

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DE GASTROCITOPROTEÇÃO, MECANISMO
DE AÇÃO E COMPARAÇÃO DO EFEITO DA VITAMINA E
(α -TOCOFEROL) NAS FORMAS NATURAL E SINTÉTICA**

Bianca Barbosa Gregorio

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, para obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Botucatu - SP
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DE GASTROCITOPROTEÇÃO, MECANISMO
DE AÇÃO E COMPARAÇÃO DO EFEITO DA VITAMINA E
(α -TOCOFEROL) NAS FORMAS NATURAL E SINTÉTICA**

Bianca Barbosa Gregorio

Orientador: Cláudia Helena Pellizzon

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu, para obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Botucatu - SP
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO

DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Gregório, Bianca Barbosa.

Avaliação de gastrocitoproteção, mecanismo de ação e comparação do efeito da vitamina E (α -Tocoferol) nas formas natural e sintética / Bianca Barbosa Gregório. - Botucatu [s.n], 2010.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010
Orientador: Cláudia Helena Pellizzon

1. Vitamina E - Efeitos fisiológicos

Palavras-chave: α -Tocoferol; Citoproteção; Estômago; Etanol; Úlcera gástrica

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer por estar fazendo um dia de sol lá fora e eu ter conseguido terminar essa monografia sem ter cometido nenhum crime, enlouquecido ou qualquer coisa do tipo. Brincadeira, eu gostei de poder realizar um trabalho como esse e vê-lo terminado. Dá um orgulho, sabe? Eu que fiz!

Mas não fiz sozinha, definitivamente. Muita gente esteve envolvida direta e indiretamente com ele e para todos que eu dedico esse trabalho.

Acho que os primeiros agradecimentos vão para cada criatura viva e peluda que cedeu sua vida para que nós pudéssemos entender um pouco mais o mundo que nos rodeia. Não só os 140 ratos que foram usados para produzir essas 40 páginas de trabalho, mas todos aqueles que a ciência usa cada dia. E agradecê-los por sempre serem animais tão doces e inocentes e tentarem me morder tão poucas vezes. Também dedico esse trabalho ao Nemesis e ao Hecatombe (ou Catombs) por terem sido companheiros tão bonzinhos e roubarem cartões de créditos, cigarros e pipocas de todos. Eles já foram para Disney Celestial, mas vão ficar sempre comigo. Por que quando as coisas estão difíceis e eu achava que não ia conseguir terminar, eu olhava para cada um se escondendo na maravalha e me animava: vocês não serão em vão e darei meu melhor!

Às pessoas que trabalharam comigo, como minha orientadora, Cláudia Helena Pellizzon, que me ensinou muito sobre como me virar e fazer as coisas acontecerem e pode ter certeza que isso eu aprendi: autonomia e opinião. Não é todo orientador que faz isso pela gente! Ao Alexandre, Kita, meu irmão oriental, que me ensinou, aprendeu, passou sábados e domingos fazendo experimentos, ficou com medo do corredor da Fisio de noite, brigou comigo e bem... esteve comigo em todos os momentos! Sem ele, nada disso teria sido feito e se tivesse, não teria a mínima graça. Esse trabalho também é seu, japonês! Ao Jean, Monje, meu companheiro de todas as horas (mesmo), obrigada pelo apoio moral, técnico e pelo café... ah, o café! À Ariane, Sponja, por ser veterana de laboratório e me ensinar como tudo funciona e pelas fofocas sempre quentinhas! A todos do Departamento de Fisiologia que me ensinaram e me deixaram trabalhar em seus experimentos, mesmo eu sendo uma “estagnaria” perdida e fazendo um monte de pergunta sem nexos... pena que eu nunca aprendi a suturar um rato =/

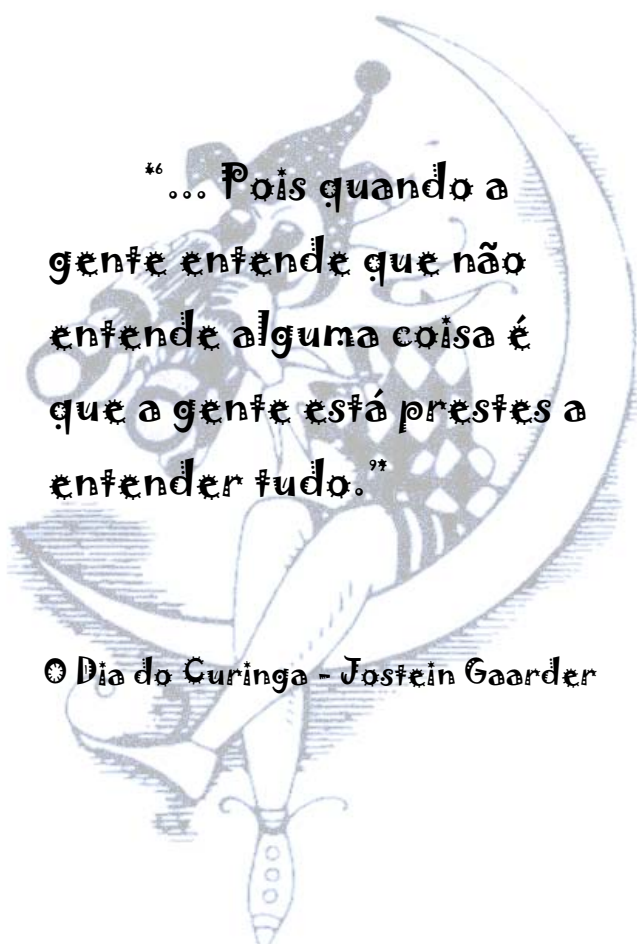
Também as pessoas que não tem nada a ver com essa vida acadêmica alucinada, mas que sem elas, como é que se faz? Meu pai e minha mãe por sempre me apoiarem, mesmo eu sendo uma universitária desempregada, perguntarem o que estava fazendo e como estavam meus ratos e não entenderem nada do que eu estava falando, por entenderem que eu não ia

poder voltar no final de semana por estar trabalhando (mas ainda trabalhando, Bianca?) e por serem os melhores pais! Ainda na família, ao meu irmão, que me agüentou surtando no Natal e me ajudou perguntando como um radical livre funcionava e por ser o grande exemplo. Também a minha avó Conceição, que não sei se poderá ler isso, mas sempre achou que eu era uma grande heroína por morar fora e estudar tanto (ah, ela sempre me via com um livro na mão...).

E não posso esquecer também dos meus amigos de São Paulo, que me animavam, me distraíam e que sentem minha falta. Eu sei que estou afastada deles, mas são as pessoas que cresceram comigo e sempre vou tê-los no meu coração. Eles sempre botaram uma fé em mim, espero não decepcioná-los.

Por fim, mas não menos importantes... meus irmãos de Botucatu. Aos que me ouviram reclamar que a vitamina E não diluía de jeito nenhum, que esperaram mais meia hora pra ir para casa porque eu tinha que trocar caixas, por serem meu apoio e minha força! E por sempre estarem lá para aquela cerveja tão precisada! Em especial para a Thalli e para o Japa, que tiveram que me ouvir *e* ouvir o Kita... rs.

Epígrafe



“... Pois quando a gente entende que não entende alguma coisa é que a gente está prestes a entender tudo.”

© Dia do Curinga - Jostein Gaarder

Resumo

O objetivo desse trabalho foi verificar se o α -tocoferol, principal substância da vitamina E, e também a com maior poder antioxidante, poderia conferir citoproteção ao estômago lesado com etanol absoluto e se sim, por quais vias. No estudo também foi realizada uma comparação entre a ação de duas formas de α -tocoferol: o d-l- α -tocoferol, a forma sintética da substância e o d- α -tocoferol, sua forma natural. Para isso foram realizados três experimentos, todos tendo o etanol absoluto como agente lesivo, mas variando a dose e o período em que os animais, ratos Wistar machos, recebiam o α -tocoferol. Nos dois primeiros experimentos, os animais recebiam as duas formas de α -tocoferol uma hora antes do agente lesivo e no terceiro experimento, receberam por uma semana. Também foram realizados testes imunistoquímicos do último experimento a fim de se verificar possíveis mecanismos de ação envolvendo o óxido nítrico e a ciclooxigenase 2. Foram obtidos resultados de citoproteção satisfatórios quando as duas formas de α -tocoferol foram administradas aos animais durante uma semana, via oral, sendo efetivos na dose de 100 mg/kg para a forma sintética e na dose de 150 mg/kg na forma natural. Apesar disso, não houve diferença estatisticamente significativa do efeito entre as duas formas testadas do α -tocoferol. Os ensaios imunistoquímicos mostraram aumento tanto do óxido nítrico quanto da ciclooxigenase 2 em relação ao controle negativo, Tween 80, mas não houve correlação entre esse aumento e a diminuição da área lesada. Dos resultados obtidos podemos então chegar as seguintes conclusões: o α -tocoferol confere gastrocitoproteção em determinadas doses, mas não parece haver um efeito quanto maior a dose, maior o efeito; essa citoproteção não se dá através do óxido nítrico nem pela ciclooxigenase 2; a forma natural e a forma sintética não diferem em seus efeitos. Tendo em vista essas conclusões, demais estudos devem ser realizados, visando a determinação de uma dose mais eficaz e também o entendimento do mecanismo de ação do α -tocoferol na citoproteção gástrica.

Palavras-chaves: α -tocoferol, estômago, úlcera gástrica, citoproteção, óxido nítrico, antioxidante, ciclooxigenase 2, etanol, imunistoquímica.

Resume

The aim of this study was to verify if α -tocopherol, the main substance of Vitamin E and also the one with the major antioxidant propriety, could offer citoprotection to a stomach damaged by alcohol. There are many forms of α -tocopherol, two forms of them were evaluated; d-l- α -tocopherol, the synthetic form and d- α -tocopherol, the natural form of α -tocopherol. Three experiments were made, all of them having absolute ethanol as the lesion agent, but the period and the doses changed in each of them. In the first two experiments, each group of animals received a different form of α -tocopherol and in the third experiment, they've received α -tocopherol p.o. for the period of seven days before the lesion agent was administrated. Moreover, immunohistochemistry assays were made from the stomachs samples of the third experiment to verify possible mechanisms involving nitric oxide and 2-cyclooxygenase. Satisfactory results of citoprotection have been obtained when the two forms were administered in the period of one week at doses of 100 mg/kg for synthetic form and 150 mg/kg for natural type. Nevertheless, the two forms didn't differ statistically in their effectiveness against ethanol. The immunohistochemistry assays showed an increase of the levels of NO and COX2 in relation with the negative control, although there was no correlation between this increase and the gastroprotective effect. In conclusion, α -tocopherol has gastroprotection effect in some doses, but apparently there is no such a thing like the better the dose, the better the effect; that citoprotection don't have a relationship with NO neither with COX2; the natural and the synthetic form don't differ in their gastroprotection effect. More studies must be done looking forward an effective dose and also to understand the mechanisms underlay the citoprotection of α -tocopherol in the stomach.

Key-Words: α -tocopherol, stomach, gastric ulcer, citoprotection, nitric oxide, antioxidant, 2-ciclooxygenase, ethanol, immunohistochemistry.

Lista de Ilustrações

Figura 1	5
Figura 2	8
Figura 3	12
Figura 4	13
Figura 5	14
Figura 6	16
Figura 7	16
Figura 8	17
Figura 9	18
Figura 10	18
Figura 11	19
Figura 12	20
Figura 13	20
Figura 14	21
Figura 15	22
Figura 16	24

Lista de Tabelas

Tabela 1	22
Tabela 2	23

Lista de Siglas e Abreviaturas

- AINES – Anti-inflamatório não-esteroidais.
- Carb – Carbenoxonolona 100 mg/kg
- COX2 – Ciclooxigenase dois
- H. pylori – Helicobacter pylori
- NO – Óxido Nítrico
- PGs - prostaglandinas
- PPIs- Inibidores de Bomba Protônica
- TN 100 - α -Tocoferol Natural 100 mg/kg
- TN 150 - α -Tocoferol Natural 150 mg/kg
- TN 200 - α -Tocoferol Natural 200 mg/kg
- TS 100 – α -Tocoferol Sintético 100 mg/kg
- TS 150 – α -Tocoferol Sintético 150 mg/kg
- TS 200 – α -Tocoferol Sintético 200 mg/kg
- TS1 150 - α -Tocoferol Sintético 150 mg/kg Medicinal®
- TS1 200 - α -Tocoferol Sintético 200 mg/kg Medicinal®
- TS2 150 - α -Tocoferol Sintético 150 mg/kg Ache®
- TS2 200 - α -Tocoferol Sintético 200 mg/kg Ache®
- TW/ TWEEN – Tween 80 a 1%

Sumário

Introdução.....	1
O estômago saudável.....	1
A úlcera gástrica.....	2
Fatores Protetores vs Fatores Agressores	3
O Etanol como Agente Lesivo	5
Tratamentos Disponíveis	6
Vitamina E	7
Atuação no Organismo	8
Vitamina E e Úlcera Gástrica	9
Objetivo.....	10
Material e Métodos	11
Animais.....	11
Substâncias.....	11
Modelos Experimentais	11
Indução de úlcera por etanol absoluto	11
Citoproteção Crônica da Vitamina E	12
Análises imunistoquímicas de NO e COX ₂	14
Análise Estatística.....	15
Resultados	16
Indução de úlcera por etanol absoluto (1).....	16
Indução de úlcera por etanol absoluto (2).....	17
Citoproteção da Vitamina E.....	19
Ensaio imunistoquímico	21
Óxido Nítrico (No).....	21
Ciclooxigenase 2 (COX ₂).....	23
Discussão.....	24
Conclusão	26
Referências	27

Introdução

O estômago saudável

O estômago é a parte mais dilatada do canal alimentar e está situado entre o esôfago e o intestino delgado. Sua forma e posição se modificam de acordo com mudanças em seu interior e das vísceras que o circundam. Sua capacidade varia de 30 ml ao nascimento, aumentando para 1000 ml na puberdade e atingindo 1500 ml no adulto (Bannister, 1995).

Ele é composto por 3 áreas topográficas (fundo, corpo e antro) e 2 funcionais (oxíntica e pilórica) (Schubert & Peura, 2008). A área das glândulas oxínticas é onde se localizam as células oxínticas (do grego oxys, ácido) ou parietais e cobrem cerca de 80% do órgão (fundo e corpo). A área pilórica é composta pelas células G ou liberadoras de gastrina e ocupam a área do antro (Schubert & Peura, 2008).

Quando a mucosa gástrica é normal, o muco pode prevenir a digestão da parede gástrica, mesmo que a concentração de íons hidrogênio é 3-4 milhões de vezes mais alta que no sangue. A maioria das ulcerações é causada por um enfraquecimento da habilidade protetora da mucosa provocado por aumento dos fatores agressivos. (Qu et al.,2003; Li & Tang, 2003; Qi et al., 2003; apud Fan et al.,2005).

Habilidade protetora da mucosa é um termo utilizado para descrever diversos fatores e componentes que permitem que a mucosa continue intacta apesar da frequente exposição a substâncias com uma larga faixa de temperatura, pH e osmolaridade, como também a substâncias com ação citotóxicas e produtos bacterianos capazes de produzir reações inflamatórias locais ou sistêmicas (Wallace & Granger 1996; apud Wallace, 2008). Essa barreira na mucosa é composta por células epiteliais com junções comunicantes e uma camada de muco (Kwiecień, 2002). A manutenção e reparo da mucosa são processos dinâmicos associados também à proliferação e migração de células epiteliais e tecido conjuntivo para manter/reparar a arquitetura da mucosa (Johnson, 1994 apud Ineu,2008). Outros fatores, tais como a manutenção da microcirculação e a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona peroxidase (GPx), protegem contra irritantes endógenos e exógenos do lúmen do estômago (Kwiecień et al.,2002).

A úlcera gástrica

A complexa e multifatorial patogênese das úlceras pépticas foi estudada durante décadas, e resulta de um desequilíbrio entre os fatores agressivos, como o ácido gástrico e a pepsina, e os da barreira defensiva da mucosa (Malfertheiner *et al.*, 2009).

A epidemiologia descritiva acurada da úlcera gástrica é difícil de ser realizada. A maioria delas é assintomática e o diagnóstico se apóia na radiologia ou na endoscopia. A disponibilidade desses testes varia de acordo com o sistema de saúde local e a acessibilidade desses testes aos pacientes. Assim, há uma subestimação da prevalência real da doença (Leong, 2009).

Atualmente, apesar da melhoria dos hábitos alimentares e do estilo de vida, a úlcera péptica ainda é uma preocupação (El-Moselhy *et al.*, 2009), sendo uma doença de alta incidência clínica, possuindo um índice de cura de mais de 95%, porém de recidiva com taxas de 65-80% depois de um ano e de aproximadamente 100% dentro de dois anos. Sendo assim, o tratamento e prevenção da úlcera péptica e sua recidiva continuam sendo um problema no campo médico (Fan *et al.*, 2005).

Aproximadamente 500.000 pessoas desenvolvem úlcera péptica nos Estados Unidos a cada ano (Ramakrishnan & Salinas, 2007). Por volta de 70% dos pacientes têm entre 25 e 64 anos (Sonnenberg & Everhart, 1996; apud Ramakrishnan & Salinas, 2007). O custo anual direta e indiretamente com as despesas de saúde são de aproximadamente 10 bilhões de dólares (Ramakrishnan & Salinas, 2007).

Úlceras pépticas podem ser únicas ou múltiplas (Malfertheiner, 2009). A maioria delas tem origem na curvatura menor do estômago, nas regiões antral e pré-pilórica e na primeira porção do duodeno. As gástricas geralmente são isoladas e têm menos de 2 cm de diâmetro, embora algumas vezes atinjam diâmetro de 10 cm ou mais, particularmente se estiverem localizadas na curvatura menor e em geral estão associadas à gastrite crônica, enquanto as localizadas na curvatura maior com frequência se relacionam com os danos causados por antiinflamatórios não esteróides (AINES) (Rubin & Farber, 2002).

Úlceras crônicas podem ser assintomáticas (Dew, 1987 apud Malfertheiner, 2009), mas o sintoma predominante é a dor epigástrica, que pode ser acompanhado por outros distúrbios dispépticos, tais como sensação de empachamento, inchaço, saciedade precoce e náusea (Malfertheiner, 2009). A falta de sintomas é vista, em particular, no caso de úlceras induzidas pelo uso de AINES e nelas, o sangramento de partes superiores do trato gastrointestinal ou até mesmo a ocorrência de perfuração pode ser a primeira manifestação

clínica da doença. A complicação mais frequente e severa é justamente o sangramento, que foi relatado em 50-170 pacientes em 100 000, sendo de maior risco nos pacientes com idade superior a 60 anos (Malfertheiner, 2009).

Histologicamente, uma úlcera gástrica consiste em duas estruturas principais; uma margem distinta da úlcera formada por mucosa não necrótica adjacente - o componente epitelial, e o tecido de granulação na base da úlcera - o componente de tecido conjuntivo (Tarnawski, 2005). As bordas tendem a ser nitidamente em saca-bocado, com margens salientes. A base plana é acinzentada e endurecida, podendo exibir sangue coagulado ou um vaso com erosão quando a úlcera é ativa (Rubin & Farber, 2002). Algumas vezes a úlcera penetra as camadas musculares, causando sua interrupção por tecido cicatricial após a cura. Os vasos sanguíneos nas margens frequentemente estão trombosados e a mucosa nas margens, em geral, é hiperplásica e com a cicatrização cresce sobre a área ulcerada como uma camada única de epitélio (Rubin & Farber, 2002).

Fatores Protetores vs Fatores Agressores

A contribuição de diversas substâncias, além das prostaglandinas, para auxiliar na resistência do estômago perante injúrias tem sido estudada. Entre elas estão mediadores gasosos (óxido nítrico e sulfídio de hidrogênio), neuropeptídeos (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - CGRP) (Wallace, 2008), hormônios como melatonina e gastrina, poliaminas, proteínas do estresse e metaloproteinases de matriz (Musumba, 2009).

As prostaglandinas (PG) medeiam muitos componentes da defesa da mucosa gastrointestinal, incluindo a secreção de muco e bicarbonato, o fluxo sanguíneo, a renovação de células epiteliais e funções imunocíticas da mucosa. No estômago saudável, a maior parte das PGs produzidas é derivada da ciclooxigenase (COX) 1. Entretanto, a atividade da COX-2 pode ser rapidamente induzida no estômago em resposta a agressões súbitas, incluindo a administração de aspirina ou um curto período de isquemia. Nessas circunstâncias, as PGs derivadas da COX-2 têm importante contribuição para a defesa e facilitação do reparo de úlceras pré-existentes no estômago (Wallace, 2008).

A liberação local de vasodilatadores como o óxido nítrico tem papel essencial na manutenção da integridade da mucosa gástrica (Gyires, 2005). O óxido nítrico (NO) é uma molécula livremente difundida e exerce seu papel biológico no músculo liso vascular por estimular a guanilil ciclase e a consequente formação do monofosfato de guanosina cíclico (GMP) (Kiss, 2001 apud Gyires, 2005) que leva à vasodilatação (Gyires, 2005). A formação

de NO a partir da L-arginina é catalisada pela enzima NO sintetase (NOS), que pode ser dividida em duas classes distintas: a classe constitutiva (cNOS) e a classe induzida (iNOS) (Gyires, 2005). O óxido nítrico demonstrou participar da regulação da microcirculação da mucosa gástrica tanto em situações de repouso quanto nas situações onde há estímulo (Gyires, 2005). Além disso, participa também em processos de motilidade gástrica e na secreção de ácido e muco (Desai et al.,1992; Brown et al.,1993; Pique et al.,1992) antiulcerogênicos, como por exemplo a carbenoxolona (Dembinska-Kiec, 1991 apud Gyires, 2005), sucralfato (Konturek, 1992 apud Gyires, 2005) e antiácidos que contêm alumínio (Konturek, 1992 apud Gyires, 2005).

A peroxidação lipídica (LPO), resultado da reação de radicais livres e ácidos poliinsaturados, foi sugerida como um fator agressor para a mucosa gástrica (Guo et al., 2005; apud Olaleye et al., 2007), dando início a uma série de eventos que causam distúrbio entre os fatores agressivos e defensivos da mucosa, levando a consequente ulceração gástrica (El-Moselhy et al.,2009). Os radicais livres também demonstraram estar associados com lesões gástricas induzidas por etanol, choque hemorrágico, privação alimentar e estresse em animais experimentais (Hung et al., 2000).

Os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ROS) são átomos ou grupos de átomos que têm ao menos um elétron desemparelhado, o que os torna altamente reativos, promovendo uma oxidação benéfica que produz energia e elimina invasores bacterianos. Em excesso, porém, produzem uma oxidação prejudicial que pode danificar membranas e conteúdos celulares (Barrett, 2008). Isso é evidenciado pelo aumento do estresse oxidativo por fatores pró-ulcerativos, como a bactéria *H. pylori*, o uso de anti-inflamatórios não-estereoidais (AINES), o tabagismo, o estresse psicológico, a utilização de corticosteróides e também a falta de sono (Olaleye et al.,2007). Como consequência de sua extrema reatividade química, os ROS têm potencial para causar diversas mudanças severas a nível celular que podem culminar em morte celular. Molecularmente, podem atacar constituintes essenciais da célula, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, levando a perda das funções biológicas e a formação de compostos tóxicos (Kaharaman et al., 2003 apud Ineu et al.,2008).

Neutrófilos produzem radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que pertencem ao grupo dos ROS. Esse ânion superóxido reage com lipídios de membrana e levam a peroxidação lipídica, que é metabolizada pelo malonaldeído (MDA). Os organismos têm muito sistemas enzimáticos que remove os ROS e previnem sua ação destrutiva. A mais importante dessas enzimas antioxidativas é a superóxido dismutase (SOD) (Brzozowski, 2001 apud Kwiecień, 2002). Essa enzima catalisa a dismutação do radical superóxido para uma forma menos lesiva, o

peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, posteriormente, é degradado pela catalase ou glutathiona peroxidase (GPx). A catalase é uma enzima que acelera a degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Halliwell, 1990 apud Kwiecień, 2002). O segundo caminho do metabolismo do peróxido de hidrogênio depende da atividade da glutathiona peroxidase e cooperação da glutathiona redutase. A redução do peróxido de hidrogênio em água pela GPx é acompanhada da conversão da glutathiona de sua forma reduzida (GSH) para sua forma oxidada (GSSG)(Kwiecień, 2002). O processo é esquematizado na figura 1.

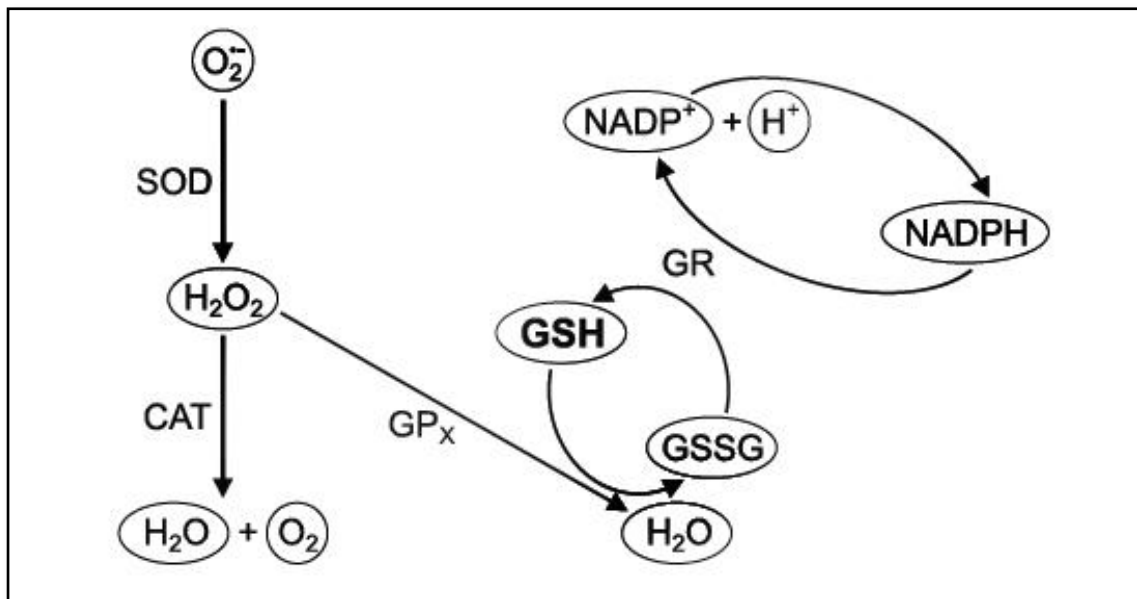


Figura 1 - - SOD – Superóxido Dismutase; CAT – Catalase; GP_x – Glutathiona Peroxidase; GSH – Glutathiona; GSSG – Glutathiona Oxidada; NADP - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (Kwiecień, 2002).

O Etanol como Agente Lesivo

A ingestão de etanol pode ocasionar gastrite aguda com alterações endoscópicas representadas por hiperemia, edema, erosões, petéquias e exsudatos purulentos, que retornam ao normal em, aproximadamente, oito dias. O exame histológico mostra, principalmente, hemorragia supepitelial focal, infiltrado de polimorfonucleares, com perda variável de epitélio e infiltração da lâmina própria por eosinófilos (Mincis et al.,1995).

A formação de lesões na mucosa gástrica causadas pelo álcool envolve alguns mecanismos que reduzem o fluxo sanguíneo gástrico, contribuindo para o desenvolvimento de hemorragia e necrose. Em adição, o etanol também promove a solubilização dos constituintes do muco, diminui a diferença de potencial na mucosa por provocar aumento no influxo de Na^+ e K^+ para o lúmen e a secreção de pepsina, além de aumentar os íons H^+ e a histamina (Meyre-Silva et al.,2009).

Atualmente há um consenso de que os primeiros efeitos deletérios provocados pelo etanol na mucosa gástrica são consequência do aumento da peroxidação lipídica e diminuição dos níveis de glutathione (GSH) (Rodríguez et al.,2008). Kwiecień (2002) demonstrou que as lesões na mucosa gástrica após exposição a etanol absoluto, levaram ao aumento de parâmetros inflamatórios, como aumento de IL-1 β e TNF α , e a geração de radicais livres que resultou em peroxidação lipídica, expressa pelo aumento de MDA nos tecidos, além de diminuição dos níveis celulares de prostaglandinas (Zhao et al.,2009). Esses fenômenos foram acompanhados pela quebra das propriedades antioxidantes da célula, demonstrados pela diminuição da atividade da SOD na mucosa gástrica. O envolvimento de radicais livres em lesões gástricas induzidas pelo etanol foi confirmado em cultura de células de mucosa (Nordmann et al., 1992 apud Rodríguez et al.,2008).

Tratamentos Disponíveis

O tratamento médico atual da úlcera péptica é geralmente baseado na inibição da secreção do ácido gástrico por antagonistas de receptores H₂, inibidores de bomba, antimuscarínicos, assim como uma terapia ácido-independente usando sulfacrato entre outros (Chan & Leung, 2002 apud Meyre-Silva *et al.*,2009).

Sir James Black, ganhador do prêmio Nobel de 1972 pela descoberta dos antagonistas de receptores 2A de histamina, abriu novos caminhos para o entendimento da secreção ácida e mudou a prática da gastroenterologia para sempre. Pela primeira vez, o ácido clorídrico podia ser inibido e as úlceras curadas. (Schubert & Peura, 2008).

Mais recentemente, a identificação da bomba de prótons (H/K ATPase) da célula parietal e a infecção por *Helicobacter pylori* como sendo as causas principais das úlceras gástricas e duodenais, descoberta também ganhadora do Nobel, encabeçou uma segunda revolução no entendimento e tratamento de desordens ácido pépticas. Não só as úlceras pépticas podiam ser curadas mais rapidamente com os PPIs, mas úlceras refratárias também desapareceram. A erradicação da *H. pylori* com antibióticos também ofereceu, pela primeira vez, uma cura permanente para a maioria das úlceras (Schubert & Peura ,2008).

Como a prevalência de infecção pela bactéria diminuiu devido a melhoras em medidas sanitárias e nos esforços para a erradicação do microorganismo, a prevalência de úlceras induzidas por AINES e também as úlceras *H. pylori* negativas têm aumentado e ganhado uma grande importância clínica. Entretanto, a maioria dessas drogas, apesar de drogas seguras e eficientes como citado anteriormente, têm sido reavaliados por causa de seus efeitos adversos,

relacionados com hipergastrinemia, hipersecreção de ácido por efeito rebote, malabsorção, infecções, hipersensibilidade, arritmia, impotência, ginecomastia e mudanças hematopoiéticas e interação com outras drogas (Schubert & Peura, 2008, Meyre-Silva *et al.*, 2009). Por isso, é necessário desenvolver agentes contra úlcera mais eficazes e menos tóxicos.

Vitamina E

A vitamina E foi descoberta em 1922 nos vegetais de folhas verdes por Herbert Evans e Katherine Bishop, pesquisadores da Universidade da Califórnia. Em 1924, Sure a nomeou de *Vitamina E* pois contribuía pra fertilidade e foi cientificamente chamada de *Tocoferol*, que vem da palavra grega *tokos*, que significa nascimento, *phero*, transportar, e o sufixo *ol* foi adicionado para indicar as propriedades de álcool que essa molécula tem. Em 1936 foi descoberto que a vitamina E era abundante no óleo de gérmen de trigo. Em 1938, Fehholz elucidou sua estrutura química e no mesmo ano, Karrer sintetizou o dl- α -tocoferol. O Conselho Nacional de Pesquisa dos EUA patrocinou estudos sobre a deficiência de vitamina E e, baseado neles, consideraram-na um nutriente lipofílico com funções antioxidantes e essencial, pois o corpo humano não é capaz de produzi-lo, tendo que ser obtido através da dieta. Atualmente, *vitamina E* é um termo genérico para todos os tocoferóis e seus derivados tendo a atividade biológica do RRR- α -tocoferol, o estereoisômero naturalmente presente e ativo (Sen, *et al.*, 2006).

Óleos vegetais são a fonte primária de vitamina E nas dietas ocidentais e a quantidade de tocoferóis e tocotrienóis varia bastante; o óleo de milho e o de soja contêm grandes quantidades de γ -tocoferol e na verdade, há apenas 7% a 15% de α -tocoferol na vitamina E desses óleos. Em comparação, o α -tocoferol é o predominante nos óleos de oliva, canola e girassol. Frutas e vegetais são fonte de mais de 20% da vitamina E da dieta americana (Murphy *et al.*, 1990 apud Rock *et al.*, 1996). Outras fontes incluem os cereais, ovos, nozes e manteiga de amendoim (Sheppard *et al.*, 1993 apud Rock *et al.*, 1996).

O termo vitamina E é utilizado para uma família de oito moléculas (tocoferóis e tocotrienóis) com estruturas semelhantes. Os quatro tocoferóis consistem em um anel cromanol com diferentes padrões de substituição de grupos metil na posição 5, 7 e 8. Tocoferóis têm três centros quirais nos carbonos 2, 49 e 89 e os isômeros de ocorrência natural possuem a configuração R nas três posições (Schneider, 2005).

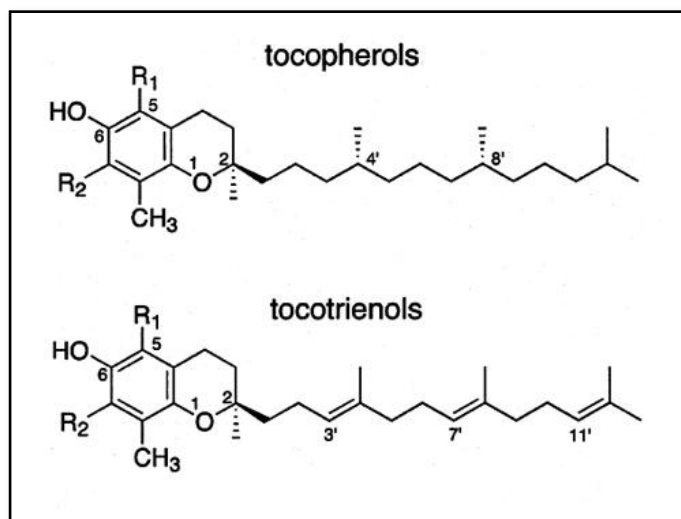


Figura 2 - Estrutura Química do Tocoferol e Tocotrienol (Schneider, 2005)

Todas as formas de tocoferol possuem atividade antioxidante, porém o α -tocoferol é a forma química e biologicamente mais ativa. As outras formas de ocorrência natural da vitamina E (β -, γ -, δ - e os outros tocotrienóis) não contribuem tanto com os efeitos da vitamina E pois, apesar de absorvidos, não são convertidos em α -tocoferol pelo corpo humano e são pouco reconhecidos pela proteína transportadora de α -tocoferol (α -TTP) no fígado (Schneider, 2005).

O α -tocoferol é praticamente insolúvel em soluções aquosas, mas livremente solúvel em óleos, acetona, etanol, éter e outros solventes orgânicos (Schneider, 2005), como o Tween 80 (Polysorbate 80), veículo utilizado em algumas pesquisas envolvendo o α -tocoferol (Valcheva-Kuzmanova et al., 2007; Ohta et al., 2006; Campos et al., 2005).

Atuação no Organismo

A vitamina E é considerada um importante antioxidante, prevenindo o dano tissular causado pelos radicais livres, principalmente em lipídios insaturados. A ação antioxidante é dita como sendo de um removedor de radicais ativos de oxigênio, como do oxigênio singlete. Seu segundo modo de ação é subsidiário ao seu papel como antioxidante nas membranas e é o de estabilizar a sua estrutura, formando complexos com moléculas desestabilizadoras, então prevenindo a desregulação do balanço anfipático dentro da estrutura (Wang & Quinn, 1999).

A reação antioxidante do α -tocoferol não ocorre diretamente com o oxigênio. A base do sistema oxidante não é a remoção do oxigênio em si, mas a interrupção do processo em cadeia de autooxidação que é perpetuado pelo ácido graxo. O α -tocoferol reage com os radicais peroxil dos ácidos graxos, o produto primário da lipoperoxidação, interrompendo a reação em

cadeia (Schneider,2005). O que torna o α -tocoferol o antioxidante lipossolúvel mais poderoso conhecido é o fato de:

- Reage com o radical peroxil extremamente rápido, impedindo-o de entrar em outras reações (Schneider,2005);
- Retira o radical principal do ácido graxo que está sendo oxidado e previne que ele seja oxidado novamente (Schneider,2005);
- Na reação antioxidante, o α -tocoferol se torna um radical pouco estável. Sob circunstâncias normais, ele só reagirá com outro radical (um radical tocoferoxil ou um radical peroxil de um ácido graxo) para formar uma forma estável, não- radical (Schneider,2005).

Apesar da síndrome associada com a falta de vitamina E na dieta de animais ser conhecida há muitos anos, o modo de ação e a localização do tocoferol nas várias membranas celulares ainda não estão totalmente esclarecidos. Essa deficiência pode levar a anormalidades neuromusculares, caracterizadas por ataxia espinocerebelar e miopatias (Brigelius-Flohe & Traber, 1999). Diversas teorias foram propostas para explicar as manifestações fisiológicas e bioquímicas da deficiência de vitamina E, incluindo um papel na regulação da biossíntese do grupo heme e indiretamente na regulação da atividade de proteínas que o contém; ação como modulador da resposta imune e na regulação genética, como protetor de proteínas que contêm selênio e como participante em cadeias transportadoras de elétrons (Wang & Quinn, 1999).

Além do papel antioxidante conhecido, a literatura descreve outros papéis: o papel da vitamina E na sinalização celular, especialmente em relação à proteína quinase C é descrita por Azzi *et al.*, 1998). O α -tocoferol inibe a proliferação de músculo liso, diminui a atividade da proteína quinase C (Boscoboinik *et al.*,1991; apud Sen *et al.*,2006) e da 5-lipoxigenase (Sen *et al.*,2006). A suplementação com vitamina E também protege contra certo número de distúrbios tais como a aterosclerose, diferentes tipos de tumores e doença isquêmica do coração (Azzi *et al.*,2002).

Vitamina E e Úlcera Gástrica

Yoshikawa *et al.*,(1991) reportaram que, tanto a diminuição no nível da vitamina E na mucosa gástrica assim como um aumento na peroxidação lipídica ocorrem durante o desenvolvimento de lesões pelo método de isquemia-reperfusão em ratos e que a severidade dessas úlceras induzidas foi maior nos animais com deficiência de vitamina E. Naito *et al.*,(1999) demonstraram que em ratos com depleção de óxido nítrico, a vitamina E tem

importante papel protetor contra úlceras induzidas por isquemia-reperfusão e também demonstrou que o efeito citoprotetor dela não é apenas por suas propriedades antioxidantes, mas por suas ações inibitórias sobre a infiltração neutrofílica na mucosa gástrica (Ohta *et al.*,2006).

Além de seu reconhecido papel antioxidante, a vitamina E também desempenha papel de moduladora de enzimas envolvidas em transdução de sinais, como a óxido nítrico sintetase (NOS). Em células microgлияis primárias de murinos, o α -, γ - e δ -tocoferol promoveram a liberação de óxido nítrico (Sacha *et al.*,2008). O tocoferol também teve efeito de aumentar a atividade da NOS em plaquetas e células endoteliais (Heller *et al.*,2004 apud Sacha *et al.*,2008).

A vitamina E inibe a agregação plaquetária, oxidação de LDL, adesão de monócitos nas células endoteliais, expressão endotelial de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias (Diaz *et al.*,1997; Munteanu *et al.*,2004; Kaul *et al.*,2001; Wu *et al.*,1999 apud Wu *et al.*,2005). Parte desse efeito pode estar envolvido com a modulação de prostanóides como a PGE₂, e já se demonstrou alteração no metabolismo de ácido araquidônico pela vitamina E, efeito esse dependente do local e do tipo de célula (Wu *et al.*,2005).

Muitos estudos relacionaram a vitamina E com a úlcera gástrica e tentaram explicar seus efeitos, tanto por seu efeito antioxidante quanto por suas outras propriedades. Suzuki *et al.*,(1998) compararam o efeito do α -tocoferol com outras substância com poderosa atividade antioxidante em modelo de álcool + HCl, obtendo resultados satisfatórios de inibição na formação de lesão em doses relativamente baixas (8mg/kg e 16 mg/kg). Odabasoglu *et al.*,(2008) testaram o α -tocoferol em comparação com outros óleos vegetais frente a desafio com AINE (indometacina), obtendo resultados significativos, com inibição de 78% da área de lesão, na dose de 100 mg/kg. Esses resultados corroboram os estudo de Valcheva-Kuzmanova *et al.*,(2007), onde também foi utilizado o modelo de desafio frente a Indometacina. Foram relatados também em outros estudos aumento de muco e síntese de prostaglandinas (George *et al.*,1999) e atividade anti-secretora de ácido gástrico (Al-Moutairy & Tariq, 1996 apud Azlina *et al.*, 2005).

Objetivo

O objetivo desse trabalho é verificar se o α -tocoferol, tanto em sua forma natural (d- α -tocoferol) quando em sua forma sintética (d-l- α -tocoferol), é capaz de conferir citoproteção ao

estômago desafiado com etanol absoluto, elucidar o mecanismo de ação por qual ocorre esse efeito e se as duas formas testadas possuem efeitos diferenciados.

Material e Métodos

Animais

Para os experimentos realizados foram usados ratos Wistar machos (180g a 300g) provenientes do Biotério Central da UNESP, aclimatados às condições do biotério do Departamento de Morfologia por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12 horas) controlados. Os animais foram alimentados com ração *Labina*[®] destrusada e água *ad libitum*.

Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais submetidos e aprovados com Protocolo 02/04 IBB/UNESP pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu.

Substâncias

As substâncias testadas nos experimentos foram: acetato de tocoferol, forma sintética (dl- α -tocoferol), 400 UI/cápsula e α -tocoferol, forma natural (d- α -tocoferol), 400UI/cápsula gelatinosa, provenientes da farmácia de manipulação Pharmakos[®]; acetato de α -tocoferol, forma sintética (dl- α -tocoferol), 100mg/cápsula proveniente da farmácia de manipulação Medicinal[®] e α -tocoferol, forma sintética (dl- α -tocoferol), 400 UI/cápsula gelatina da Ache[®]; acetato de α -tocoferil, forma natural (d- α -tocoferol), 1000UI/cápsula gelatinosa, FDC[®].

Também foi utilizada Carbenoxolona, Sigma[®] e todas as substâncias foram diluídas em Tween 80 (Polisorbato 80) a 1% (Suzuki *et al.*,1998), usado também como controle negativo.

Modelos Experimentais

Indução de úlcera por etanol absoluto

O etanol é uma substância tóxica capaz de produzir alterações em vários órgãos, inclusive nos do aparelho digestivo. A ingestão de etanol pode alterar a secreção, motilidade e a permeabilidade gástricas (Mincis *et al.*,1995), sendo absorvido no estômago e duodeno. A absorção gástrica de álcool está relacionada com a atividade da álcool desidrogenase (ADH)

do estômago, ou seja, quanto maior for a atividade dessa enzima, menor será a absorção de etanol (Mincis, 1994 apud Mincis *et al.*, 1995)

O método utilizado baseia-se nas metodologias descritas por Morimoto *et al.*, (1991). Após 24 horas de jejum, os grupos experimentais foram submetidos aos respectivos tratamentos 1 hora antes da indução de lesão aguda na mucosa gástrica por etanol absoluto. Após 1 hora da administração do agente lesivo, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ou câmara de gás carbônico, seus estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura, prensados entre duas placas de vidro, escaneados e as lesões medidas com auxílio do software AVSoft BioView[®]. Os resultados são expressos em área total de lesão ulcerativa (mm²).

Citoproteção Crônica da Vitamina E

Os animais, ratos Wistar machos, foram pesados todos os dias por uma semana antes do tratamento ter início, assim como seu consumo de ração, para que se pudesse ter um controle da normalidade do comportamento dos grupos. Cada grupo, aleatoriamente, recebeu uma letra (A-E) para identificá-lo.

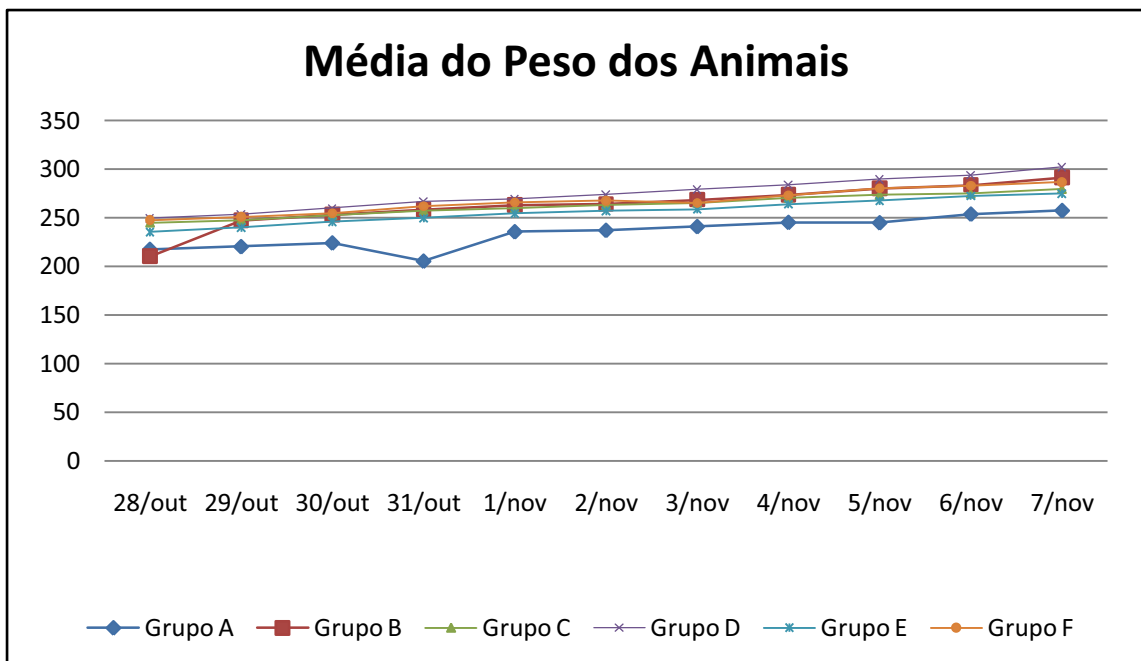


Figura 3 – O gráfico mostra o controle da média de peso dos grupos feito durante a semana que precedeu o experimento.

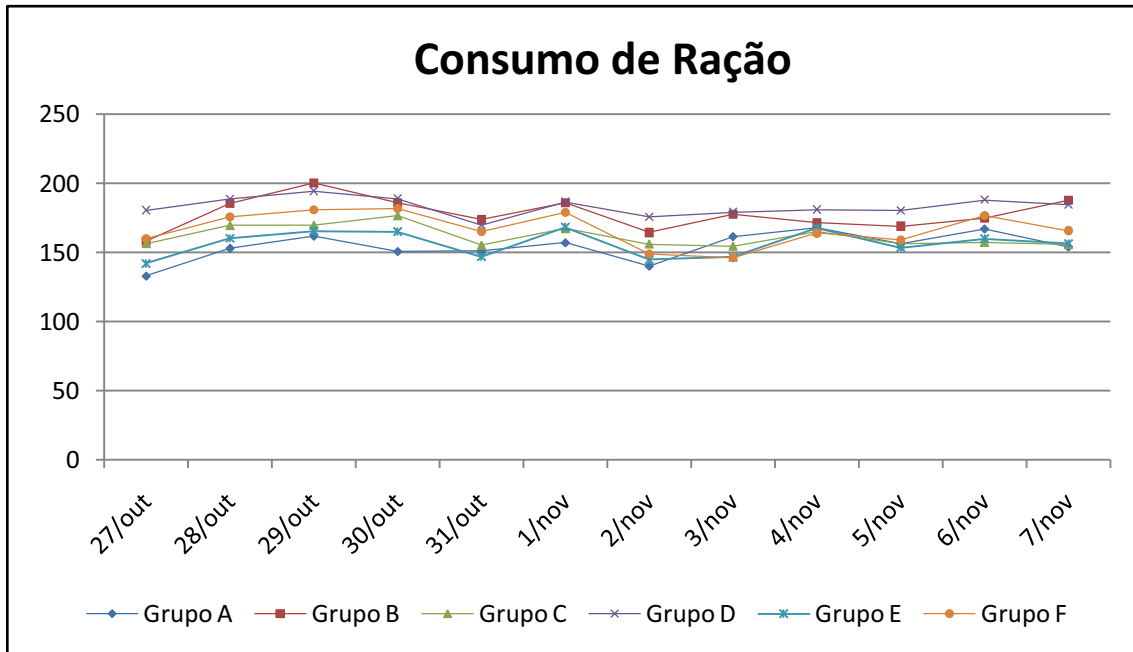


Figura 4 – O gráfico mostra o consumo médio de ração de cada grupo na semana que precedeu o experimento.

No sétimo dia, sempre por volta do mesmo horário (18 horas), os grupos receberam, aleatoriamente, cada qual um número (1-6). Cada um deles então passou a receber diariamente, durante seis dias, um tratamento (Tween 80 a 1%, tocoferol na forma sintética (Medicinal[®]) nas doses de 100 e 150 mg/kg, tocoferol na forma natural (FDC[®]) nas doses de 100 e 150 mg/kg e um grupo *sham*) via oral. Durante os seis dias de tratamento, os animais continuaram tendo seus pesos e consumo de ração controlados, para que se pudesse avaliar se a gavagem recebida diariamente não os estressava a ponto de interferir no experimento, assim como verificar se o veículo ou o tratamento podiam apresentar toxicidade e levá-los a alguma enfermidade, como demonstrado no controle indicado nas figuras (1) e (2).

Finalizada a semana de tratamento, os animais foram colocados em 20 horas de jejum. De cada grupo foi aleatoriamente retirado um animal que foi sacrificado em câmara de gás carbônico, para verificar se os animais não haviam adquirido úlceras gástricas devido ao estresse do tratamento (Hung *et al.*, 2000). Ao grupo *sham*, que recebeu apenas a gavagem durante a semana de tratamento, foi administrado o controle positivo, Carbenoxolona, uma hora antes de todos os grupos receberem 1 ml cada de etanol absoluto. Uma hora após o agente lesivo ter sido administrado, os animais foram sacrificados em câmara de gás carbônico, seus estômagos foram retirados e abertos pela curvatura maior, prensados entre duas placas de vidro, escaneados para posterior medida das áreas úlceras com auxílio do software AVSoft BioView[®] (resultados expressos em área total de lesão ulcerativa, mm²),

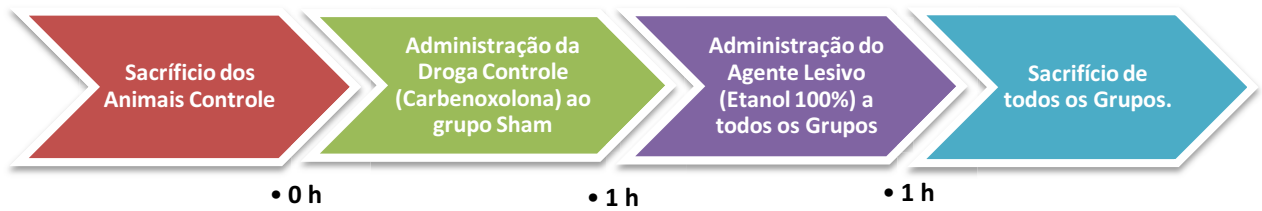


Figura 5 – Esquema da Metodologia da Citoproteção Crônica da Vitamina E

conservados em Alfac para posterior confecção de lâminas histológicas para análise imunoistoquímica.

Análises imunoistoquímicas de NO e COX₂

As prostaglandinas (PG) medeiam muitos componentes da defesa da mucosa gastrointestinal, incluindo a secreção de muco e bicarbonato, fluxo sanguíneo, a renovação de células epiteliais e funções imunocíticas da mucosa. No estômago saudável, a maior parte das PGs produzidas são derivadas da COX-1. Entretanto, a atividade da COX₂ pode ser rapidamente induzida no estômago em resposta a agressões súbitas, incluindo a administração de aspirina ou um curto período de isquemia. Nessas circunstâncias, as PGs derivadas da COX₂ têm importante contribuição para a defesa e facilitação do reparo de úlceras pré-existentes no estômago (Wallace, 2008).

O óxido nítrico demonstrou participar da regulação da microcirculação da mucosa gástrica tanto em situações de repouso quanto nas situações onde há estímulo (Gyires, 2005). Além disso, participa também em processos de motilidade gástrica e na secreção de ácido e muco (Desai *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993; Pique *et al.*, 1992). Com base nessas informações, a partir dos estômagos dos animais mais representativos dos grupos do experimento de Citoproteção da Vitamina E, foram confeccionadas lâminas para tratamento com anticorpos anti-NO e anti-COX₂, obedecendo os protocolos propostos pela Santa Cruz Biotechnology[®], fornecedora dos anticorpos. O ensaio imunoistoquímico consiste em marcar a molécula de interesse com seu anticorpo específico e ampliar seu sinal com anticorpos secundários para facilitar sua visualização.

A marcação dos parâmetros estudados será contada através do programa AVSoft BioView[®] (resultados expressos em área total marcada, mm²).

Análise Estatística

A análise estatística usada será ANOVA seguidas de pós testes como Dunnet (comparar um controle contra todos os grupos) e Tukey (comparar todos com todos), com $p < 0,05$. Toda a análise será feita com o auxílio do programa estatístico InStat 3.0.

Resultados

Indução de úlcera por etanol absoluto (1)

O experimento foi realizado segundo a metodologia de Morimoto *et al.*, 1991, e foram utilizadas as formas natural e sintética adquiridas da farmácia de manipulação Pharmakos[®], nas doses de 100, 150 e 200 mg/kg, administrado por gavagem.

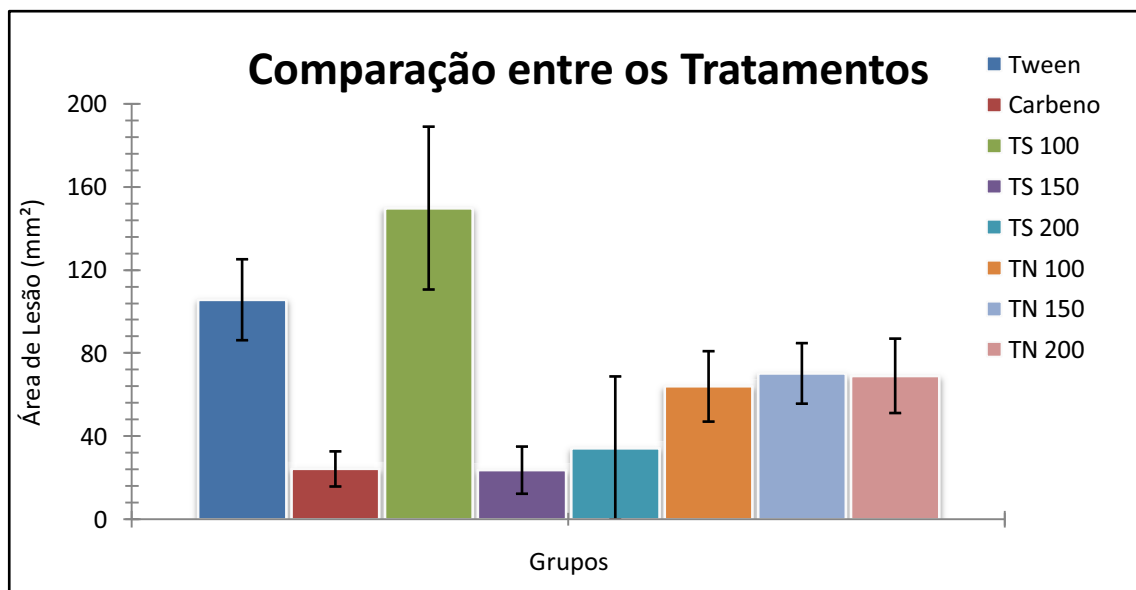


Figura 6 - Comparação entre as áreas das lesões causadas por etanol absoluto. Tween 80 a 1% (controle negativo) em comparação com o controle positivo (Carbenoxolona 100mg/kg) e as doses testadas dos tocoferóis: P=0.0057, ANOVA (F=3,328), Dunnet (p>2.714). Erro padrão na forma de barras.

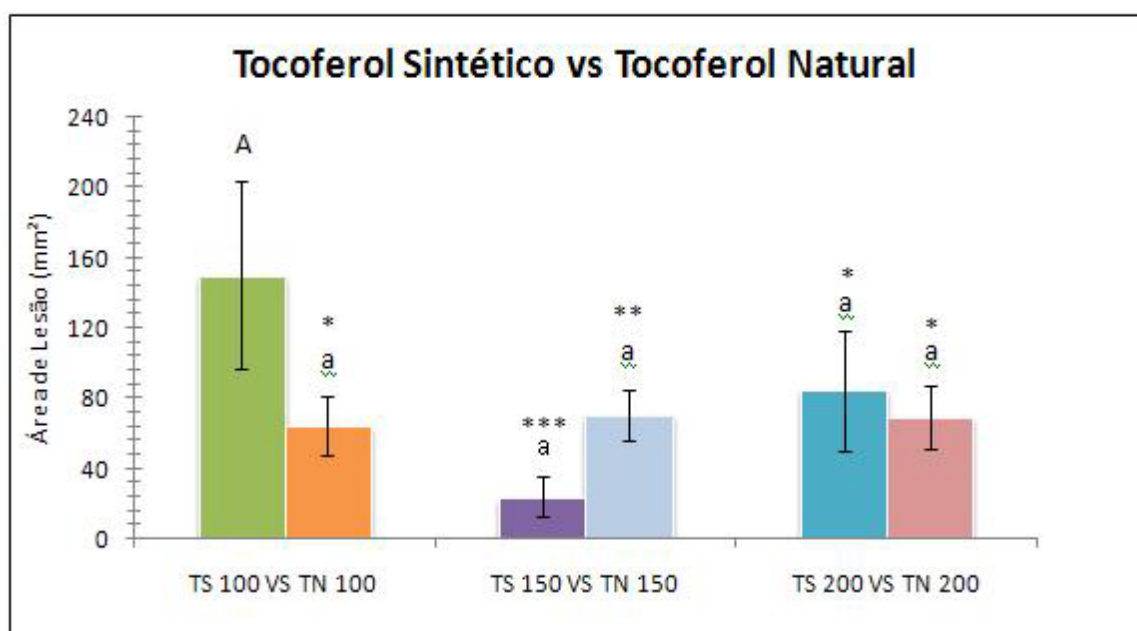


Figura 7 - Comparação da área das lesões causadas por etanol absoluto entre os grupos de tocoferóis testados. ANOVA (F = 5,094), Tukey. P= 0.0012. Letras iguais, não houve diferença significativa, letras diferentes houve diferença significativa (p<0,001 ***, p<0,01 **, p<0,05 *). A barra indica o erro padrão.

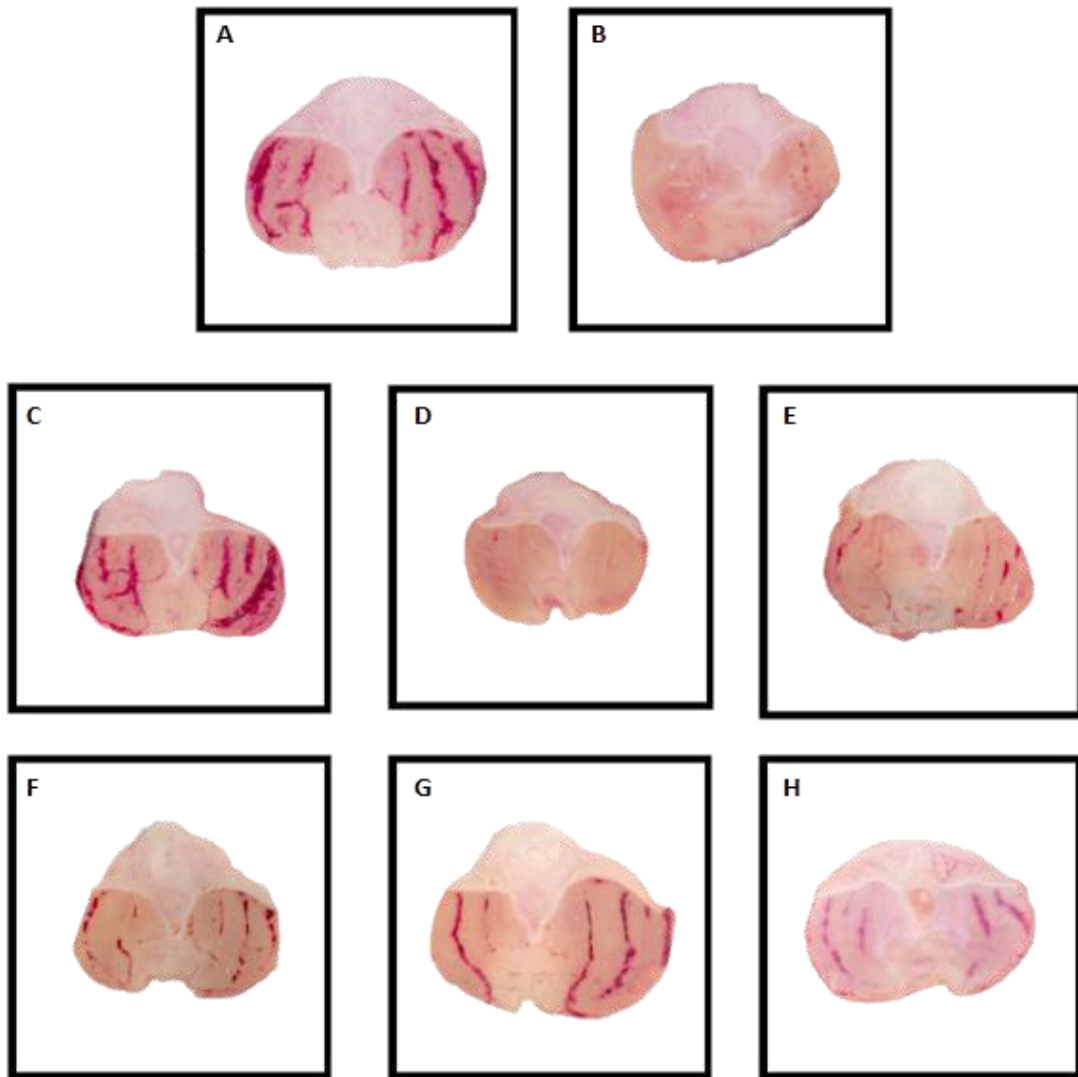


Figura 8 - Fotos representativas das lesões causadas por etanol absoluto. A- Tween ; B – Carbenoxonolona; C- TS100 (tocoferol sintético 100 mg/kg); D- TS 150 (tocoferol sintético 150 mg/kg); E- TS 200 (tocoferol sintético 200 mg/kg); F – TN 100 (tocoferol natural 100 mg/kg); G- TN 150 (tocoferol natural 150 mg/kg); H- TN 200 (tocoferol natural 200 mg/kg).

Tendo em vista os resultados obtidos, a realização de outro experimento de etanol absoluto seguindo a metodologia de Morimoto (1991) foi decidida, testando apenas a forma sintética do α -tocoferol, nas doses de 150 mg/kg e 200 mg/kg. Essas doses foram escolhidas pois foram as que demonstraram maior potencial de gastroproteção (ver Figura 6).

Indução de úlcera por etanol absoluto (2)

Baseando-se no mesmo método da indução anterior e nas doses escolhidas, foi realizado o seguinte experimento, só que com outras duas marcas de vitamina E na sua forma sintética, Medicinal® e VitaE, da Ache®, a fim de se verificar a confiabilidade das substâncias utilizadas.

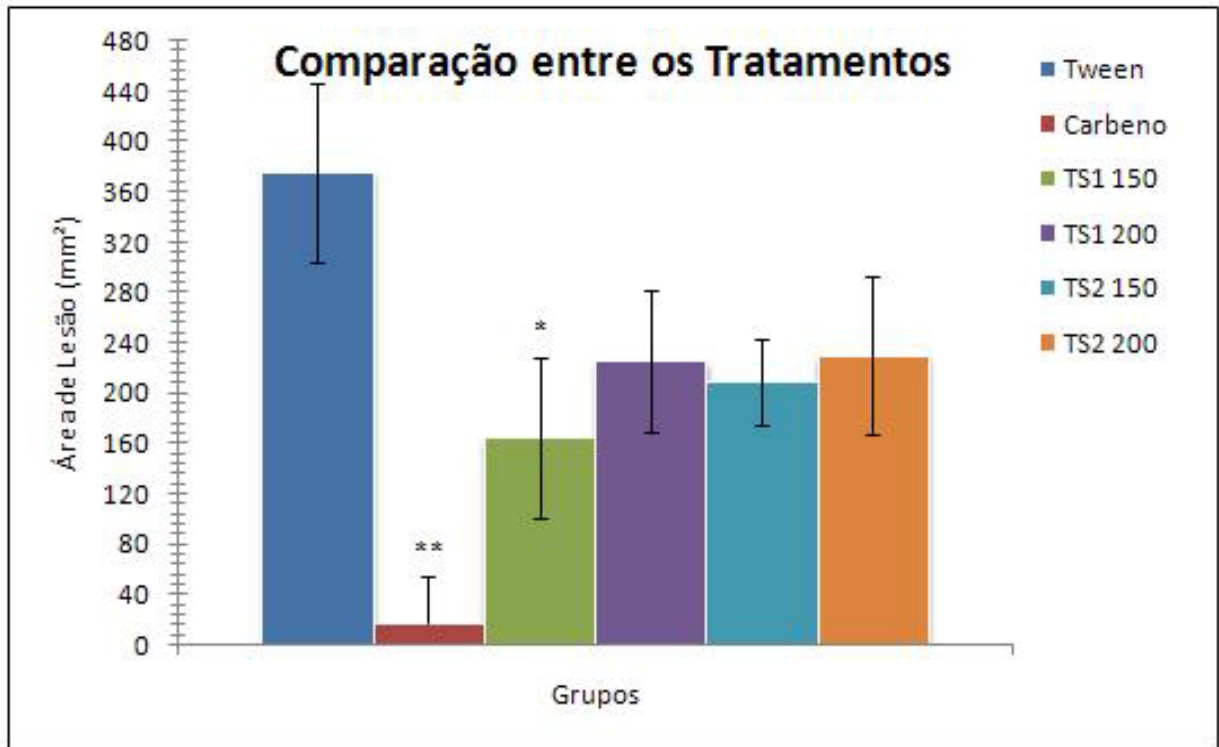


Figura 9 - Comparação entre áreas das lesões causadas por etanol absoluto. Tween 80 (controle negativo) em comparação com o controle positivo (Carbenoxolona) e as doses testadas de dois diferentes tocoferóis sintéticos. ANOVA ($F=3,847$), $p=0,0072$. Dunnett, $p>2,644$. ** $p<0,01$, * $p<0,05$. Erro padrão na forma de barras.

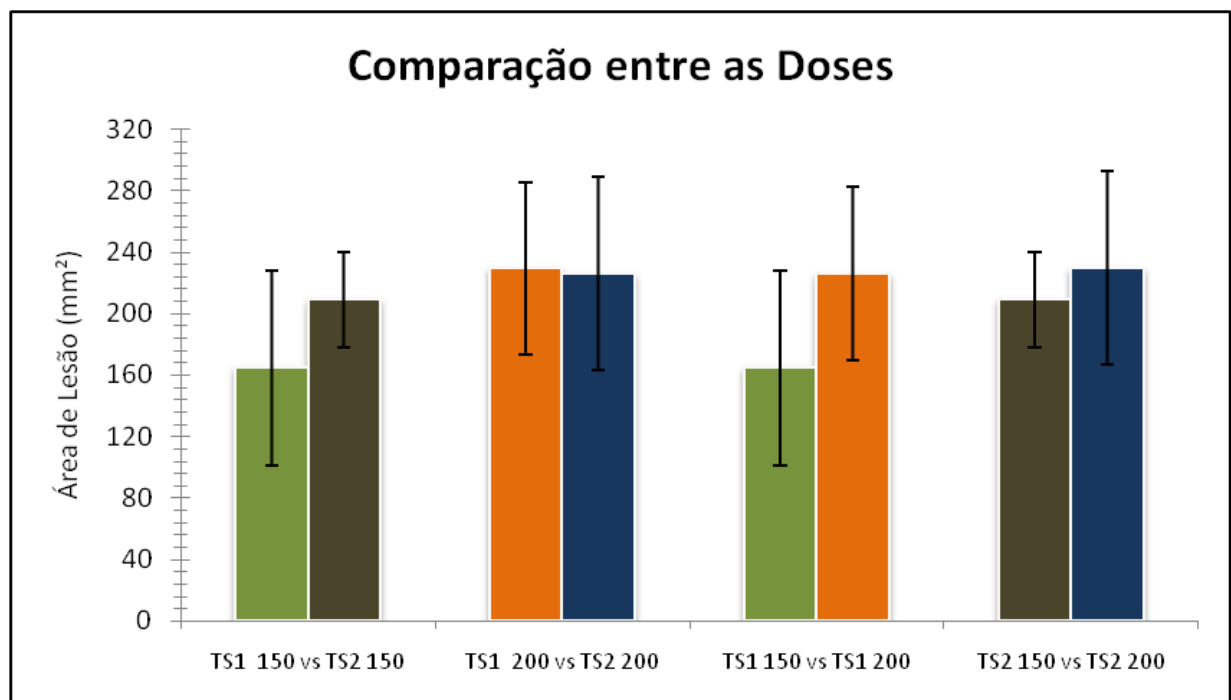


Figura 10 - Comparação das áreas de lesões causadas por etanol absoluto entre os grupos de tocoferóis testados. ANOVA ($F = 0,3036$), Tukey. $P=0,8224$, considerado não significativo, ou seja, não houve diferença estatística entre as doses testadas. A barra mostra o erro padrão.

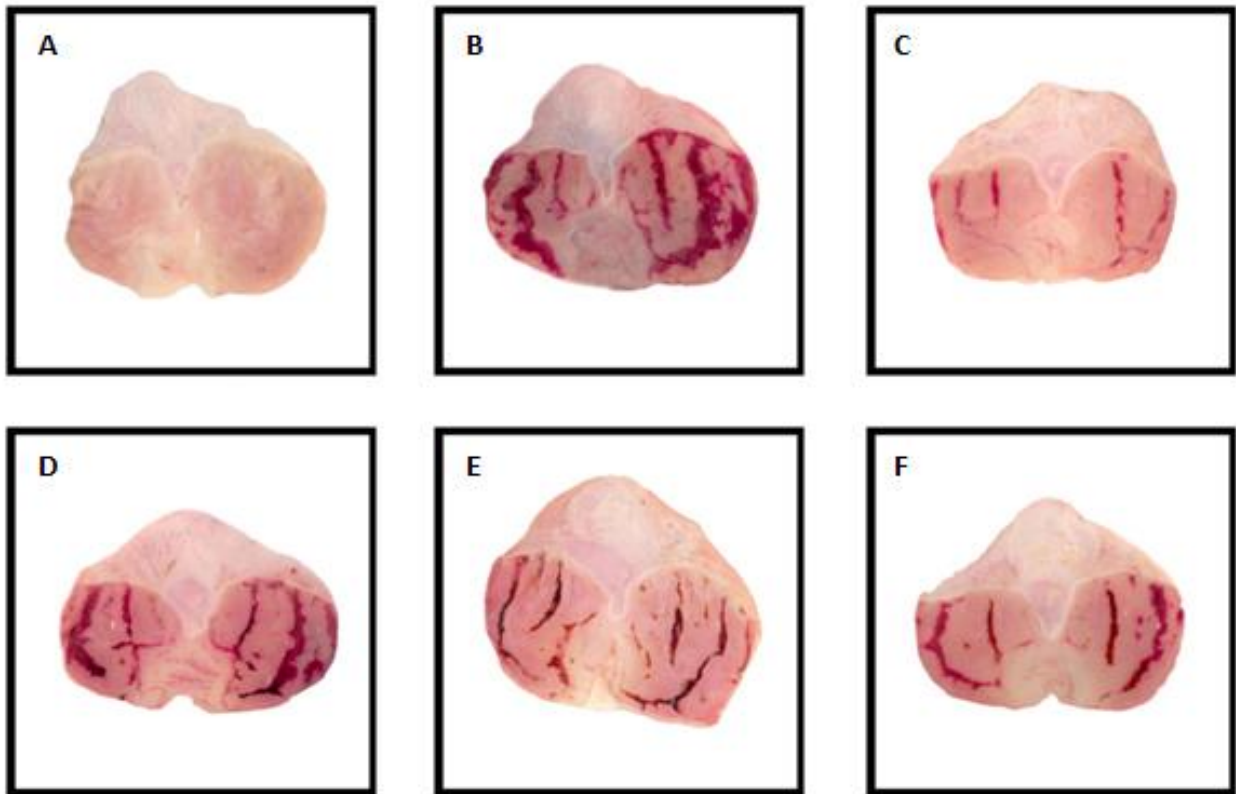


Figura 11 - Fotos representativas das lesões causadas nos estômagos dos diferentes grupos desafiados com etanol absoluto. A – Carbenoxonolona; B- Tween 80; C- TS1 150; D- TS1 200; E- TS2 150; F- TS2 200.

Nesse experimento, comparando dois tocoferóis sintéticos de marcas distintas, evidenciou-se (ver figura 10) que não houve diferença estatisticamente significativa entre seus efeitos, ou seja, não houve influência da marca em questão validando assim, a efetividade do produto. Houve também efeito gastroprotetor na dose de 150 mg/kg da vitamina E sintética da Medicinal®.

Citoproteção da Vitamina E

Tendo em mente os resultados anteriores, conhecendo sua metabolização (Kayden & Traber, 1993; Rigotti, 2007; Schneider, 2005; Galli *et al.*, 2004) e outros métodos relatados na literatura (Valcheva-Kuzmanov *et al.*, 2007; Azlina *et al.*, 2005; Jaarin *et al.*, 2002; George *et al.*, 1999; Serafini, 1999; Naito *et al.*, 1998, Wiseman *et al.*, 1993, Chan *et al.*, 1980), foi decidido, portanto, a utilização de um novo protocolo, adaptado da literatura.

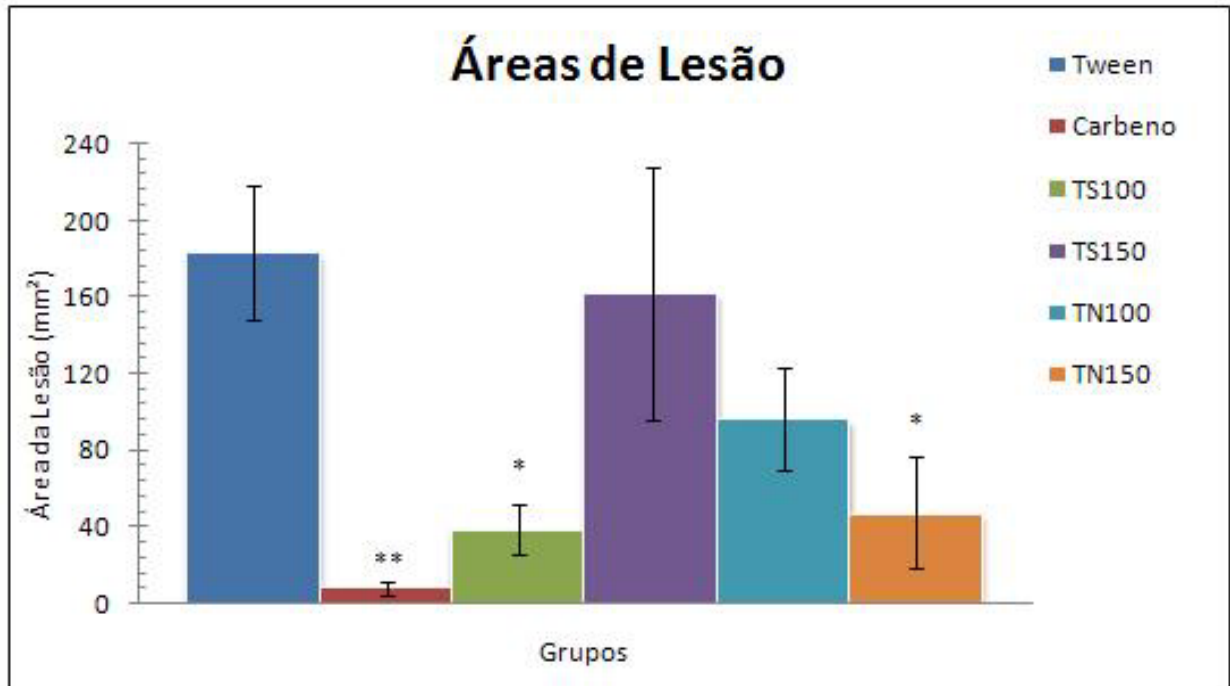


Figura 12 - Comparação entre áreas das lesões causadas por etanol absoluto. Tween 80 (controle negativo) em comparação com o controle positivo (Carbenoxolona) e as doses testadas de tocoferol natural e sintético. ANOVA (F=4.117) p=0.0077, Dunnet, p>2.700. ** p<0.01, * p<0.05, A barra mostra o erro padrão.

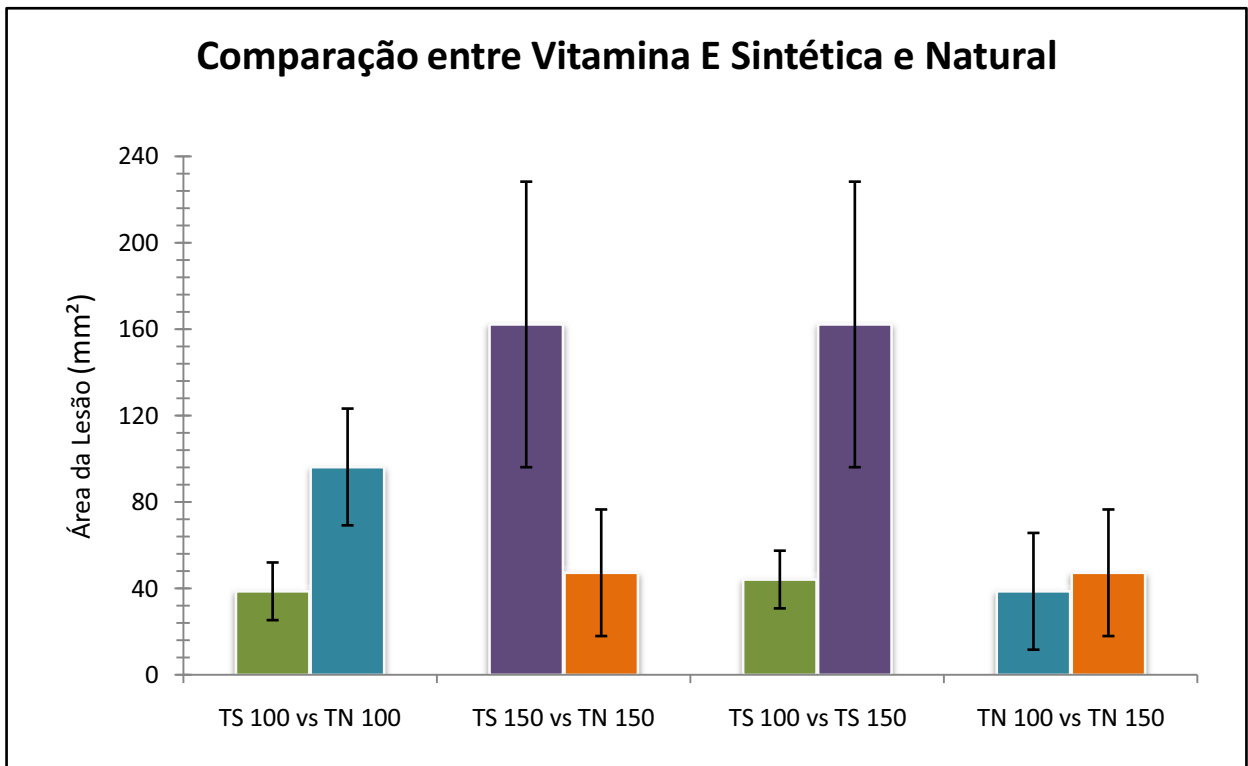


Figura 13 - Gráfico 1 - Comparação das áreas de lesões causadas por etanol absoluto entre os grupos de tocoferóis testados. ANOVA (F = 1.592), Tukey. P= 0.2227, considerado não significativo, ou seja, não houve diferença estatística entre as doses testadas. A barra mostra o erro padrão

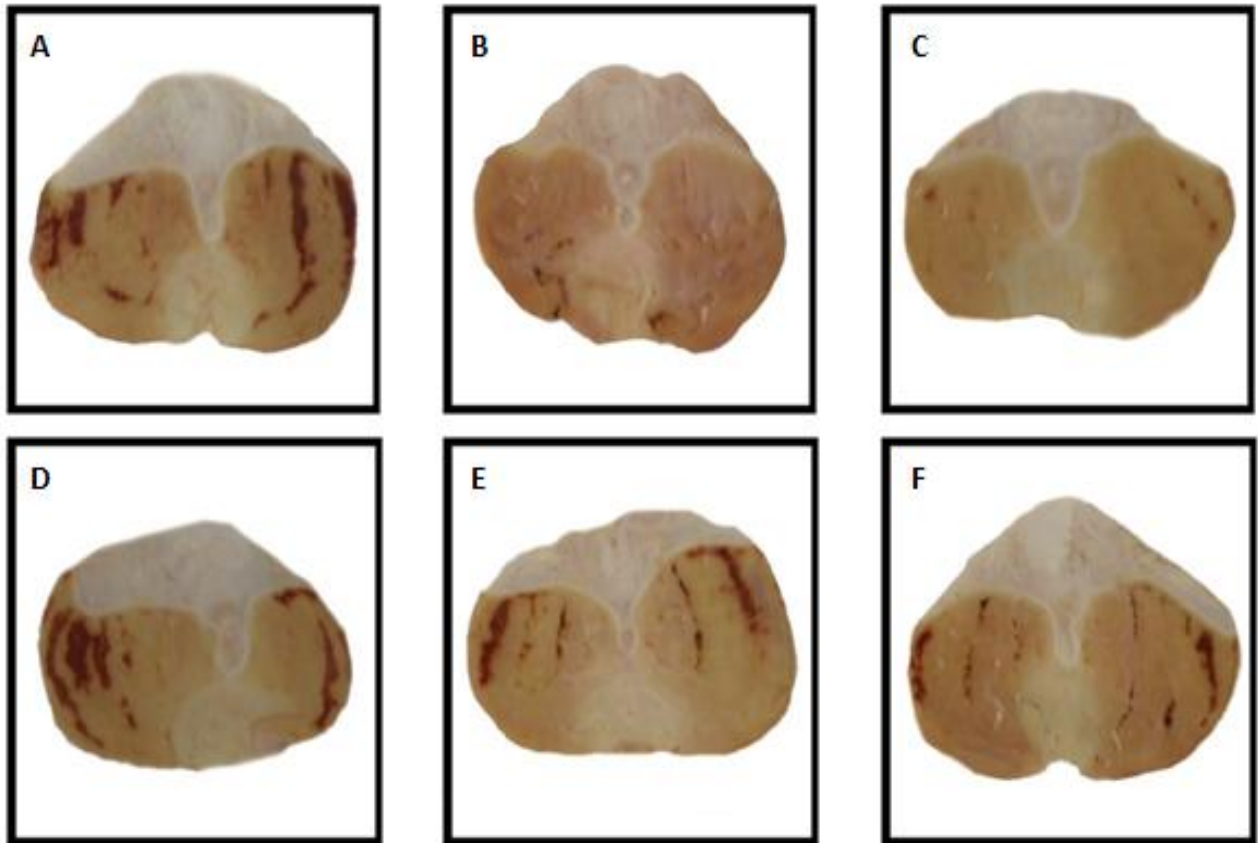


Figura 14 - Fotos representativas das lesões causadas nos estômagos dos diferentes grupos desafiados com etanol absoluto. A – Tween 80; B- Carbenoxolona; C- TS 100; D- TS 150; E- TN 100; F- TN 150.

Nesse modelo, houve efetiva gastroproteção em duas doses: a de 100 mg/kg da vitamina E sintética e da 150 mg/kg da vitamina E natural (ver figura 12), entretanto, comparando-se os dois tipos testados, não houve diferença estatisticamente significativa (ver figura 13).

Ensaio imunoistoquímico

Óxido Nítrico (No)

Como descrito na introdução deste trabalho, o óxido nítrico tem importante papel na manutenção do equilíbrio da saúde do estômago. Alguns estudos, como o de Sasha, 2008 e Naito, 1999, estudaram a possível relação existente entre a Vitamina E e essa molécula, obtendo resultados interessantes, como o possível aumento de NO pela vitamina E. Essas informações estimularam o estudo dessas relações no estômago também.

	Tween	Carbeno	TS100	TS150	TN100	TN150
Tween		ns	ns	**	ns	ns
Carbeno	ns		*	ns	***	ns
TS100	ns	*		**	ns	ns
TS150	**	ns	**		***	ns
TN100	ns	***	ns	***		*
TN150	ns	ns	ns	ns	*	

Tabela 1 - Comparação entre todos os grupos testados. Anova ($F=8.347$), $p < 0,001$. Tukey, se $q > 4.184$ então $p < 0.05$. Ns – não houve diferença estatisticamente significantes. *, $p < 0.05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0.001$.

Os resultados mostrados na tabela demonstram que houve aumento de óxido nítrico em alguns grupos testados com o tocoferol (TS150) e que houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de NO marcada entre os próprios grupos testados com tocoferol ($TS100 < 150$; $TS150 > TN100$; $TN100 < TN150$). A partir desses resultados podemos concluir que a vitamina E possui alguma ação sobre o síntese/manutenção do óxido nítrico, mas essa ação varia de acordo com a dose e tipo de tocoferol utilizado.

Apesar desses resultados, o aumento do óxido nítrico não parece estar ligado a capacidade de gerar citoproteção ao estômago. Comparando os danos das áreas lesionadas do experimento de citoproteção crônica da vitamina E com os resultados das áreas marcadas com o anticorpo anti-NO, não há relação entre os dois, fato evidenciado pela maior área lesionada ser a do grupo com maior concentração de óxido nítrico, como demonstrado na figura 15.

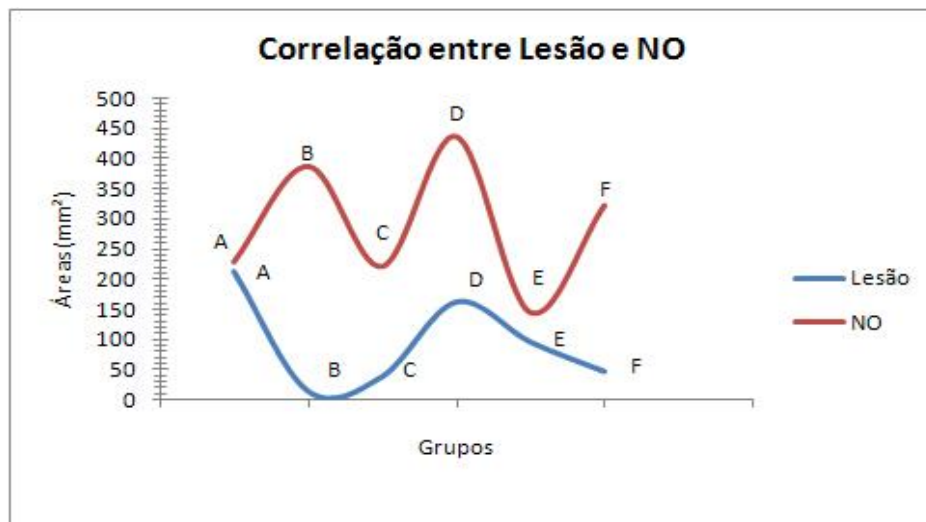


Figura 15 - Correlação entre a área lesionada e a área marcada com o anticorpo anti- CO_2 . Evidenciando a ausência de correlação. $R = 0,300431$. A- Tween; B- Carbeno; C- TS100; D – TS150; E-TN100; F-TN150

Ciclooxigenase 2 (COX₂)

As prostaglandinas possuem papel de grande importante na citoproteção gástrica, sendo derivadas da enzima ciclooxigenase, como descrito anteriormente. O tipo 2 dessa enzima é conhecido por ser estimulado em situações agressivas e inflamatórias, aumentando a síntese das PGs. A vitamina E em outros tecidos parece influenciar a síntese deste prostanóide, como descrito por George (1999), onde houve aumento significativo dessa síntese. Outros mecanismos podem estar relacionados com o aumento das prostaglandinas provocado pelo tocoferol, como mecanismos anteriores à COX, na modulação do ácido araquidônico, matéria prima do processo, como descrito em Wu *et al.* (1995).

Para a detecção da COX₂ foi utilizado o mesmo método descrito para o óxido nítrico, onde a área marcada mostrada a presença da enzima marcada com o anticorpo anti-COX₂.

	Tween	Carbeno	TS100	TS150	TN100	TN150
Tween		**	ns	ns	**	ns
Carbeno	**		*	***	***	***
TS100	ns	*		ns	***	ns
TS150	ns	***	ns		**	ns
TN100	**	***	***	**		ns
TN150	ns	***	ns	ns	ns	

Tabela 2 - Comparação entre todos os grupos testados. Anova (F= 14.962), p <0,001. Tukey, se q> 4.184 então p<0.05. Ns – não houve diferença estatisticamente significantes. *, p<0.05; **, p<0,01; ***, p<0.001.

Os resultados obtidos demonstram um aumento na COX₂ em relação ao Tween, principalmente no grupo tratado com tocoferol natural na dose de 100mg/kg, apesar do grupo da carbenoxolonola não apresentar nenhuma atividade da COX₂. Esse aumento, porém, não pareceu exercer citoproteção, pois os níveis maiores de COX₂ não se relacionam a menores áreas lesionadas como indicado na figura 16.

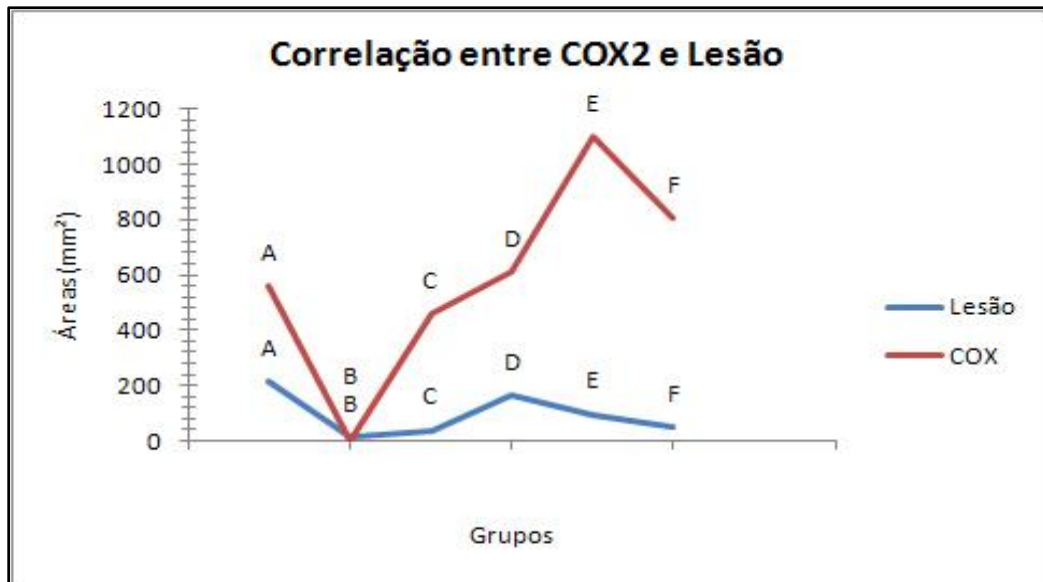


Figura 16 - Correlação entre a área lesionada e a área marcada com o anticorpo anti-COX₂. Evidenciando a ausência de correlação. R= 0,300431. A- Tween; B- Carbeno; C- TS100; D – TS150; E-TN100; F-TN150.

Discussão

A vitamina E, presente em muitos alimentos incluídos na nossa dieta, como folhas verdes, óleos vegetais e alguns grãos, é conhecida por ser um dos mais poderosos antioxidantes (Rigotti, 2007), exercendo sua função por reagir com os ácidos graxos que estão sendo atacados pelos radicais livres (Schneider, 2005). Os trabalhos de Yoshida (2008) mostram que a falta de vitamina E em ratos leva a uma aceleração do processo de lipoperoxidação, demonstrando a importância da substância em nossos sistemas antioxidantes. Vitamina E na verdade é um termo usado para definir oito tipos de moléculas, os tocoferóis e os tocotrienóis (Schneider, 2005). Dentre elas, está o α -tocoferol, que além de estar normalmente em maioria dentre os outros tocoferóis em nossa alimentação, possui ação antioxidante mais eficiente e também é melhor aproveitado por nosso organismo, pois existe uma proteína responsável por seu transporte, a α -TTP (Schneider, 2005). Alguns trabalhos demonstram que a forma natural, RRR- α -tocoferol, é melhor absorvida e apresenta maior biodisponibilidade (Traber *et al.*, 1990; Acuff *et al.*, 1994 apud Rock, 1996). O trabalho aqui apresentado, porém, não nos permite concordar com essa afirmação para a ação da vitamina E no estômago. Os resultados obtidos nos experimentos nos levam a crer que não existe diferença na ação das duas formas, sendo igualmente aproveitadas pelo corpo e com efeitos citoprotetores semelhantes.

Além da conhecida ação antioxidante, a vitamina E também demonstra estar envolvida em outros mecanismos, que poderiam exercer ação citoprotetora ao estômago perante desafios

como o do álcool, por exemplo. Algumas dessas ações estão descritas na literatura como aumentar o muco (George *et al.*, 1999) e a secreção de bicarbonato. Em outros tecidos, estudos demonstram que a vitamina E pode interferir na modulação de moléculas como as prostaglandinas (George *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2005) e segundo os estudos de Heller (2004), a vitamina E causou um aumento no NO endotelial.

Neste estudo, a vitamina E atuou como citoprotetora em duas doses diferentes nos dois tocoferóis testados, quando administrada durante um período maior de tempo do que os primeiros experimentos, onde a vitamina E era administrada apenas uma hora antes da administração por gavagem do etanol, levando a concluir que a substância precisa ser absorvida pelo sistema do organismo para então exercer sua função citoprotetora. Alguns trabalhos incluem a vitamina E na própria alimentação dos animais por longos períodos, como 28 dias (Azlina, 2005) ou até mesmo 8 semanas como no estudo de Nafeeza *et al.* (2002), antes de desafiá-los com o agente lesivo de escolha. O modelo de administração de vitamina E diária por gavagem também já foi validado, só que por um período maior do que o usado neste estudo, de duas semanas (George *et al.*, 1999).

O período escolhido para esse estudo foi de uma semana, adaptado do trabalho de George *et al.* (1999), porém nossos dados não apresentaram a mesma eficiência como os resultados descrito na literatura, sugerindo que uma semana ainda é um período curto para atingir efeitos satisfatórios. Nafeeza *et al.* (2002), sugere que o efeito protetor está envolvido com a dose e o tempo em que a vitamina E é administrada, sendo necessários grandes doses e longos tratamentos para conferir citoproteção, o contrário do que se dá se a vitamina E for usada no tratamento. Em seus trabalhos, Nafeeza *et al.* (2002) mostra que uma dose de 300 mg/mg por um período de 8 semanas é o necessário para conferir proteção, porém, foi usada para o tratamento, a dose diminuiu pela metade e a administração tem duração de 3 semanas, atingindo bons resultados. Apesar desses fatos, Jaarin *et al.* (2002) conseguiu citoproteção no modelo de lesão causada por aspirina com uma dose de 30 mg/kg de α -tocoferol, incluso na dieta dos animais por 4 semanas. Portanto, outro experimento, como citado nos resultados, com administração mais longa (>2 semanas) com outras doses, com um espectro maior (50 mg/kg, 200 mg/kg ... até 400 mg/kg) seria interessante, para que se pudesse checar se existe uma curva dose-resposta ascendente e se períodos maiores são realmente mais efetivos ou a diferença entre eles acaba se tornando irrelevante.

Quanto aos mecanismos que levam a proteção gerada, não se mostraram relacionados com aumento da enzima COX₂ ou do NO apresentados. O fato da área marcada para COX₂ no grupo do controle positivo, carbenoxonolona, ter se apresentado igual a zero pode ter ocorrido

por um erro de procedimento ou por essa droga oferecer uma camada protetora de muco ao estômago, o que levaria a sequer ativar a atividade da enzima. Outros mecanismos precisam ser estudados, como a influência no muco ou na ação anti-secretória (Al-Moutairy & Tariq, 1996 apud Azlina *et al.*, 2005) como descrita na literatura, apesar do estudo de Azlina (2005) não ser totalmente de acordo e sugerir que o tocotrienol é mais satisfatório em relação a este efeito, já que o estudo de Al-Moutairy & Tariq (1996) utilizou uma grande dose de tocoferol (300mg/kg) para conseguir efeito semelhante ao atingido com 60 mg/kg de tocotrienol do trabalho de Azlina *et al.* (2005). Sendo necessário aprofundarmos o estudo das duas moléculas com delineamentos mais específicos, usando diferentes desafios, como AINES e inibidores de NO, como o NEM. Também seria válido que fossem realizados ensaios bioquímicos. Porém, esses resultados nos levam a crer que o maior mecanismo de ação da vitamina E seja mesmo o de antioxidante, idéia apoiada em vários trabalhos como o de Suzuki *et al.* (1998) e Odabasoglu *et al.* (2008).

Conclusão

Podemos concluir, através dos resultados obtidos e dos dados existentes na literatura que o α -tocoferol confere gastrocitoproteção em determinadas doses, mas não parece haver um efeito quanto maior a dose, maior o efeito. A citoproteção não se dá através do óxido nítrico nem pela ciclooxigenase dois, apesar de ter se observado um aumento desses parâmetros. Mais estudos serão necessários envolvendo o óxido nítrico e a ciclooxigenase dois. E por fim, foi verificado que a forma natural e a forma sintética não diferem em seus efeitos em relação a citoproteção gástrica.

Referências

- AZLINA, M. F. N., NAFEEZA, M. I., KHALID B. A. K. A comparison between tocopherol and tocotrienol effects on gastric parameters in rats exposed to stress. **Asia Pac J Clin Nutr.** v. 14, n. 4, p. 358-365, 2005.
- AZZI, A., ARATRI, E., BOSCOBOINIK, D., CLEMENT, S., OZER, N. K., RICCIARELLI, R., SPYCHER, S. Molecular basis of alpha-tocopherol control of smooth muscle cell proliferation. **Biofactors**, v. 7, p. 3-14, 1998.
- AZZI, A., RICCIARELLI, R., ZINGGA, J.M. Non-antioxidant molecular functions of K-tocopherol (vitamin E). **FEBS Letters**, v.519, p. 8-10, 2002.
- BANNISTER, L. H. Alimentary System. In: WILLIAMS, P. L. **Gray's Anatomy**. Ed. 38. New York, Churchill Livingstone, 1995, n. 12, p. 1753-1760.
- BARRET, S. Antioxidants and Other Phytochemicals: Current Scientific Perspectives. Disponível em: <<http://www.quackwatch.org/03HealthPromotion/antioxidants.html>>. Acesso em: 27/01/2009.
- BRIGELIUS-FLOHE & TRABER, R. & TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 1145-1155, 1999.
- BROWN, J. F., KEATES, A. C., HANSON, P. K., WHITTLE, B. J. R. Nitric oxide generators and cAMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. **Am J Physiol**, v. 356, p. 168-174, 1993.
- CAMPO, S. C. G., MOREIRA, D. A. C., NUNES, T. A. S., P. COLEPICOLOB, BRIGAGÃO, M. R. P. L. Oxidative stress in alcohol-induced rat parotid sialadenosis. **Archives of Oral Biology**. V. 50, p. 661-668, 2005.
- CHAN, A. C., ALLEN, C. E., HEGARTY, P. V. J. The Effects of Vitamin E Depletion and Repletion on Prostaglandin Synthesis in Semitendinosus Muscle of Young Rabbits. **J. J. Nutr.** v.110, p. 66-73, 1980.
- DESAI, K. M., SESSA, W. C., VANE, J. R. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. **Nature**, v. 351, p. 477-479, 1992.
- EL-MOSELHY, M. A., ABDEL-HAMID, N. M., ABDEL-RAHEIM, S. R. Gastroprotective Effect of Nicorandil in Indomethacin and Alcohol-Induced Acute Ulcers. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 52, p. 449-459, 2009.
- FAN, T.Y., FENG, Q. Q., JIA, C. R., FAN, Q., LI, C.A., BAI, X.L. Protective effect of Weikang decoction and partial ingredients on model rat with gastric mucosa ulcer. **World Journal of Gastroenterology**, v.11, n.8, p. 1204-1209, 2005.
- GALLI, F., POLIDORI, M. C., STAHL, W., MECOCCI, P., KELLY, F. J. Vitamin E Biotransformation
- GEORGE, S., SATHIAMOORTHY, A., S.S. SATHIAMOORTHY, S. S. Effect Of Alpha Tocopherol On Gastric Ulcers Induced By pylorus Ligation In Rats. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 31, p. 431-433, 1999.
- GYIRES, K. Gastric Mucosal Protection: From Prostaglandins to Gene-Therapy. **Current Medicinal Chemistry**. v. 12, p. 203-215, 2005.
- HELLER, R., WERNER-FELMAYER, G., WERNER, E. R. α -Tocopherol and Endothelial Nitric Oxide Synthesis. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1031, p. 74-85, 2004.
- HUNG, C-R. Importance of histamine, glutathione and oxyradicals in modulating gastric haemorrhagic ulcer in septic rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.27, p. 306-312, 2000. in Humans. **Vitamins and Hormones**. v. 76, p. 263-280, 2007.
- INEU, R.P., PEREIRA, M.E, ASCHNER, M., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Diphenyl Diselenide Reverses Gastric Lesions in Rats: Involvement of Oxidative Stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 9, p. 3023-9, 2008.
- JAARIN, K., GAPOR, M.T., NAFEEZA, M.I., FAUZEE, A.M. Effect of various doses of palm vitamin E and tocopherol on aspirin-induced gastric lesions in rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 83, p. 295-301, 2002.
- KAYDEN, H. J. & TRABER, M. G. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. **Journal of Lipid Research**. v. 34, p. 343-358, 1993.
- KWIECIEN, S., BRZOZOWSKI, T., KONTUREK, S.J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY**, v. 53, n. 1, p. 39-50, 2002.
- LEONG, R. W. Differences in Peptic Ulcer Between the East and the West. **Gastroenterol Clin N Am**. v. 38, p. 363-379, 2009.
- MALFERTHEINER, P., CHAN, F. K.L., MCCOLL, K. E.L. Peptic ulcer disease. **Lancet**. v.374, p. 1449-1461, 2009.
- MEYRE-SILVA, C., PETRY, C. M., BERTÉ, T. E., BECKER, E. G., ZANATTA, F., DELLE-MONACHE, F., CECHINEL-FILHO, V., ANDRADE, S. F. Phytochemical Analyses and Gastroprotective Effects of

- Eugenia umbelliflora* (Myrtaceae) on Experimental Gastric Ulcers. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 7, p. 911-916, 2009.
- MINCIS, M. Alcohol liver disease. **São Paulo Med J.** 112:529, 1994.
- MINCIS, M., CHEBLI, J. M. F., KHOURI, S. T., MINCIS, R. Etanol e o Trato Gastrointestinal. **Arq Gastroenterol.**, v. 32, n. 3, p. 131-139, 1995.
- MORIMOTO, Y., SHIMOHARA, K., OSHIMA, S., SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 57, p. 495-505, 1991.
- MUSUMBA, C. PROTCHARD, D. M., PIRMOHAMED, M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 30, . 517-531, 2009.
- NAFEEZA, M. I., FAUZEE, A. M., KAMSIAH, J., GAPOR, M. T. Comparative effects of a tocotrienol-rich fraction and tocopherol in aspirin-induced gastric lesions in rats. **Asia Pacific J Clin Nutr.** v. 11, n. 4, p. 309-313, 2002.
- NAITO, Y., YOSHIKAWA, T., MATSUYAMA, K., YAGI, N., KASAI, K., SUGIMOYO, N., MASUI, Y., YOSHIDA, N., KONDO, M. Effect of vitamin E in gastric mucosal injury induced by ischaemia-reperfusion in nitric oxide-depleted rats. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.13, p.553-559, 1999.
- ODABASOGLU, F., HALICI, Z., CAKIR, A., HALICI, M., AYGUN, H., SULEYMAN, H., CADIRCI E., ATALAY, F. Beneficial effects of vegetable oils (corn, olive and sunflower oils) and α -tocopherol on anti-inflammatory and gastrointestinal profiles of indomethacin in rats. **European Journal of Pharmacology.** v. 591, p. 300-306, 2008.
- OHTA, Y., KOBAYASHI, T., IMAI, Y., INUI, K., YOSHINO, J., NAKAZAWA, S. Effect of Oral Vitamin E Administration on Acute Gastric Mucosal Lesion Progression in Rats Treated with Compound 48/80, a Mast Cell Degranulator. **Biol. Pharm. Bull.**, v.29, n.(4), p. 675-683, 2006.
- OLALEYE, S.B., ADARAMOYE O. A., ERIGBALI, P.P., ADENIYI O. S. Lead exposure increases oxidative stress in the gastric mucosa of HCl/ethanol-exposed rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 38, p. 5121-5126, 2007.
- PIQUE, J. M., ESPLUGES, J. V., WHITTLE, B. J. R. Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilation during acid secretion. **Gastroenterology**, v. 105, p. 171-175, 1992.
- RAMAKRISHNAN & SALINAS, K. & SALINAS, R.C. Peptic Ulcer Disease. **American Family Physician**, v. 76, n. 7, 2007.
- RIGOTTI, A. Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine*, v.28, p. 423-436, 2007.
- ROCK, C. L., JACOB, R. A., BOWEN, P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: Vitamin C, Vitamin E and the Caratenoids. *J Am Diet Assoc.* v. 96, p. 693-702, 1996.
- RODRÍGUEZ, Z. B. Z., IVAREZ, R. G., GUANCHE, D., MERINO, N., ROSALES, F. H., CEPERO, S. M., GONZÁLES, Y. A., SCHULZ, S. Antioxidant Mechanism is Involved in the Gastroprotective Effects of Ozonized Sunflower. *Mediators of Inflammation*, v. 2007, 2006.
- RUBIN, E. & FARBER, J. L. *Patologia*, 3ª Ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, cap 13, p. 670-671, 2002.
- SACHA, B., ZIERLER, S., LEHNARDT, S., WEBER, J. R., KERSCHBAUM, H. H. Heterogeneous Effects of Distinct Tocopherol Analogues on NO Release, Cell Volume, and Cell Death in Microglial Cells. **Journal of Neuroscience Research.** v. 86, p. 3526-3535, 2008.
- SCHNEIDER, C. Chemistry and biology of vitamin E. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 49, p. 7-30, 2005.
- SCHUBERT, M.L. & PEURA, D. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. *Gastroenterology*, v.134, p. 1842-1860, 2008.
- SEN, C.K., KHANNA, S., ROY, S. Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols. *Life Sci.*, v.78, n. 18, p. 2088-2098, 2006.
- SERAFINI, M. Dietary vitamin E and T cell-mediated function in the elderly: effectiveness and mechanism of action. **Int. J. Devl Neuroscience.** v. 18, p. 401-410, 2000.
- SUZUKI, Y., ISHIHARA, M., SEGAMI, T., ITO, M. Anti-ulcer Effects of Antioxidants, Quercetin, α -Tocopherol, Nifedipine and Tetracycline in Rats. *Jpn. J. Pharmacol.* V. 78, p. 435-441, 1998.
- TARNAWSKI, A. S. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, p. S24-S33, 2005.
- VALCHEVA-KUZMANOVA, S., KRASNALIEV, I., GALUNSKAL, B., BELCHEVA, A. Influence of DL-alpha-tocopherol acetate on indomethacin-induced gastric mucosal injury in rats. **Autonomic & Autacoid Pharmacology**, v. 27, p. 131-136, 2007.
- WALLACE J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? *Physiol Ver.*, v.88, p. 1547-1565, 2008.
- WANG, X. & QUINN, P.J. Vitamin E and its function in membranes. **Progress in Lipid Research**, v.38, p.309-336, 1999.

- WISEMAN, S. A., BOOM, M. A. V. V.D., DE FOUW, N. J. WASSINK, M. G., DEN KAMP, J. A.F. O., TIJBURG, L. S. M. Comparison of the effects of dietary vitamin e on in Vivo and in vitro parameters of lipid Peroxidation in the rabbit. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 19, n. 5, p. 617-626, 1995.
- WU, D., LIU, L., MEYDANI, M., MEYDANI, S. N. Vitamin E Increases Production of Vasodilator Prostanoids in Human Aortic Endothelial Cells through Opposing Effects on Cyclooxygenase-2 and Phospholipase A2. **J. Nutr.**, v. 135, p. 1847-1853, 2005.
- YOSHIDA, Y., HAYAKAWA, M., CYN Shi, O., JISHAGE, K., NIKI, E. Acceleration Of Lipid Peroxidation In A-Tocopherol Transfer Protein-Knockout Mice Following The Consumption Of Drinking Water Containing A Radical Initiator. **J. Oleo Sci.** v. 57, n. 10, p. 577-583, 2008.
- YOSHIKAWA, T., YASUDA, M., UEDA, S., NAITO, Y., TANIGAWA, T., OYAMADA, H., KONDO, M. Vitamin E in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.53, p. 210S-214S, 1991.
- ZHAO, W., ZHU, F., SHEN, W., FU, A., ZHENG, L., YAN, Z., ZHAO, L., FU, G. Protective effects of DIDS against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Acta Biochim Biophys Sin**, p. 301-308, 2009.