado com os níveis observados em animais saudáveis e aqueles pré- tratados com *L. reuteri* ($0,097 \pm 0,001$ μ M; $0,098 \pm 0,001$ μ M, respectivamente). O tratamento com RTX também reverteu o efeito do *L. reuteri* nos níveis de NOx ($0,103 \pm 0,001$ μ M). Porém, *L. reuteri* não diminui os níveis de MDA e NOx causados pela administração de Substância P juntamente com etanol ($134,800 \pm 29,710$ nmol/g; $0,103 \pm 0,001$ μ M, respectivamente).

Também foram avaliados parâmetros antioxidantes na mucosa destes animais. As concentrações de GSH na mucosa gástrica dos quatro grupos são mostradas na **Figura 18 (C)**. O nível normal de GSH na mucosa gástrica dos camundongos foi de $153,300 \pm 20,060$ μ g de tecido GSH / g. A concentração de GSH foi significativamente diminuída (9.923 ± 1.931 μ g GSH/g) após administração de etanol a 50%. A suplementação com DSM manteve a concentração de GSH nos níveis basais ($149,100 \pm 26,330$ μ g GSH/g). A administração de RTX com etanol reverteu significativamente estes efeitos protetores de *L. reuteri* ($P < 0,0001$). *L. reuteri* não diminui de forma significativa a depleção de GSH causada pela coadministração de SP e etanol ($P < 0,05$).

A concentração de SOD em animais saudáveis foi de $7,376 \pm 1,300$ U SOD/mg de proteína, e o tratamento com etanol diminuiu a concentração deste antioxidante no tecido gástrico ($2,240 \pm 0,247$ U SOD/mg de proteína). O *L. reuteri* manteve os níveis basais do antioxidante endógeno SOD, e este efeito foi revertido após a administração de RTX ($9,620 \pm 2,918$ U SOD /mg de proteína; $1,700 \pm 0,331$ SOD/mg de proteína; respectivamente; $P < 0,001$). Porém, a suplementação com o *L. reuteri* não diminuiu a depleção de SOD causada por

SP juntamente com etanol ($3,090 \pm 0,556$ U SOD/mg de proteína), como demonstrado na **figura 18 (D)**.

Figura 18: Efeito protetor do DSM nos biomarcadores de estresse oxidativo e parâmetros antioxidantes



Efeito da suplementação com DSM nos níveis de biomarcadores do estresse oxidativo, no dano gástrico induzido por etanol. (A) O etanol promoveu um aumento de MDA no tecido gástrico, no entanto, a suplementação com *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (DSM) (10^8 UFC/g de peso/dia durante 3 dias) impediu significativamente esse efeito. (B) Etanol aumenta os níveis de NOx, quando comparado com animais saudáveis, e o pré-tratamento com DSM, reverteu esse efeito. (C) A administração de etanol promoveu uma diminuição da concentração gástrica GSH, que foi revertido quando os animais foram suplementados com DSM. (D) O etanol diminuiu a atividade de SOD quando comparado com animais saudáveis. A suplementação com DSM aumentou os níveis de SOD. A administração de RTX com etanol reverteu os efeitos protetores de *L. reuteri* DSM em todos os parâmetros avaliados. DSM não protegeu a mucosa gástrica da lesão induzida por SP e etanol. Os dados apresentados são a média \pm SEM de pelo menos 5-7 camundongos por grupo; A: $\psi P < 0,05$ versus grupo saudável; * $P < 0,01$ versus grupo lesado; # $P < 0,001$ versus grupo DSM; B: $\psi P < 0,0001$ versus grupo saudável; * $P < 0,01$ versus grupo lesado; # $P < 0,001$ versus grupo DSM; C: $\psi P < 0,0001$ versus grupo saudável; * $P < 0,0001$ versus grupo ferido; # $P < 0,0001$ e # $P < 0,05$ versus grupo DSM; D $\psi P < 0,05$ versus grupo saudável; * $P < 0,001$ versus

grupo lesado; #P <0,001 versus grupo DSM. Análise de variância e teste de Newman-Keuls foram utilizados para a avaliação.

5.8 EFEITO DO *L. reuteri* DSM 17938 NOS NÍVEIS DE MUCO ADERIDO À PAREDE GÁSTRICA E SECREÇÃO ÁCIDA

Foi utilizado alcian blue para verificar os níveis de muco aderido à parede gástrica, visto que este corante tem a capacidade de corar a mucina. Como mostrado na **Tabela 2**, a administração de etanol a 50% causou depleção do muco aderido à parede gástrica neste modelo, quando comparado com o grupo controle salina ($58,340 \pm 8,941 \mu\text{g/g}$ de tecido, $137.200 \pm 16.580 \mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente). Por outro lado, a suplementação com *L. reuteri* DSM 17938 (10^8 UFC) inibiu esse efeito do etanol, e os níveis de muco gástrico foram mantidos ($103.201 \pm 6.110 \mu\text{g/g}$ de tecido). Desta forma, evidencia-se que *L. reuteri* protege significativamente os níveis de muco aderente no estômago, quando comparado com o grupo lesado com etanol.

Além disso, não foram observadas alterações significativas no volume de suco gástrico, pH e acidez total, entre os camundongos suplementados com *L. reuteri*, omeprazol ou solução salina no conteúdo gástrico após a ligadura do piloro (**Tabela 2**). No entanto, o tratamento com etanol aumentou esses parâmetros de acidez gástrica, quando comparado aos níveis observados no tratamento com solução salina isolada, como demonstrado abaixo.

Tabela 2- Efeito da suplementação com DSM (10^8 UFC/g de peso/dia por 3 dias) nos níveis de muco e secreção ácida gástrica em camundongos

Tratamento	Volume (mL)	pH (unidades)	[H+] (mEq/mL/4h)	Níveis de muco (ug/g de tecido)
Salina	0.028 ± 0.02	5.6 ± 0.2	0.14 ± 0.02	137.20 ± 16.58
Etanol	$0.350 \pm 0.08^{\Psi}$	$3.5 \pm 0.2^{\Psi}$	$3.70 \pm 0.83^{\Psi}$	$58.34 \pm 8.95^{\Psi}$
Omeprazol	$0.046 \pm 0.02^{***}$	$5.2 \pm 0.5^*$	$0.20 \pm 0.19^*$	-----
<i>L. reuteri</i>	$0.055 \pm 0.02^{**}$	$4.6 \pm 0.5^*$	$0.12 \pm 0.05^*$	$103.20 \pm 6.11^{**}$

Os dados apresentados são a média \pm SEM de pelo menos 5-7 camundongos por grupo. $^{\Psi}P < 0,01$ versus grupo salina; $^*P < 0,05$ versus grupo etanol. $^{**}P < 0,01$ versus grupo de etanol. $^{***}P < 0,001$ versus grupo etanol. Análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de um teste Newman-Keuls foi realizado.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos os efeitos da suplementação com *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 sobre a proteção da mucosa gástrica, na lesão induzida por etanol a 50% em camundongos. Além disso, avaliamos a modulação do *L. reuteri* na via da inibição da ativação do TRPV1, e consequente diminuição dos biomarcadores do estresse oxidativo no dano gástrico.

Vendo o potencial de *L. reuteri* na prevenção de diversos distúrbios do trato gastrointestinal (COCCORULLO *et al.*, 2010; FRANCAVILLA *et al.*, 2012; SAVINO *et al.*, 2010; WALSHAM *et al.*, 2016; HAILESELASSIE *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2014), bem como a sua capacidade em proteger a mucosa do estômago contra agentes microbianos deletérios (DORE *et al.*, 2016), investigamos a atividade gastroprotetora desta probiótico na lesão gástrica induzida por etanol. Em nossos experimentos, a administração de 10^8 UFC/grama de peso/dia de *L. reuteri* DSM 17938 liofilizado durante 3, 7 e 14 dias impediu de forma significativa o dano gástrico induzido pelo tratamento com etanol a 50%. Estes resultados estão de acordo com dados recentes que mostram que as bactérias ácido-láticas promovem a proteção gástrica contra vários agentes prejudiciais (AZMI *et al.*, 2016; LAM *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2009; SENOL *et al.*, 2011a; SENOL *et al.*, 2011b; SUO *et al.*, 2016). Outros estudos mostram atividade gastroprotetora com o uso de probióticos em doses e formas de tratamento semelhantes as utilizadas neste trabalho, como os ratos pré-tratados com 2×10^9 UFC/dia de *Lactobacillus rhamnosus* GG durante 3 dias consecutivos também exibiram grande integridade da mucosa gástrica após danos agudos induzidos por etanol (LAM *et al.*, 2007). Além disso, os ratos pré-tratados com 10^9 UFC /kg do peso do corpo de *Lactobacillus fermentum* durante 14 dias também apresentaram lesão gástrica induzida por HCl/etanol minimizada por seus efeitos antioxidantes (SUO *et al.*, 2016).

De acordo com achados microscópicos, o tratamento com etanol causa dano diretamente na mucosa do estômago, resultando em lesões hemorrágicas que causam edema, hemorragias subepiteliais e esfoliação celular, com ruptura

da mucosa (GUSLANDI, 1987). Em nosso estudo, o tratamento com *L. reuteri* diminuiu significativamente esses parâmetros histopatológicos, confirmando seu efeito protetor sobre a mucosa gástrica. O único parâmetro que não houve uma alteração significativa foi o de infiltrado inflamatório na mucosa gástrica, visto que o período de uma hora após a administração de etanol a 50% não é suficiente para causar uma resposta inflamatória exacerbada, resultado que corrobora com outros estudos (MEDEIROS *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2015). Estes resultados demonstram um efeito direto do DSM na mucosa gástrica, o que pode ter ocorrido devido ao fato das bactérias ácido-láticas serem resistentes à acidez gástrica, e terem a capacidade de se adsorver na mucosa do estômago, facilitando a sua localização e ação protetora neste órgão (SUO *et al.*, 2016).

Um dos principais mecanismos de ação lesivo do etanol na mucosa gástrica é através da ativação do receptor de potencial transiente vanilóide tipo 1 (TRPV1) pelo etanol nas terminações nervosas da mucosa, o que causa a liberação do neuropeptídeo Substância P e geração de EROs, por um mecanismo dependente do receptor NK1, que medeia os efeitos da Substância P (GAZZIERI *et al.*, 2007). Assim, substâncias que atuam inibindo a ativação destes receptores têm um grande potencial para prevenir e tratar lesões gástricas geradas pelo álcool. Recentemente, PEREZ-BURGOS e colaboradores (2015) mostraram que *L. reuteri* DSM 17938 inibe a expressão do receptor TRPV1, o que nos forneceu evidências para a investigação de um possível efeito inibidor da ativação do receptor TRPV1 pelo *L. reuteri* em sua atividade protetora gástrica, com consequente diminuição da concentração de substância P e do estresse oxidativo na mucosa, bem como da manutenção em níveis basais do sistema antioxidante endógeno.

Assim, avaliamos neste estudo o envolvimento da potencial inibição da ativação do receptor de potencial transiente vanilóide tipo 1 pelo etanol no efeito gastroprotetor de *L. reuteri*. Para isso, ativamos o receptor TRPV1 com capsaicina, um agonista seletivo deste receptor, e com RTX, um agonista seletivo mais potente que a capsaicina, na dose de ambos na dose de 3 nmol/kg, conforme TRAMONTANA *et al.*, (1994), juntamente com o tratamento com etanol. No trabalho de TRAMONTANA e colaboradores (1994), a administração destes agonistas do receptor TRPV1 juntamente com etanol não

causou proteção gástrica nesta dose, e nem aumentou a lesão induzida por etanol, sendo assim esta dose utilizada no presente estudo apenas para a ativação do receptor. A administração destes agonistas foi capaz de bloquear a atividade gastroprotetora do probiótico, sendo que o RTX mostrou-se mais eficaz na inibição da proteção gástrica por *L. reuteri*, visto que este agonista é mais potente na ativação do TRPV1 (TRAMONTANA *et al.*, 1994).

Para confirmar este achado, investigamos a expressão do receptor TRPV1 na mucosa através de imuno-histoquímica, que demonstrou a diminuição da expressão desse receptor após a suplementação com *L. reuteri*, o que sugere que a presença desta bactéria pode inibir a ativação de TRPV1 mediada pelo etanol. Além disso, um ensaio de ELISA mostrou que a suplementação com *L. reuteri* preveniu o aumento dos níveis de Substância P, que pode ser consequência da não ativação de TRPV1 pelo etanol, que causa grande liberação desta substância. A literatura também mostra que outros lactobacilos, como *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus fermentum*, inibem a expressão de TRPV1 em seu efeito terapêutico intestinal (SUO *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2015), e *L. fermentum* também diminui os níveis da substância P em seu efeito gastroprotetor (SUO *et al.*, 2016).

Visto que a literatura mostra que a ligação da Substância P ao receptor de neuroquinina tipo I e sua ativação é necessária para as ações deletérias desta neuroquinina, e que antagonistas do receptor NK1 apresentam atividade gastroprotetora na lesão induzida por etanol (KARMELI *et al.*, 1991; GAZZIERI *et al.*, 2007), também avaliamos se o *L. reuteri* poderia causar a modulação do receptor de SP, como mecanismo de proteção contra ação do etanol. Dessa forma, como já descrito na literatura, foi realizada administração de SP juntamente com a administração de etanol a 50%, o que aumenta a lesão causada pelo etanol sozinho, e antagonistas do NK1 conseguem reverter de forma eficaz a lesão gerada (GAZZIERI *et al.*, 2007). Porém, em nosso estudo, o pré-tratamento com *L. reuteri* não foi capaz de reverter a lesão causada por este agente, enquanto o antagonista do NK1, o WIN 62,577, diminui a área de lesão gástrica de forma significativa. Desta forma, o *L. reuteri* provavelmente não atua modulando este receptor em seu efeito gastroprotetor. Na literatura também não há dados relativos a outros lactobacilos modularem o receptor

NK1.

Estes dados e estudos anteriores mostraram que os biomarcadores do estresse oxidativo, como os níveis de radicais livres e MDA, são significativamente aumentados por tratamento com etanol a 50% (SOUZA *et al.*, 2016; MEDEIROS *et al.*, 2009). A suplementação com *L. reuteri* reduziu os níveis de peroxidação lipídica, causando uma diminuição na concentração de MDA e este efeito protetor foi revertido após o tratamento com o agonista do TRPV1, RTX. Em nossos achados, o etanol aumentou os níveis de NOx, que são metabolitos do óxido nítrico (nitritos e nitratos circulantes), na mucosa gástrica. O pré-tratamento com *L. reuteri* manteve os níveis normais de NOx, mas este efeito protetor foi revertido após o tratamento com um agonista de TRPV1. Estudos anteriores mostram que a administração aguda de etanol aumenta a produção de óxido nítrico por neutrófilos, através da ativação de iNOS (óxido nítrico sintase induzida), o que corrobora com nossos resultados (DENG; DEITRICH, 2007; GAGO *et al.*, 2008). Além disso, outros estudos com probióticos demonstraram diminuição da ativação do iNOS e, conseqüentemente, dos níveis de nitrito, nos efeitos benéficos destas bactérias em diferentes modelos (SUO *et al.*, 2014; WAGNERBERGER *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2015). O *L. reuteri* não diminuiu os níveis destes parâmetros bioquímicos de estresse na mucosa gástrica na lesão causada pela coadministração de SP e etanol.

Um mecanismo de defesa importante que os organismos possuem para proteger a mucosa gástrica contra os radicais livres são sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (HALLIWELL *et al.*, 1995). Um desequilíbrio entre os fatores protetores e prejudiciais na mucosa gástrica diminui a capacidade de defesa do estômago, levando a lesão gástrica (SOUZA *et al.*, 2016). A superóxido dismutase é uma metaloenzima que catalisa a reação que transforma ânions superóxido em peróxido de hidrogênio, desempenhando um papel importante na detoxicação de espécies reativas de oxigênio, e o tratamento com etanol diminui a atividade dessa enzima (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014; GETZOFF *et al.*, 1983). Neste estudo, a administração de etanol diminuiu os níveis de SOD e o pré-tratamento com *L. reuteri* manteve os níveis basais de SOD, apesar do dano gástrico induzido pelo etanol.

Outro processo antioxidante importante, que também é afetado pelos efeitos deletérios do etanol, ocorre através da glutathione peroxidase, que converte glutathione em glutathione oxidada, e este processo reduz H_2O_2 a H_2O e hidroperóxidos lipídicos em álcoois estáveis, desempenhando um papel importante na proteção de células contra os efeitos do peróxido de hidrogênio. A glutathione reductase reduz a glutathione oxidada em GSH, que também desempenha importante atividade antioxidante (MCCAY *et al.*, 1976; BHATTACHARYYA *et al.*, 2014, BOMPART *et al.*, 1990; GRIFFITH, 1999). Corroborando com os achados da literatura, o etanol diminuiu a concentração de GSH na mucosa gástrica, e a suplementação com *L. reuteri* manteve os níveis normais deste fator protetor da mucosa após a lesão gástrica induzida pelo etanol.

A ativação do receptor TRPV1 com seu agonista ultrapotente, RTX, reverteu o efeito protetor do pré-tratamento com *L. reuteri* nos níveis de SOD e GSH no tecido gástrico, mostrando que esses fatores antioxidantes também estão relacionados à ação do probiótico via TRPV1. Já a administração de SP juntamente com etanol causou uma depleção destes fatores antioxidantes que o tratamento com o *L. reuteri* não foi capaz de prevenir, corroborando com os resultados anteriores do presente estudo.

Esses resultados reforçam nossa hipótese de que a diminuição do estresse oxidativo e o aumento da proteção gástrica por *L. reuteri* na lesão gástrica induzida pelo etanol envolvem a inibição da ativação do receptor TRPV1. Os resultados também sugerem que a proteção gástrica ao etanol causada pelo *L. reuteri* não envolve a inibição da ativação do receptor NK1, e provavelmente se dê pela diminuição da liberação de Substância P causado pela inibição da ativação do TRPV1. Dessa forma, há uma menor concentração de SP causando a ativação do receptor NK1, e conseqüentemente a diminuição da geração de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo na mucosa gástrica, independente da inibição do NK1.

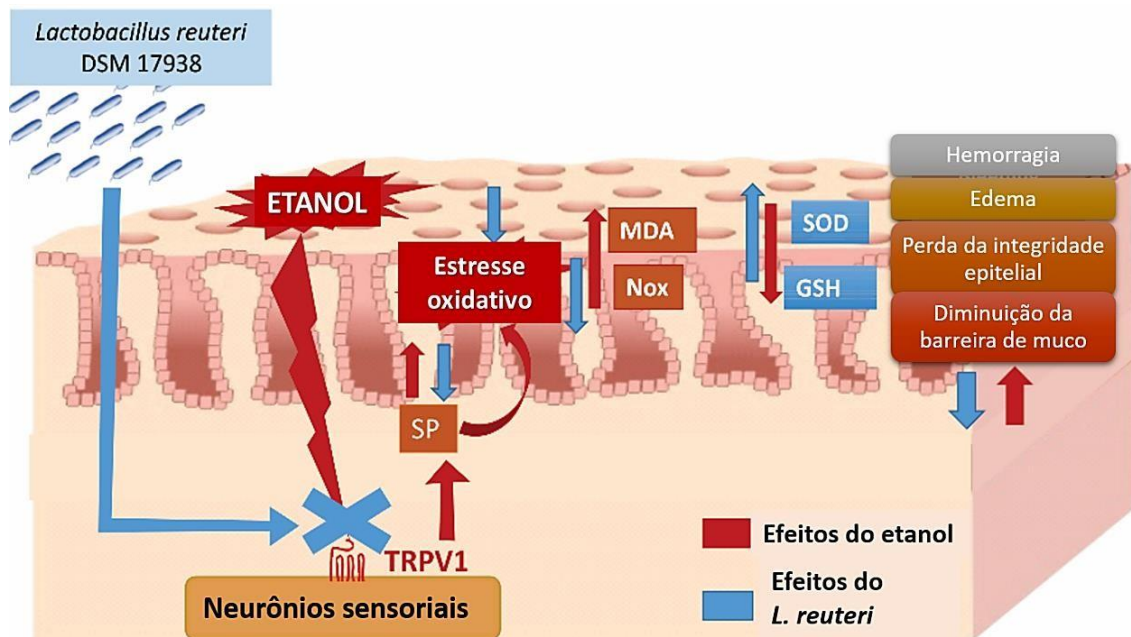
A secreção de muco e a produção de ácido gástrico são fatores homeostáticos importantes que mantêm a integridade da mucosa, e um desequilíbrio nesta homeostase pode levar à ulceração (ROBERT *et al.*, 1979).

A literatura mostra que o excesso de álcool pode reduzir significativamente a camada de muco protetora, reduzindo sua capacidade de defesa contra agentes agressivos (NEU, 1997). Neste estudo, o etanol reduziu a camada de muco da parede gástrica, e o pré-tratamento com *L. reuteri* impediu a redução do muco nos animais lesados por etanol. LAM e colaboradores (2007) também demonstraram um efeito protetor da camada de muco no efeito gastroprotetor de *Lactobacillus rhamnosus*.

Os estudos mostram que os níveis de substância P são elevados nas lesões gástricas, e que essa taquicinina pode aumentar a secreção de ácido gástrico, o que pode agravar as lesões na mucosa do estômago (SUO *et al.*, 2016; YOKOTANI; FUJIWARA, 1985). Em nosso estudo, como já discutido, o etanol aumentou os níveis de substância P e também aumentou a secreção de ácido gástrico. No entanto, a suplementação com *L. reuteri* não modificou o volume normal de secreção gástrica, pH ou acidez total na mucosa gástrica dos camundongos.

Em resumo, nossos achados mostraram que a suplementação com *L. reuteri* DSM 17938 protege a mucosa gástrica da lesão induzida por etanol em camundongos. Esta atividade foi mediada pela redução do estresse oxidativo e pela manutenção da atividade antioxidante, bem como a diminuição dos níveis de substância P. Assim, nossos resultados sugerem que *L. reuteri* pode atuar inibindo os efeitos da ativação de TRPV1 mediada pelo etanol, com consequente diminuição dos níveis de substância P, de espécies reativas de oxigênio, e manutenção do sistema antioxidante e muco na mucosa gástrica, como esquematizado na **figura 19**, abaixo.

Figura 19: Esquemática do efeito protetor de *L. reuteri* DSM 17938 na lesão gástrica induzida por etanol



Autoria própria, 2017

7 CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo mostram que a suplementação com *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 protege a mucosa gástrica da lesão induzida pela administração de etanol a 50% em camundongos. Esta atividade foi mediada por redução do estresse oxidativo e manutenção da atividade antioxidante, além da diminuição dos níveis de substância P. A suplementação com *L. reuteri* também protegeu a perda da barreira de muco, bem como preveniu o dano epitelial causado pelo etanol na mucosa gástrica.

Ainda, estes resultados apoiam a hipótese de que *L. reuteri* pode atuar inibindo os efeitos da ativação da TRPV1 pelo etanol, o que leva à diminuição dos níveis de Substância P, e consequente diminuição das espécies reativas de oxigênio na mucosa gástrica. Porém, estudos futuros são necessários para confirmar a hipótese gerada por este trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-SALAM, O. M.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A.; SZOLCSÁNYI, J.; MÓZSIK, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **J Physiol-Paris**, v. 95, n. 1, p. 105-127, 2001.
- ABDEL-SALAM, O.M.E. et al. Capsaicin-sensitive afferent sensory nerves in modulating gastric mucosal defense against noxious agents. **J Physiol Paris**, v. 93, n. 5, p. 443-454, 1999.
- ABRAHAM, N. S. Proton pump inhibitors: potential adverse effects. **Cur opin gastroenterol**, v. 28, n. 6, p. 615-620, 2012.
- AEBI H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- ÅHSBERG, K.; YE, W.; LU, Y.; ZHENG, Z.; STAËL VON HOLSTEIN, C. Hospitalisation of and mortality from bleeding peptic ulcer in Sweden: a nationwide time-trend analysis. **Aliment pharmacol therap**, v. 33, n. 5, p. 578-584, 2011.
- AIHARA, T.; NAKAMURA, Y.; TAKETO, M.M.; MATSUI, M.; OKABE, S. Cholinergically stimulated gastric acid secretion is mediated by M3 and M5 but not M1 muscarinic acetylcholine receptors in mice **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v.288, n.6, p.G1199-207, 2005
- AIRES, M.M. **Fisiologia**. 3ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. v. 14, p. 107-24, 2008.
- AL BATRAN, R. et al. In vivo antioxidant and antiulcer activity of *Parkia speciosa* ethanolic leaf extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e64751, 2013.
- ALLEN A, FLEMSTROM G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 288, n. 1, p. C1–19, 2005.
- AMARAL, G. P.; et al. Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 55, p. 48-55, 2013.
- ANG, L. Y. E.; TOO, H. K. I.; TAN, E. L.; CHOW, T. K. V.; SHEK, P. C. L.; THAM, E. et al. Antiviral activity of *Lactobacillus reuteri* Protectis against Coxsackievirus A and Enterovirus 71 infection in human skeletal muscle and colon cell lines. **Virology**, v. 13, n. 1, p. 111, 2016.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARAKAWA, T.; WATANABE, T.; TANIGAWA, T.; TOMINAGA, K.; FUJIWARA, Y.; MORIMOTO, K. Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: Its pathophysiology and clinical relevance. **World J Gastroenterology**, v. 18, p. 4811–4822, 2012.
- ASADA, K.; KANEMATSU, S.. Reactivity of thiols with superoxide radicals. **Agric Biol Chem.**, v. 40, n. 9, p. 1891-1892, 1976.

- ATUMA, C.; STRUGULA, V.; ALLEN, A.; HOLM, L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. **Am. J. Physiol.**, v. 280 p. G922–G929, 2001.
- AWASTHI, Yogesh C. et al. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. **Mol asp med**, v. 24, n. 4, p. 219-230, 2003.
- AZMI, L.; GUPTA, S. S.; SHUKLA, I.; KANT, P.; UPRETI, D. K.; RAO, C. V. GASTRO PROTECTIVE EFFECTS OF USNEA LONGISSIMA METABOLITES ON PROBIOTIC LACTOBACILLUS CASEI. **Internat J Pharmacog**, v. 3, p.140-148, 2016.
- BAHARI, H. M.; ROSS, I. N.; TURNBERG, L. A. Demonstration of a pH gradient across the mucus layer on the surface of human gastric mucosa in vitro. **Gut**, v. 23, n. 6, p. 513-516, 1982.
- BARKUN, A.; LEONTIADIS, G. Systematic review of the symptom burden, quality of life impairment and costs associated with peptic ulcer disease. **Am J med**, v. 123, n. 4, p. 358-366, 2010.
- BAST, A.; HAENEN, G.R.M.M; DOELMAN, C.J.A. Oxidants and antioxidants: state of the art. **Am J med**, v. 91, n. 3, p. S2-S13, 1991.
- BECKER, J. C. Beyond gastric acid reduction: proton pump inhibitors induce heme oxygenase-1 in gastric and endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** , v. 345, n. 3, p. 1014-1021, 2006.
- BELAICHE, J.; BURETTE, A.; DE VOS, M. A. R. T. I. N. E.; LOUIS, E., HUYBRECHTS, M.; DELTENRE, M. Observational survey of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. **Acta Gastroenterol Belg** , v. 65, n. 2, p. 65-73, 2001.
- BELHADJ, S. I. et al. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. **Int J Hyperthermia**, v. 30, n. 7, p. 513-523, 2014.
- BERRIDGE, M.J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M.D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nat rev Mol cell biol**, v. 1, n. 1, p. 11-21, 2000.
- BERTHOUD, H.R.; POWLEY, T.L. Vagal afferent innervation of the rat Fundic stomach: morphological characterization of the gastric tension receptor. **J Comp Neurol**, v. 319, p.261–276, 1992.
- BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; CROWE, S. E. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiol rev.**, v. 94, n. 2, p. 329-354, 2014.
- BIK, E.M.; ECKBURG, P.B.; GILL, S.R.; NELSON, K.E.; PURDOM, E.A.; FRANCOIS, F.; PEREZ-PEREZ, G.; BLASER, M.J.; RELMAN, D.A. 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 3, p. 732-737, 2006.
- BLANK, M. A., et al. Nonclinical model for assessing gastric effects of bisphosphonates. **Dig. dis sci**, v. 42, n. 2, p. 281-288, 1997.
- BLEDNOV, Y. A.; HARRIS, R. A. Deletion of vanilloid receptor (TRPV1) in mice alters behavioral effects of ethanol. **Neuropharmacol**, v. 56, n. 4, p. 814-820, 2009.

- BOCK, O.A.A.; RICHARDS, W.C.D.; WITTS, L. J. The relationship between acid secretion after augmented histamine stimulation and the histology of the gastric mucosa. **Gut**, v. 4, n. 2, p. 112, 1963.
- BOLIGON, A. A.; DE FREITAS, R. B.; DE BRUM, T. F.; WACZUK, E. P.; KLIMACZEWSKI, C. V.; DE ÁVILA, D. S., et al. Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. **Act Pharmac Sin B**, v. 4, n. 5, p. 358-367, 2014.
- BO-LINN, G.W. et al. An evaluation of the importance of gastric acid secretion in the absorption of dietary calcium. **J Clin Invest**, v. 73, n. 3, p. 640, 1984.
- BOLTON, J.P.; PALMER, D.; COHEN, M.M. Stimulation of mucus and nonparietal cell secretion by the E₂ prostaglandins. **Dig Dis Sci**, v. 23, n. 4, p. 359-364, 1978.
- BOMPART, G. J.; PREVOT, D. S.; BASCANDS, J. L. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase, and S-transferase activity: application to cisplatin-induced toxicity. **Clin biochem**, v. 23, n. 6, p. 501-504, 1990.
- BRASIL. Ministério da Saúde - **Sistema de Informações Hospitalares do SUS** (SIH/SUS). Acesso em: 05 de agosto, 2017.
- BROWN, J.F.; KEATES, A.C.; HANSON, P.J.; WHITTLE, B.J. R. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 265, n. 3, p. G418-G422, 1993.
- BRZOZOWSKI, T. et al. Physiological mediators in nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)-induced impairment of gastric mucosal defense and adaptation. Focus on nitric oxide and lipoxins. **J Physiol Pharmacol**, v. 59, n. 2, p. 89-102, 2008.
- BRZOZOWSKI, T., KONTUREK, P. C. H., SLIWOWSKI, Z., DROZDOWICZ, D., HAHN, E. G., & KONTUREK, S. J. Importance of nitric oxide and capsaicin-sensitive afferent nerves in healing of stress lesions induced by epidermal growth factor. **J clin gastroenterol**, v. 25, p. S28-S38, 1997b
- BRZOZOWSKI, T., KONTUREK, S. J., SLIWOWSKI, Z., DROZDOWICZ, D., ZACZEK, M., & KEDRA, D. Role of L-arginine, a substrate for nitric oxide-synthase, in gastroprotection and ulcer healing. **J gastroenterol**, v. 32, n. 4, p. 442-452., 1997a
- BUCKINX, R., VAN, N.L., AVULA, L.R., ALPAERTS, K., ADRIAENSEN, D., & TIMMERMANS, J.P. Transient receptor potential vanilloid type 1 channel (TRPV1) immunolocalization in the murine enteric nervous system is affected by the targeted C-terminal epitope of the applied antibody. **J. Histochem Cytochem**, v. 61, n. 6, p. 421-432, 2013.
- BUJANDA, L. The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. **Am. J. Gastroenterol.** V. 95, n. 12, p.3374–3382, 2000.
- BURNEY, S. et al. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. **Mutat Res Fund Mol Mech Mut**, v. 424, n. 1, p. 37-49, 1999.
- CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heatactivated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v.389, p.816-24, 1997.

CENTER FOR BEHAVIORAL HEALTH STATISTICS AND QUALITY. **Key substance use and mental health indicators in the United States: Results from the 2015 National Survey on Drug Use and Health**. HHS Publication No. SMA 16-4984, NSDUH Series H-51, 2016.

CERUTTI, P. A. Oxidant stress and carcinogenesis. **Eur J clin inv**, v. 21, n. 1, p. 1-5, 1991.

CHANCE, BRITTON. An intermediate compound in the catalase-hydrogen peroxide reaction. **Acta chem. scand**, v. 1, p. 236-267, 1947.

CHAU, K.; LAU, E.; GREENBERG, S.; JACOBSON, S.; YAZDANI-BROJENI, P.; VERMA, N.; KOREN, G. Probiotics for infantile colic: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial investigating *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. **J pediat**, v. 166, n. 1, p. 74-78, 2015.

CHOI E., et al. Cell lineage distribution atlas of the human stomach reveals heterogeneous gland populations in the gastric antrum. **Gut**, v. 63, p. 1711–1720, 2014.

CHOI, E. Y.; HWANG, H. J.; KIM, I. H.; NAM, T. J. Protective effects of a polysaccharide from *Hizikia fusiformis* against ethanol toxicity in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 1, p. 134-139, 2009.

CHOI, Y. J., KIM, N., LEE, J. Y., NAM, R. H., SEO, J. H., LEE, S., KIM, H. J.; CHOI, Y.J.; LEE, H. S.; LEE, D. H. Gastroprotective effects of PMK-S005 against ethanol-induced acute gastric damage in rats. **Gut Liver**, v. 10, p. 348-355, 2016.

CHOUHAN, D. et al. Perforated Peptic Ulcer, Epidemiology, Incidence, Mortality, Dietary Habits, Life style. **AN OBSERVATIONAL STUDY OF CHANGING EPIDEMIOLOGICAL TRENDS IN INCIDENCE OF PEPTIC PERFORATION IN AGE GROUP 15-45 YEARS IN MY HOSPITAL, INDORE**, n. 94750, 2016.

CLARKE, G.D.; DAVISON, J.S. Mucosal receptors in the gastric antrum and small intestine of the rat with afferent fibres in the cervical vagus. **J Physiol.**, v. 284, p.55–67, 1978.

COCCORULLO, P.; STRISCIUGLIO, C.; MARTINELLI, M.; MIELE, E.; GRECO, L.; STAIANO, A. *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938) in infants with functional chronic constipation: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **J pediat**, v. 157, n. 4, p. 598-602, 2010.

COMAN, M. M. et al. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and SYN BIO® against pathogens. **J appl microbiol**, v. 117, n. 2, p. 518-527, 2014.

CORNE, S.J.; MORRISEY, S. M.; WOODS, R. J. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J physiol**, v. 242, n. 2, p. 116P-117P, 1974.

CRYER, B.; FELDMAN, M. Effects of very low dose daily, long-term aspirin therapy on gastric, duodenal, and rectal prostaglandin levels and on mucosal injury in healthy humans. **Gastroenterol**, v. 117, n. 1, p. 17-25, 1999.

DAS, K., SAMANTA, L., CHAINY, G.B.N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. **IND J Biochem Biophys**, v. 37, n. 3), p. 201-204, 2000.

- DENG, X.S.; DEITRICH, R. A. Ethanol metabolism and effects: nitric oxide and its interaction. **Cur clin pharmacol**, v. 2, n. 2, p. 145-153, 2007.
- DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenerg**, v. 1411, n. 2, p. 334-350, 1999.
- DOLPADY, J. et al. Oral Probiotic VSL# 3 prevents autoimmune diabetes by modulating microbiota and promoting indoleamine 2, 3-dioxygenase-enriched tolerogenic intestinal environment. **J diabetes res**, v. 2016, 2016.
- DORE, M. P.; SORO, S.; ROCCHI, C.; LORIA, M. F.; BIBBÒ, S.; PES, G. M. Inclusion of *Lactobacillus Reuteri* in the Treatment of *Helicobacter pylori* in Sardinian Patients: A Case Report Series. **Medicine**, v. 95, n. 15, 2016.
- DYCK, W.P. et al. Cimetidine and placebo in the treatment of benign gastric ulcer. **Gastroenterol**, v. 74, n. 2, p. 410-415, 1978.
- EGERVÄRN, M., M. DANIELSEN, S. ROOS, H. LINDMARK, AND S. LINDGREN. 2007. Antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*. **J Food Protec**, v. 70, n. 2, p. 412-418, 2007.
- EMARA, M. H.; MOHAMED, S. Y.; ABDEL-AZIZ, H. R. Lactobacillus reuteri in management of Helicobacter pylori infection in dyspeptic patients: a double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. **Therap adv gastroenterol**, v. 7, p. 4-13, 2013.
- ERIKSSON, S. et al. Omeprazole and H2-receptor antagonists in the acute treatment of duodenal ulcer, gastric ulcer and reflux oesophagitis: a meta-analysis. **Eur j gastroenterol hepatol**, v. 7, n. 5, p. 467-475, 1995.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde on related aldehydes. **Free Radic Biol Med**, v. 11, p. 81-128, 1991.
- FARMER, E.E.; MUELLER, M.J. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 64, p. 429-450, 2013.
- FARRELL, C.P.; MORGAN, M.; RUDOLPH, D.S.; HWANG, A.; ALBERT, N.E.; VALENZANO, M.C. Proton pump inhibitors interfere with zinc absorption and zinc body stores. **Gastroenterol Res**, v. 4, n. 6, p. 243, 2011.
- FELDMAN, M.; FRIEDMAN, L. S.; BRANDT, L. J. **Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease E-Book: Pathophysiology, Diagnosis, Management, Expert Consult Premium Edition-Enhanced Online Features**. Elsevier Health Sciences, 2010.
- FLEMSTROM, G.; GARNER, A. Gastroduodenal HCO₃⁻ transport: Characteristics and proposed role in acidity regulation and mucosal protection. **Am. J Physiol-Gastro Liver Physiol**, v. 242, n. 3, p. G183-G193, 1982.
- FRANCAVILLA, R.; POLIMENO, L.; DEMICHINA, A.; MAUROGIOVANNI, G.; PRINCIPI, B.; SCACCIANOCE, G. Lactobacillus reuteri strain combination in Helicobacter pylori infection: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J clin gastroenterol**, v. 48, n. 5, p. 407-413, 2014.

FRIAS, R. et al. Effect of clinical and probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strains on intestinal permeability and bacterial translocation in healthy and colitic rats. **Food res int**, v. 42, n. 5, p. 636-640, 2009.

FU, W.; MATHEWS, A.P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. **Biochem engineer j**, v. 3, n. 3, p. 163-170, 1999.

GAGO, B. et al. The potent vasodilator ethyl nitrite is formed upon reaction of nitrite and ethanol under gastric conditions. **Free Radic Biol Medic**, v. 45, n. 4, p. 404-412, 2008.

GÄNZLE, M. G.; HÖLTZEL, A.; WALTER, J.; JUNG, G.; HAMMES, W. P. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. **App environmen microbiol**, v. 66, n. 10, p. 4325-4333, 2000.

GAZZIERI, D.; TREVISANI, M.; SPRINGER, J.; HARRISON, S.; COTTRELL, G. S.; ANDRE, E.; NICOLETTI, P.; MASSI, D.; ZECCHI, S.; NOSI, D.; SANTUCCI, M.; GERARD, N.P.; LUCATTELLI, M.; LUNGARELLA, G.; FISCHER B, A.; GRADY, E.F.; BUNNETT, N.W.; GEPPETTI, P. Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 4, p. 581-589, 2007.

GENDLER, S.J.; SPICER, A.P. Epithelial mucin genes. **Annu Rev Physiol.**, v. 57, p. 607-34, 1995.

GERBER, J.G.; NIES, A.S. Canine gastric mucosal vasodilation with prostaglandins and histamine analogs. **Dig dis sci**, v. 27, n. 10, p. 870-874, 1982.

GETZOFF, E. D.; TAINER, J. A.; WEINER, P.K.; KOLLMAN, P. A.; RICHARDSON, J.S.; RICHARDSON, D. C. Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. **Nature**, v. 306, p. 287-290, 1983.

GIANNELLA, R. A.; BROITMAN, S. A.; ZAMCHECK, N. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. **Gut**, v. 13, n. 4, p. 251-256, 1972.

GIESEG, S.; DUGGAN, S.; GEBICKI, J.M. Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxy radicals. **Biochem J**, v. 350, n. 1, p. 215-218, 2000.

GOMES, A. S. et al. Gastroprotective effect of heme-oxygenase 1/biliverdin/CO pathway in ethanol-induced gastric damage in mice. **Eur J pharmacol.**, v. 642, n. 1, p. 140-145, 2010.

GONZÁLEZ, A.; PARIENTE, J.A.; SALIDO, G.M. Ethanol stimulates ROS generation by mitochondria through Ca²⁺ mobilization and increases GFAP content in rat hippocampal astrocytes. **Brain research**, v. 1178, p. 28-37, 2007.

GÖTZ, J. M. et al. Gastric mucosal superoxide dismutases in *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v. 38, n. 4, p. 502-506, 1996.

GRANDE, R. et al. Detection and Physicochemical Characterization of Membrane Vesicles (MVs) of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. **Front microbiol**, v. 8, 2017.

GREEN, L. C., WAGNER, D. A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P. L., WISHNOK, J. S., & TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Anal biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GREEN, T.; DOCKRAY, G.J. Characterization of the peptidergic afferent innervation of the stomach in the rat, mouse and guinea-pig. **Neuroscience**, v. 25, p.181–193, 1988.

GRIFFITH, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radic Biol and Med**, v. 27, n. 9, p. 922-935, 1999.

GROSSMAN, M. I.; ROBERTSON, C. R.; IVY, A. C. Proof of a hormonal mechanism for gastric secretion—the humoral transmission of the distention stimulus. **Am J Physiol**, v. 153, n. 1, p. 1-9, 1948.

GUARINO, M. P. L. et al. Increased TRPV1 gene expression in esophageal mucosa of patients with non-erosive and erosive reflux disease. **Neurogastroenterol Motil**, v. 22, n. 7, p. 746, 2010.

GUSLANDI, M. Effects of ethanol on the gastric mucosa. **Dig dis**, v. 5, n. 1, p. 21-32, 1987.

GUTH, P. H. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. **Yale J Biol Med**, v. 65, n. 6, p. 677, 1992.

GUTH, P.H.; PAULSEN, G.; NAGATA, H. Histologic and microcirculatory changes in alcohol-induced gastric lesions in the rat: Effect of prostaglandin cytoprotection. **Gastroenterol**, v. 87, n. 5, p. 1083-1090, 1984.

GUTTERIDGE, JMe; QUINLAN, G. J. Malondialdehyde formation from lipid peroxides in the thiobarbituric acid test: the role of lipid radicals, iron salts, and metal chelators. **J app biochem**, v. 5, n. 4-5, p. 293-299, 1983.

HAILESELASSIE, Y.; NAVIS, M.; VU, N.; QAZI, K. R.; RETHI, B.; SVERRERMARK-EKSTRÖM, E. Postbiotic Modulation of retinoic acid imprinted Mucosal-like Dendritic cells by Probiotic *Lactobacillus reuteri* 17938 In Vitro. **Front immunol**, v. 7, 2016.

HALL, D. W.; VAN DEN HOVEN, W. E. Gastric mucosa protection and prostaglandin E2 generation in rats by colloidal bismuth subcitrate (DE-NOL). **Arch Int Pharmacodyn Ther.**, v. 286, n. 2, p. 308-319, 1987.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food Chem Toxicol**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HARFORD-WRIGHT, E., LEWIS, K.M., GHABRIEL, M.N., VINK, R. Treatment with the NK1 antagonist emend reduces blood brain barrier dysfunction and edema formation in an experimental model of brain tumors. **PloS one**, 9(5):e97002, 2014.

HARZALLAH, D.; BELHADJ, H. Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GI mucosal barrier. In: **Lactic acid bacteria-R & D for food, health and livestock purposes**. InTech, 2013.

HAYASHI, H.; NISHIYAMA, K.; MAJIMA, M.; KATORI, M.; SAIGENJI, K. Role of endogenous substance P in ethanol-induced mucosal damage in the rat stomach. **J gastroenterol.**, v. 31, n. 3, p. 314-322, 1996.

HELPS, S. C.; THORNTON, E.; KLEINIG, T. J.; MANAVIS, J.; VINK, R. Automatic nonsubjective estimation of antigen content visualized by immunohistochemistry using color deconvolution. **App Immunohistochem Mol Morphol**, v. 20, n.1, p. 82-90, 2012.

- HERNANDEZ, C. et al. Induction of trefoil factor (TFF) 1, TFF2 and TFF3 by hypoxia is mediated by hypoxia inducible factor-1: implications for gastric mucosal healing. **Br j pharmacol**, v. 156, n. 2, p. 262-272, 2009.
- HILL, C. et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.
- HOGBEN, C. A. et al. Quantitative histology of the gastric mucosa: man, dog, cat, guinea pig, and frog. **Gastroenterol**, v. 67, n. 6, p. 1143-1154, 1974.
- HOLZER, P.. TRPV1: a new target for treatment of visceral pain in IBS?. **Gut**, v. 57, n. 7, p. 882-884, 2008.
- HOLZER, P.; LIVINGSTON, E.H.; GUTH, P.H. Sensory neurons signal for an increase in rat gastric mucosal blood flow in the face of pending acid injury. **Gastroenterol.**, v. 101, n. 2, p. 416-423, 1991. a
- HOLZER, P. et al. Sensory neurons mediate protective vasodilatation in rat gastric mucosa. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 260, n. 3, p. G363-G370, 1991. b
- HUI, W.M. et al. Effect of epidermal growth factor on gastric blood flow in rats: possible role in mucosal protection. **Gastroenterol**, v. 104, n. 6, p. 1605-1610, 1993.
- HUNT, R. H. et al. The stomach in health and disease. **Gut**, p. 1-19, 2015. <http://doi:10.1136/gutjnl-2014-307595>.
- INDO, H.P. et al. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. **Mitochondrion**, v. 7, n. 1, p. 106-118, 2007.
- INDRIO, F. et al. Effect of a Partially Hydrolysed Whey Infant Formula Supplemented with Starch and Lactobacillus reuteri DSM 17938 on Regurgitation and Gastric Motility. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1181, 2017.
- ISOLAURI, E. Probiotics in human disease. **Am J clin nutr**, v. 73, n. 6, p. 1142S-1146S, 2001.
- JACOBS, A.; MILES, P. M. Role of gastric secretion in iron absorption. **Gut**, v. 10, n. 3, p. 226, 1969.
- JÚNIOR, A.F.J. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 31, n. 3, p. 434-449, 1998.
- KANNO, T. et al. A multicenter prospective study on the prevalence of Helicobacter pylori-negative and nonsteroidal anti-inflammatory drugs-negative idiopathic peptic ulcers in Japan. **J gastroenterol hepatol**, v. 30, n. 5, p. 842-848, 2015.
- KARMELI, F., ELIAKIM, R.; OKON, E.; RACHMILEWITZ, D. Gastric mucosal damage by ethanol is mediated by substance P and prevented by ketotifen, a mast cell stabilizer. **Gastroenterol**, v. 100, n. 5, p. 1206-1216, 1991.
- KEMGANG, T.S. et al. Fermented milk with probiotic Lactobacillus rhamnosus S1K3 (MTCC5957) protects mice from salmonella by enhancing immune and nonimmune protection mechanisms at intestinal mucosal level. **J nutr biochem**, v. 30, p. 62-73, 2016.

- KHODER, G.; AL-MENHALI, A. A.; AL-YASSIR, F.; KARAM, S. M.; LI, X.; DONG, Z., et al. Potential role of probiotics in the management of gastric ulcer (Review). **Exper Therap Med**, v. 12, n. 1, p. 3-17, 2016.
- KOŁODZIEJ, M.; SZAJEWSKA, H. Lactobacillus reuteri DSM 17938 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: protocol of a randomised controlled trial. **BMJ open**, v. 7, n. 1, p. e013928, 2017.
- KONO, Y; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **J Biol Chem**, v. 257, n. 10, p. 5751-5754, 1982.
- KONTUREK, S. J. et al. Effects of motilin on gastric and pancreatic secretion in dogs. **Scand J Gastroenterol Suppl.**, v. 39, p. 57-61, 1976.
- KOPIN, A.S. et al. Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. **Proc Natl Acad Sci**, v. 89, n. 8, p. 3605-3609, 1992.
- KRETZSCHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Exper Toxicol Pathol**, v. 48, n. 5, p. 439-446, 1996.
- KWIECIEN, S. et al. Reactive oxygen metabolite action in experimental, stress model of gastric mucosa damage. **Gastroenterol Pol**, v. 17, p. 234-243, 2010.
- KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Importance of aldehyde products of lipid peroxidation in the formation of gastric lesions induced by aspirin, ischemia-reperfusion and stress. **Gastroenterol Pol**, v. 9, n. 4, p. 273-280, 2002.
- KWIECIEN, S.; JASNOS, K.; MAGIEROWSKI, M.; SLIWOWSKI, Z.; PAJDO, R.; BRZOZOWSKI, B.; MACH, T.; WOJCIK, D.; BRZOZOWSKI, T. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress-induced gastric injury. **J Physiol Pharmacol**, v. 65, n. 5, p. 613-622, 2014.
- LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterol.**, v. 135, n. 1, p. 41-60, 2008.
- LAINE, L.; WEINSTEIN, W.M. Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. **Gastroenterol**, vol. 94, n. 6; p.1254-1262, 1988.
- LAM, E. K.; TAI, E. K.; KOO, M. W.; WONG, H. P.; WU, W. K.; YU, L.; SO, W, H.L.; WOO, P.C.Y.; CHO, C.H. Enhancement of gastric mucosal integrity by *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Life sci**, v. 80, n. 23, p. 2128-2136, 2007.
- LANCASTER-SMITH, M. J.; JADERBERG, M. E.; JACKSON, D. A. Ranitidine in the treatment of non-steroidal anti-inflammatory drug associated gastric and duodenal ulcers. **Gut**, v. 32, n. 3, p. 252-255, 1991.
- LANGA, S. et al. Protective effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in semi-hard cheese. **Food Control**, v. 84, p. 284-289, 2018.
- LARANJEIRA, R. et al. II levantamento nacional de álcool e drogas (LENAD)-2012. **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD)**, São Paulo, UNIFESP, 2014.
- LATORRE, R.; ZAELZER, C.; BRAUCHI, S. Structure–functional intimacies o transient receptor potential channels. **Quart rev biophys**, v.42, n.03, p.201-246 2009.

LAU, J. Y.; SUNG, J.; HILL, C.; HENDERSON, C.; HOWDEN, C. W.; METZ, D. C. Systematic review of the epidemiology of complicated peptic ulcer disease: incidence, recurrence, risk factors and mortality. **Digestion**, v. 84, n. 2, p. 102-113, 2011.

LAZO, N.; MACO, M.; MATOS, Z.; MAGUIÑA, Y. Efecto protector del *Lactobacillus acidophilus* en gastritis erosiva inducida por indometacina en ratones. **CIMEL**, v. 12, n. 2, p. 76, 2007.

LEDOUX, S. P. et al. Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 434, n. 3, p. 149-159, 1999.

LEUNG, A. M.; REDLAK, M. J.; MILLER, T. A. Role of heat shock proteins in oxygen radical-induced gastric apoptosis. **J Surg Res**, v. 193, n. 1, p. 135-144, 2015.

LEVENSTEIN, S. et al. Psychological stress increases risk for peptic ulcer, regardless of *Helicobacter pylori* infection or use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 13, n. 3, p. 498-506. e1, 2015.

LEVINE, L.R.; CLOUD, M.L.; ENAS, N.H. Nizatidine prevents peptic ulceration in high-risk patients taking nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Arch intern med**, v. 153, n. 21, p. 2449-2454, 1993.

LI, L.; HSU, A.; MOORE, P.K. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation—a tale of three gases!. **Pharmacol therap**, v. 123, n. 3, p. 386-400, 2009.

LIU, C. F.; HU, C. L.; CHIANG, S. S.; TSENG, K. C.; YU, R. C.; PAN, T. M. . Beneficial Preventive Effects of Gastric Mucosal Lesion for Soy– Skim Milk Fermented by Lactic Acid Bacteria. **J agric food chem**, v. 57, n. 10, p. 4433-4438, 2009.

LIU, Y.; FATHEREE, N. Y.; MANGALAT, N.; RHOADS, J. M. *Lactobacillus reuteri* strains reduce incidence and severity of experimental necrotizing enterocolitis via modulation of TLR4 and NF- κ B signaling in the intestine. **American J Physiol Gastrointestinal Liver Physiol**, v. 302, n. 6, p. G608-G617, 2012.

LIU, Y.; TRAN, D. Q.; FATHEREE, N. Y.; RHOADS, J. M. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 differentially modulates effector memory T cells and Foxp3+ regulatory T cells in a mouse model of necrotizing enterocolitis. **American J Physiol Gastrointestinal Liver Physiol**, v. 307, n. 2, p. G177-G186, 2014.

LJUNGH, A.; WADSTRÖM, T. 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. **Cu issues intestin microbiol**, v. 7, n. 2, p. 73-90, 2006.

LUCETTI, L. T. et al. Nitric oxide and hydrogen sulfide interact when modulating gastric physiological functions in rodents. **Dig dis sci**, v. 62, n. 1, p. 93-104, 2017.

MA, L.; WALLACE, J.L. Endothelial nitric oxide synthase modulates gastric ulcer healing in rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 279, n. 2, p. G341-G346, 2000.

MACKENZIE, D. A., JEFFERS, F., PARKER, M. L., VIBERT-VALLET, A., BONGAERTS, R. J., ROOS, S. et al. Strain-specific diversity of mucus-binding

proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. **Microbiol**, v. 156, n. 11, p. 3368-3378, 2010.

MACNAUGHTON, W. K.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. **Life sci**, v. 45, n. 20, p. 1869-1876, 1989.

MACNAUGHTON, Wallace K.; CIRINO, Giuseppe; WALLACE, John L. Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. **Life sci**, v. 45, n. 20, p. 1869-1876, 1989.

MAGIEROWSKI, M. et al. Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9099-9123, 2015.

MAJOR, J. S.; SCHOLLES, P. The localization of a histamine H₂-receptor adenylate cyclase system in canine parietal cells and its inhibition by prostaglandins. **Inflamm Res.**, v. 8, n. 4, p. 324-331, 1978.

MARCUARD, S. P.; ALBERNAZ, L.; KHAZANIE, P.G. Omeprazole therapy causes malabsorption of cyanocobalamin (vitamin B12). **Ann Intern Med**, v. 120, n. 3, p. 211-215, 1994.

MASUDA, Y. et al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 276, n. 3, p. 905-908, 2000.

MCCAY, P.B. et al. Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. **Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.**, v. 431, n. 3, p. 459-468, 1976.

MCINTOSH, C. H. S. et al. Gastric inhibitory polypeptide stimulated secretion of somatostatinlike immunoreactivity from the stomach: inhibition by acetylcholine or vagal stimulation. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 59, n. 5, p. 468-472, 1981.

MEDEIROS, J. V. R., et al. Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **J Pharmacol Exper Therap**, v. 330, n. 3, p. 764-770, 2009.

MELOV, S. et al. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. **Nature genetics**, v. 18, n. 2, p. 159-163, 1998.

MICHIELS, C. et al. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free radic Biol med**, v. 17, n. 3, p. 235-248, 1994.

MILLER, S. M. et al. Haem oxygenase in enteric nervous system of human stomach and jejunum and co-localization with nitric oxide synthase. **Neurogastroenterol Motil**, v. 13, n. 2, p. 121-131, 2001.

MILLER, T.A.; LI, D.; KUO, Y.J.; SCHMIDT, K.L.; SHANBOUR, L.L. Nonprotein sulfhydryl compounds in canine gastric mucosa: effects of PGE₂ and ethanol. **Am J Physiol Gastro Liver Physiol**, v. 249, n. 1, p. G137-G144, 1985.

MIZUI, T.; SATO, H.; HIROSE, F.; DOTEUCHI, M. Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. **Life sciences**, v. 41, n. 6, p. 755-763, 1987.

MONCADA, S. R. M. J.; PALMER, R. M. L.; HIGGS, EA_. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol rev**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MORIMOTO, R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Gen develop**, v. 12, n. 24, p. 3788-3796, 1998.

MORRIS, G. P.; WALLACE, J.L. The roles of ethanol and of acid in the production of gastric mucosal erosions in rats. **Virchows Archiv B Cell Pathology Zell-pathologie**, v. 38, n. 1, p. 23-38, 1981.

MUTOH, H. et al. Role of oxygen radicals in ethanol-induced damage to cultured gastric mucosal cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 258, n. 4, p. G603-G609, 1990.

NAGPAL, R. et al. Gut microbiota in health and disease: an overview focused on metabolic inflammation. **Benef microb**, v. 7, n. 2, p. 181-194, 2016.

NAITO, Y. et al. Changes in superoxide dismutase activity in the gastric mucosa of peptic ulcer patients. **J clin gastroenterol**, v. 14, p. S131-4, 1992.

NANJI, A.A.; GREENBERG, S.S.; TAHAN, S.R.; FOGT, F.; LOSCALZO, J.; SADRZADEH, S.H.; XIE, J.; STAMLER, J.S. Nitric oxide production in experimental alcoholic liver disease in the rat: role in protection from injury. **Gastroenterol**, v. 109, n. 3, p. 899-907, 1995.

NELSON, J.P.; MCNALL, A.D. Alcohol prices, taxes, and alcohol-related harms: a critical review of natural experiments in alcohol policy for nine countries. **Health Policy**. V. 120, p.264-72, 2016.

NEU, S.L. et al. Acid-induced gastric damage in rats is aggravated by starvation and prevented by several nutrients. **J. nutr**, v. 127, n. 4, p. 630-636, 1997.

NG, F.H. et al. Famotidine is inferior to pantoprazole in preventing recurrence of aspirin-related peptic ulcers or erosions. **Gastroenterol**, v. 138, n. 1, p. 82-88, 2010.

OTA, H.; KATSUYAMA, T. Alternating laminated array of two types of mucin in the human gastric surface mucous layer. **Histochem J.**, v. 24, n. 2, p. 86-92, 1992.

OUWEHAND, A. C.; LAGSTRO, M. H.; SUOMALAINEN, T.; SALMINEN, S. Effect of probiotics on constipation, fecal azoreductase activity and fecal mucin content in the elderly. **Ann nutr metabol**, v. 46, n. 3-4, p. 159-162, 2002.

OWEN, D.A. Normal histology of the stomach. **Am J surg pathol**, v. 10, n. 1, p. 48-61, 1986.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol rev**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PALILEO, C.; KAUNITZ, J.D. Gastrointestinal defense mechanisms. **Curr Opin Gastroenterol**. v. 27, n.6, p. 543-8, 2011.

PAPAPETROPOULOS, A. et al. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 106, n. 51, p. 21972-21977, 2009.

PARADISO, A.M.; TSIEN, R.Y.; MACHEN, T.E. Digital image processing of intracellular pH in gastric oxyntic and chief cells. **Nature**, v. 325, n. 6103, p. 447-450, 1987.

PATTEN, D. A.; LAWS, A. P. Lactobacillus-produced exopolysaccharides and their potential health benefits: a review. **Benef microb**, v. 6, n. 4, p. 457-471, 2015.

PENNER, R.; FEDORAK, R. N.; MADSEN, K. L. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. **Cur opin pharmacol**, v. 5, n. 6, p. 596-603, 2005.

PEREZ-BURGOS, A.; WANG, L.; MCVEY, N.K.A.; MAO, Y.K.; AHMADZAI, M., JANSSEN, L.J., STANISZ, A.M., BIENENSTOCK, J., KUNZE, W.A. The TRPV1 channel in rodents is a major target for antinociceptive effect of the probiotic *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. **J Physiol**, v. 593, n. 17, p. 3943-3957, 2015.

PESKAR, B. M.; HOPPE, U.; LANGE, K.; PESKAR, B. A. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on rat gastric mucosal leukotriene C4 and prostanoid release: relation to ethanol-induced injury. **Br J pharmacol**, v. 93, n. 4, p. 937-943, 1988.

PFEIFFER, A. et al. Muscarinic receptors mediating acid secretion in isolated rat gastric parietal cells are of M3 type. **Gastroenterol**, v. 98, n. 1, p. 218-222, 1990.

PHILLIPSON, Mia et al. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 282, n. 2, p. G211-G219, 2002.

POSSENTI, A.; CARVALHO, J. E. D.; MONTEIRO, K. M.; DIAS, I. M. G.; GIBRIM, N. F.; JACOBUCCI, H. B. Atividade antiulcerogênica e mecanismo de ação de alimento Fermentado à base de trigo e soja utilizado como alimento Funcional. **GED gastroenterol. endosc. dig**, v. 30, n. 4, p. 125-131, 2011.

PRINZ C.; et al. Acid secretion and the H,K ATPase of stomach. **Yale J Biol Med**, v. 65, p. 577-96, 1992.

PRINZ, C., et al. Histamine secretion from rat enterochromaffinlike cells. **Gastroenterology**, v. 105, n. 2, p. 449-461, 1993.

QIN, X.; LOU, W; RYDHOLM, H. The Prevention of Upper Gastrointestinal Bleeding in Seriously Ill Chinese Patients: A Randomised, Double-Blind Study Evaluating Esomeprazole vs Cimetidine. **Gastroenterol**, v. 152, n. 5, p. S886-S887, 2017.

RAMSAY, P.T.; CARR, A. Gastric acid and digestive physiology. **Surg Clin North Am**, v. 91, n. 5, p. 977-982, 2011.

RAPTIS, S. et al. Effects of somatostatin on gastric secretion and gastrin release in man. **Digestion**, v. 13, n. 1-2, p. 15-26, 1975.

RICHTER, C.; PARK, J.W.; AMES, B. N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. **Proc Natl Acad Sci**, v. 85, n. 17, p. 6465-6467, 1988.

RIJKERS, G. T.; DE VOS, W. M.; BRUMMER, R. J.; MORELLI, L.; CORTIER, G.; MARTEAU, P. Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. **Br J Nutr**, v. 106, n. 09, p. 1291-1296, 2011.

- ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterol**, v. 77, p. 433 – 443, 1979.
- ROOS, S.; ENGSTRAND, L.; JONSSON, H. 2005. *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. **Int J system evolution microbiol**, v. 55, n. 1, p. 77-82, 2005.
- ROSANDER, A.; CONNOLLY, E.; ROOS, S. Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. **App environm microbiol**, v. 74, n. 19, p. 6032-6040, 2008.
- ROSS, I. N.; TURNBERG, L. A. Studies of the mucus-bicarbonate barrier on rat fundic mucosa: the effects of luminal pH and a stable prostaglandin analogue. **Gut**, v. 24, p. 1030–1033, 1983.
- RUBBO, H. et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **J. Biolog Chem**, v. 269, n. 42, p. 26066-26075, 1994.
- SAFFOURI, B.; et al. Stimulation of gastrin secretion from the perfused rat stomach by somatostatin antiserum. **Life sci**, v. 25, n. 20, p. 1749-1753, 1979.
- SAHOO, N., et al. Gastric Acid Secretion from Parietal Cells Is Mediated by a Ca²⁺ Efflux Channel in the Tubulovesicle. **Developm Cell**, v. 41, n. 3, p. 262-273. e6, 2017.
- SALIN, M. L.; MCCORD, J. M. Free radicals and inflammation. Protection of phagocytosing leukocytes by superoxide dismutase. **J Clin Invest**, v. 56, n. 5, p. 1319, 1975.
- SANDERS, M. E. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. **Clin Infect Dis**, v. 46, p. S58-S61, 2008.
- SANDS, B.E.; PODOLSKY, D.K. The trefoil peptide family. **Annu Rev Physiol.**, v. 58, p.253–273, 1996.
- SAVINO, F.; CORDISCO, L.; TARASCO, V.; PALUMERI, E.; CALABRESE, R.; OGGERO, R. et al. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in infantile colic: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Pediatrics**, v. 126, n. 3, p. e526-e533, 2010.
- SAVINO, F.; PELLE, E.; PALUMERI, E.; OGGERO, R.; MINIERO, R. *Lactobacillus reuteri* (American Type Culture Collection Strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: a prospective randomized study. **Pediatrics**, v. 119, n. 1, p. e124-e130, 2007.
- SAWADA, D. et al. Effect of continuous ingestion of a beverage prepared with *Lactobacillus gasseri* CP2305 inactivated by heat treatment on the regulation of intestinal function. **Food res int**, v. 79, p. 33-39, 2016.
- SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant physiol**, v. 101, n. 1, p. 7, 1993.

- SCHADE, C.; FLEMSTROM, G.; HOLM, L. Hydrogen-ion concentration in the mucus layer on top of acid-stimulated and acid inhibited rat gastric mucosa. **Gastroenterol.**, v.107, pg. 180–188, 1994.
- SCHAEFER, M. Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. **Pflugers Arch** v. 45, p.35-42, 2005.
- SCHUBERT, M.L. Functional anatomy and physiology of gastric secretion. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 31, p. 479-485, 2015.
- SCHUBERT, M.L. Gastric acid secretion. **Cur opin gastroenterol**, v. 32, n. 6, p. 452-460, 2016.
- SCHUBERT, M.L.; MAKHLOUF, G.M. Gastrin secretion induced by distention is mediated by gastric cholinergic and vasoactive intestinal peptide neurons in rats. **Gastroenterol**, v. 104, n. 3, p. 834-839, 1993.
- SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterol**, v. 134, p. 1842 – 1860, 2008.
- SHUCHUN, Ma et al. Experimental study on role of phospholipid in gastric mucous barrier. **Acad. J. Second Mil. Med. Univ.**, p. 04, 1996.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal biochem**, v. 25, p. 192-205, 1968.
- SENOL, A., IŞLER, M., KARAHAN, A. G., KILIC, G. B., KULEAŞAN, H., GÖREN, I.; SARITAŞ, U.; KAYA, S.; CIRIŞ, M.; AKTÜRK, O.; ARIDOĞAN, B.C.; DEMIRIN, H.; CAKMAKÇI, L.M. Effect of probiotics on aspirin-induced gastric mucosal lesions. **Turk J gastroenterol**, v. 22, n. 1, p. 18-26, 2011b.
- SENOL, A.; ISLER, M.; KARAHAN, A. G.; KILIC, G. B.; KULEASAN, H., KAYA, S.; KESKIN, M.; GOREN, I.; SARITAS, U.; ARIDOGAN, B.C.; DELIBAS, N. Preventive effect of probiotics and α -tocopherol on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **J medic food**, v. 14, n. 1-2, p. 173-179, 2011a.
- SHAH, V., LYFORD, G., GORES, G., FARRUGIA, G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterol**, v. 126, n. 3, p. 903-913, 2004.
- SHAN, X.; AW, Tak Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol therap**, v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990.
- SHAY, M.; KAMAROV, S.A., FELS, D., MERANZE, D., GRUENSTEIN, H., & SIPLER, H. (1945). A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rats. **Gastroenterol**, v. 5, p. 43–61.
- SHEEN, E; TRIADAFILOPOULOS, G. Adverse effects of long-term proton pump inhibitor therapy. **Dig dis sci**, v. 56, n. 4, p. 931-950, 2011.
- SHIBUYA, N. et al. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. **J biochem.**, v. 146, n. 5, p. 623-626, 2009.
- SHORNIKOVA, A. V.; CASAS, I. A.; ISOLAURI, E.; MYKKÄNEN, H.; VESIKARI, T. Lactobacillus reuteri as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. **J pediatric gastroenterol nut**, v. 24, n. 4, p. 399-404, 1997.

- SINHA, K.; SIL, P. C. Targeting oxidative stress and inflammation in NSAIDs induced gastropathy: A plausible therapeutic approach. **Inflam Cell Signal**, v. 2, n. 2, 2015.
- SIPPONEN, P. et al. Cumulative 10-year risk of symptomatic duodenal and gastric ulcer in patients with or without chronic gastritis: a clinical follow-up study of 454 outpatients. **Scand j gastroenterol**, v. 25, n. 10, p. 966-973, 1990.
- SIRAKI, A. G. et al. Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes. **Free Radic Biol Med**, v. 32, n. 1, p. 2-10, 2002.
- SMITH, V. C. et al. Cellular expression of the neurokinin 1 receptor in the human antrum. **J Auton Nerv Syst**, v. 79, n. 2, p. 165-172, 2000.
- SMITS, M.M., et al. Gastrointestinal actions of GLP-1 based therapies: glycaemic control beyond the pancreas. **Diabetes Obes Metab.**, v.18, n. 224–235, 2016.
- SOSTRES, C. et al. Peptic ulcer bleeding risk. The role of Helicobacter pylori infection in NSAID/low-dose aspirin users. **Am j gastroenterol**, v. 110, n. 5, p. 684-689, 2015.
- SOUZA, L. K. M., NICOLAU, L. A., SOUSA, N. A., ARAÚJO, T. S., SOUSA, F. B. M., COSTA, D. S., SOUZA, F.M., PACÍFICO, D.M., MARTINS, C.S., SILVA, R.O., SOUZA, M.H.L.P., CERQUEIRA, G.S., MEDEIROS, J.V.R. Diminazene acetate, an angiotensin-converting enzyme II activator, prevents gastric mucosal damage in mice: Role of the angiotensin-(1–7)/Mas receptor axis. **Biochem pharmacol**, v.112, p. 50-59, 2016.
- SPRINGER, J.; FISCHER, A. Substance P-induced pulmonary vascular remodelling in precision cut lung slices. **Eur. Respir. J.** v. 22, p. 596–601, 2003.
- STADTMAN, E.R.; LEVINE, R. L. Protein oxidation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 899, n. 1, p. 191-208, 2000.
- STARLINGER, M. et al. The relative importance of HCO₃⁻ and blood flow in the protection of rat gastric mucosa during shock. **Gastroenterol**, v. 81, n. 4, p. 732-735, 1981.
- STERMER, E. Alcohol consumption and the gastrointestinal tract, **Isr. Med. Assoc. J.**, v. 4, n. 3, p. 200-202, 2002.
- STERNINI, C. et al. Cellular sites of expression of the neurokinin-1 receptor in the rat gastrointestinal tract. **J Comp Neurol**, v. 358, n. 4, p. 531-540, 1995.
- STROFF, T. et al. Protection by gastrin in the rat stomach involves afferent neurons, calcitonin gene-related peptide, and nitric oxide. **Gastroenterol**, v. 109, n. 1, p. 89-97, 1995.
- SUN H., et al. Effect of exogenous hydrogen sulfide on gastric acid secretion. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 31, p. 1280–1283, 2016.
- SUO, H.; ZHAO, X.; QIAN, Y.; SUN, P.; ZHU, K.; LI, J.; SUN, B. *Lactobacillus fermentum* Suo attenuates HCl/Ethanol induced gastric injury in mice through its antioxidant effects. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 155, 2016. <https://doi.org/10.3390/nu8030155>.
- SZABÓ, C.; OHSHIMA, H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. **Nitric oxide**, v. 1, n. 5, p. 373-385, 1997.

SZAJEWSKA, H.; URBAŃSKA, M.; CHMIELEWSKA, A.; WEIZMAN, Z.; SHAMIR, R. Meta-analysis: *Lactobacillus reuteri* strain DSM 17938 (and the original strain ATCC 55730) for treating acute gastroenteritis in children. **Benef microb**, v. 5, n. 3, p. 285-293, 2014.

SZOLCSANYI, J.; BARTHO, L. Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. **J Physiol Paris**, v. 95, n. 1, p. 181-188, 2001.

TAKAFUMI, I. et al. Stimulation of mucus glycoprotein biosynthesis in rat gastric mucosa by gastrin. **Biochem pharmacol**, v. 46, n. 9, p. 1551-1557, 1993.

TAKEUCHI, K. et al. Facilitation by endogenous prostaglandins of capsaicin-induced gastric protection in rodents through EP2 and IP receptors. **J Pharmacol Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 3, p. 1055-1062, 2003.

TAKEUCHI, K. Gastric cytoprotection by prostaglandin E2 and prostacyclin: relationship to EP1 and IP receptors. **J Physiol Pharmacol**, v. 65, n. 1, p. 3-14, 2014.

TAKEUCHI, K.; ENDOH, T., HAYASHI, S., AIHARA, T. Activation of Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtype 4 Is Essential for Cholinergic Stimulation of Gastric Acid Secretion: Relation to D Cell/Somatostatin. **Front pharmacol**, v.7, 2016.

TAKEUSHI, K.; OKADA, M.; NIIDA, H.; OKABE, S. Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. **J Pharmacol Exp Therap**, v. 248, n. 2, p. 836-841, 1989.

TALARICO T, L., CASAS, I.A.; CHUNG, T.C.; DOBROGOSZI, W. J. *Production and Isolation of Reuterin, a Growth Inhibitor Produced by Lactobacillus reuteri*. **Antimicro agents chemother**, v. 32, n. 12, p. 1854-1858, 1988.

TAMBOLI, F. A.; MORE, H. N. Evaluation of antiulcer and antioxidant activity of *Barleria gibsoni* Dalz. leaves. **Pharmacog Res**, v. 8, n. 4, p. 226, 2016.

TANG, H.B. et al. Phosphorylation of TRPV1 by neurokinin-1 receptor agonist exaggerates the capsaicin-mediated substance P release from cultured rat dorsal root ganglion neurons. **Neuropharmacol**, v. 55, n. 8, p. 1405-1411, 2008.

TANI, S. et al. Mechanisms of gastric mucus secretion from cultured rat gastric epithelial cells induced by carbachol, cholecystokinin octapeptide, secretin, and prostaglandin E2. **Biol Pharm Bull**, v. 25, n. 1, p. 14-18, 2002.

TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; K JONES, M. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. **Cur pharmaceutical design**, v. 19, n. 1, p. 126-132, 2013.

TARNAWSKI, A.S.; AHLUWALIA, A.; JONES, M.K. The mechanisms of gastric mucosal injury: focus on microvascular endothelium as a key target. **Curr Med Chem.**, v. 19, n. 1:4–15, 2012.

TERANO, A. et al. Role of superoxide and hydroxyl radicals in rat gastric mucosal injury induced by ethanol. **J Gastroenterol**, v. 24, n. 5, p. 488-493, 1989.

THOMAS, C. M.; SAULNIER, D.; SPINLER, J. K.; HEMARAJATA, P.; GAO, C.; JONES, S. E. et al. FolC2-mediated folate metabolism contributes to suppression

of inflammation by probiotic *Lactobacillus reuteri*. **Microbiol Open**, v. 5, n. 5, p. 802-818, 2016.

THORUP, C. et al. Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 277, n. 6, p. F882-F889, 1999.

TREVISANI, M. et al. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. **Nature neurosci**, v. 5, n. 6, p. 546, 2002.

TRIPATHI S., et al. The gastrin and cholecystokinin receptors mediated signaling network: a scaffold for data analysis and new hypotheses on regulatory mechanisms. **BMC Syst Biol.**, v. 9, p. 40, 2015.

TSANG, C. K. et al. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. **Nature communications**, v. 5, p. 3446, 2014.

TYTGAT, G. N. J. Ulcers and gastritis. **Endoscopy**, v. 32, n. 02, p. 108 -117, 2000.

SHEEBA, M. S.; PHILIP, S.; TOM, G.; GAYATHRI, L. T.; ASHA, V. V. Comparative evaluation of the efficacy of *Cardiospermum halicacabum* Linn. on Indomethacin, Pylorus ligation and Helicobacter pylori induced gastric ulcer in rats. **Ann Phytomed.**, v. 5, n. 1, p. 63-72, 2016.

HARBISON, S.P.; DEMPSEY, D.T. Peptic ulcer disease. **Cur probl surg**, v. 42, n. 6, p. 346-454, 2005.

UCHIDA, M.; KURAKAZU, K. Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716 exerts gastroprotective action against acute gastric lesion and antral ulcer in rats. **J pharmacol sci**, v. 96, n. 1, p. 84-90, 2004.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal biochem**, v. 86, n. 1, p. 271-278, 1978.

URDACI, M.C. et al. Tu2027 Probiotic Bacillus subtilis attenuate inflammation in a rat model of arthritis through modulation of intestinal microbiota. **Gastroenterol**, v. 150, n. 4, p. S1009, 2016.

VALEUR, N.; ENGEL, P.; CARBAJAL, N.; CONNOLLY, E.; LADEFOGED, K. Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. **App Environm Microbiol**, v. 70, n. 2, p. 1176-1181, 2004.

VALNES, K. et al. Specific and Nonspecific Humoral Defense Factors-in the Epithelium of Normal and Inflamed Gastric Mucosa. **Gastroenterology**, v. 86, n. 3, p. 402-412, 1984.

VIGNA, S.R. et al. Substance P receptors on canine chief cells: localization, characterization, and function. **J Neuroscience**, v. 9, n. 8, p. 2878-2886, 1989.

VUYYURU, L.; SCHUBERT, M.L. Histamine, acting via H3 receptors, inhibits somatostatin and stimulates acid secretion in isolated mouse stomach. **Gastroenterol.**, v. 113, p. 1545–1552, 1997.

- WAGNERBERGER, S., SPRUSS, A., KANURI, G., STAHL, C., SCHRÖDER, M., VETTER, W. *Lactobacillus casei* Shirota protects from fructose-induced liver steatosis: a mouse model. **J Nutr Biochem**, v. 24, n.3, p.531-538, 2013.
- WALDUM, H. L. et al. Gastrin-histamine sequence in the regulation of gastric acid secretion. **Gut**, v. 32, n. 6, p. 698, 1991.
- WALDUM, H.L.; KLEVELAND, P.M.; FOSSMARK, R. Upper gastrointestinal physiology and diseases. **Scand J Gastroenterol** v. 50, p.649–656, 2015.
- WALLACE, J. L.; WHITTLE, B. JR. Role of prostanoids in the protective actions of BW755C on the gastric mucosa. **Eur J pharmacol**, v. 115, n. 1, p. 45-52, 1985.
- WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself?. **Physiol rev.**, v. 88, n. 4, p. 1547-1565, 2008.
- WALSHAM, A.D.S. et al. *Lactobacillus reuteri* inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to human intestinal epithelium. **Front microbiol**, v. 7, 2016.
- WALT, R.P. et al. Continuous intravenous famotidine for haemorrhage from peptic ulcer. **The Lancet**, v. 340, n. 8827, p. 1058-1062, 1992.
- WANG, J. et al. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. **The ISME journal**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2015.
- WANKE, M.; SZAJEWSKA, H. Lack of an effect of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in preventing nosocomial diarrhea in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J pediat**, v. 161, n. 1, p. 40-43, 2012.
- WARZECHA, Z.; DEMBINSKI, A.; CERANOWICZ, P.; DEMBINSKI, M.; CIESZKOWSKI, J.; KOWNACKI, P.; KONTUREK, P. C. Role of sensory nerves in gastroprotective effect of anandamide in rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 62, n. 2, p. 207, 2011.
- WEIGERT, N. et al. Role of vagal fibers and bombesin/gastrin-releasing peptide-neurons in distention-induced gastrin release in rats. **Regulatory peptides**, v. 69, n. 1, p. 33-40, 1997.
- WEINBERG, F. et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. **Proc Natl Acad Sci**, v. 107, n. 19, p. 8788-8793, 2010.
- WHO. Global Status Report on Alcohol and Health-2014 ed. Geneva: World Health Organization; 2014. Disponível em: www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/. Acessado em agosto de 2016.
- WILLET, S.G.; MILLS, J. C. Stomach organ and cell lineage differentiation: from embryogenesis to adult homeostasis. **CMGH**, v. 2, n. 5, p. 546-559, 2016.
- WINTERBOURN, C.C.; METODIEWA, D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 3, p. 322-328, 1999.
- YANDRAPU, H.i; SAROSIEK, J. Protective factors of the gastric and duodenal mucosa: an overview. **Cur gastroenterol rep.**, v. 17, n. 6, p. 1-8, 2015.

YEOMANS, N.D. et al. A comparison of omeprazole with ranitidine for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. **New England J Med**, v. 338, n. 11, p. 719-726, 1998.

YOKOTANI, K.; FUJIWARA, M. Effects of substance P on cholinergically stimulated gastric acid secretion and mucosal blood flow in rats. **J Pharmacol Exper Therap**, v. 232, n. 3, p. 826-830, 1985.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.**, v. 3, p. 80-89, 2006.

ZAKI, M.; et al. Amylin, released from the gastric fundus, stimulates somatostatin and thus inhibits histamine and acid secretion in mice. **Gastroenterology**, v. 123, n. 1, p. 247-255, 2002.

ZHAO, Z.; GONG, S.; WANG, S.; MA, C. Effect and mechanism of evodiamine against ethanol-induced gastric ulcer in mice by suppressing Rho/NF- κ B pathway. **Internat immunopharmacol**, v. 28, n. 1, p. 588-595, 2015.

ZYGMUNT, P. M.; PETERSSON, J.; ANDERSSON, D. A.; CHUANG, H. H.; SØRGÅRD, M., DI MARZO, V. et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, v.400, p.452-7, 1999.

ANEXO

Carta de aprovação do comitê de étic



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da suplementação com *Lactobacillus reuteri* DSM 17 938 na lesão gástrica induzida por etanol: Investigação do envolvimento dos receptores vanilóides tipo 1 (TRPV1) e da via da substância P", registrada nº 292/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. JAND VENES ROLIM MEDEIROS do Departamento de Farmacologia_Campus Ministro Reis Veloso/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **05/05/2017**.

Finalidade -	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Agosto/ 2017 à Julho/ 2018
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo isogênico/ swiss
Nº de Animais	150
Peso/ Idade	20-30 g/ 1 mês
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério de Manutenção de Animais Destinados a Experimentação do Departamento de Morfofisiologia Veterinária-CCA/UFPI.

Teresina, 05 de Maio de 2017.


Prof. Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora