

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

Atividade antiulcerogênica
de um concentrado de soro de leite bovino
em modelos experimentais com ratos

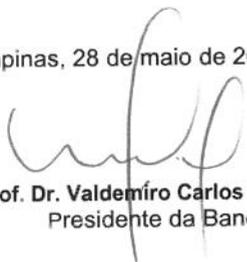
Aluna: Caroline Filla Rosaneli
Nutricionista - UFSC

Orientador: Prof^o. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Caroline Filla Rosaneli**, aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de maio de 2002.

Campinas, 28 de maio de 2002.



Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Presidente da Banca

Dissertação apresentada ao Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre.

Campinas, maio de 2002.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE Be
Nº CHAMADA TUNICAMP
R71a
V _____ EX _____
TOMBO BCI 50609
PROC 16-837/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 28/08/02
Nº CPD _____

CM00172530-9

BIB ID 253620

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

R71a

Rosaneli, Caroline Filla

Atividade antiulcerogênica de um concentrado de soro de leite bovino em modelos experimentais com ratos / Caroline Filla Rosaneli. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Úlcera gástrica. 2. Soro de leite. 3. Proteínas. 4. Nutrição.
I. Sgarbieri, Valdemiro Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof^o Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
ITAL / UNICAMP



Prof^a Dra. Débora de Queiroz Tavares
DEPAN / FEA / UNICAMP



Prof^o Dr. João Ernesto de Carvalho
CPQBA / UNICAMP

Prof^o Dr. Jaime Amaya-Farfan
DEPAN / FEA / UNICAMP

717628000

Dedicatória

Á minha família,
que engrandece meu viver e meu saber a cada dia.
Obrigada por me ensinar e entender minhas decisões.

Ao meu orientador Prof^o Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri,
pelos sábios ensinamentos, decisões e ética, importantes para
a minha formação profissional e pessoal.

Á amiga Érica,
em primeiro momento pela humanidade, que tornou um ato singelo da
nossa convivência numa profunda amizade.
Obrigada pela dedicação, cumplicidade e carinho.

Ao Prof^o João Ernesto de Carvalho,
pelos decisões, conselhos, profissionalismo e amizade.

Agradecimentos

À Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP,
pela oportunidade profissional e pessoal.

Ao CNPQ,
pela bolsa que segurou muitos momentos difíceis.

Ao CPQBA/UNICAMP,
À Márcia, por ser amiga, profissional e sempre disposta a ajudar.
À Ana e Sirlene, por sempre estarem literalmente ao meu lado nos
experimentos.

Ao ITAL,
pela disposição dos laboratórios e pela equipe profissional do projeto do
Soro de leite.

À UNIPAR
pela oportunidade profissional.

Agradecimentos especiais

À inseparável amiga Denise Mafra,
por agüentar tudo, tudo e mais um pouco.
Pelos incontáveis desabafos e alegrias.

À amiga Flávia Auler,
pela grande influência de me trazer a esta realidade profissional e
dividir as grandes emoções da vida.

À amiga Cristina Henschel de Matos e seu Fábio,
que mostrou que a nossa distância não representou nossa separação, e
apesar de tudo à nossa importante amizade.

Às amigas Ana Silvia e Andréa,
pelo que superamos, dividimos, consolamos, rimos, choramos e acima
de tudo pela amizade e alegria da nossa convivência.

Ao amigo Rodrigo,
pela incontestável amizade, carinho, paciência e dedicação.

Agradecimentos especiais

Ao Nelson Augusto,
pela paciência (ou impaciência) de me questionar sobre a vida,
me proporcionando a alegria dos momentos felizes,
com a simplicidade que deve ser.

Às amigas Helenice, Yara e Cristina,
começamos juntas esta etapa.
Não poderia esquecer os momentos que vivenciamos
e a nossa amizade.

Às amigas do CRUSP,
por agüentar minha adorável hospedagem e dramatização.
Obrigada pela força.

A descoberta consiste em ver o que todos já viram e
pensar sobre o que ninguém jamais pensou.

Albert Szernt Gyoórey.

Nada neste mundo é tão poderoso como uma idéia
cuja oportunidade chegou.

Victor Hugo.

ÍNDICE

Lista de fluxogramas.....	x
Lista de tabelas.....	xi
Lista de figuras.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
1 Introdução e Justificativa.....	1
2 Revisão Bibliográfica.....	4
3 Materiais e Métodos.....	22
4 Resultados.....	39
5 Discussão.....	55
6 Conclusão.....	64
7 Referências Bibliográficas.....	66

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1	Obtenção de um concentrado protéico de soro de leite bovino desidratado.....	23
Fluxograma 2	Modelo agudo de indução de úlcera por indometacina em ratos.....	26
Fluxograma 3	Modelo agudo de indução de úlcera por etanol absoluto em ratos.....	30
Fluxograma 4	Modelo agudo de indução de úlcera por estresse em ratos.....	32
Fluxograma 5	Modelo agudo de indução de úlcera por reserpina em ratos.....	34
Fluxograma 6	Administração subcutânea de NEM em modelo agudo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos.....	36
Fluxograma 7	Administração intraperitoneal de BSO em modelo agudo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perfil de aminoácidos do CSL.....	39
Tabela 2	Curva dose efetiva do CSL no modelo de úlcera induzida por indometacina.....	43
Tabela 3	Curva dose efetiva do CSL no modelo de úlcera induzida por etanol.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Efeito do tratamento agudo do CSL e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina.....	40
Figura 2	Efeito do tratamento repetitivo do CSL e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina.....	41
Figura 3	Efeito do tratamento subcrônico do CSL e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina.....	42
Figura 4	Curva dose efetiva do CSL no modelo de úlcera induzida por indometacina.....	44
Figura 5	Efeito do tratamento agudo do CSL e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol.....	45
Figura 6	Efeito do tratamento repetitivo do CSL e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol.....	46
Figura 7	Efeito do tratamento subcrônico do CSL e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol.....	47

Figura 8	Curva dose efetiva do CSL no modelo de úlcera induzida por etanol.....	48
Figura 9	Efeito do tratamento agudo do CSL e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por estresse por imobilização e frio.....	49
Figura 10	Efeito do tratamento repetitivo do CSL e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por estresse por imobilização e frio.....	50
Figura 11	Efeito do tratamento agudo do CSL e da atropina, em modelo de úlcera induzida por reserpina.....	51
Figura 12	Efeito do tratamento repetitivo do CSL e da atropina, em modelo de úlcera induzida por reserpina.....	52
Figura 13	Efeito do tratamento agudo e repetitivo do CSL em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com NEM.....	53
Figura 14	Efeito do tratamento agudo e repetitivo do CSL em modelos de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com BSO.....	54

As proteínas do soro de leite têm sido utilizadas na prevenção e/ou tratamento de patologias por apresentar atividade imunomodulatória, ação antibacteriana e antiviral, ação anticancerígena, efeito positivo no combate às infecções e processos inflamatórios, promoção da síntese de glutathione, além de efeito citoprotetor da mucosa. Os objetivos deste trabalho foram investigar o possível efeito do concentrado de soro de leite bovino (CSL) na proteção da mucosa gástrica nos modelos de úlcera gástrica induzida por indometacina, etanol, estresse por imobilização e frio e por reserpina. No modelo de úlcera induzida por indometacina e etanol os animais receberam tratamento agudo, repetitivo e subcrônico, e nos modelos por estresse por imobilização e frio e por reserpina, tratamento agudo e repetitivo. Para determinar o mecanismo específico de ação do CSL na citoproteção gástrica utilizou-se N-etilmaleimida (NEM), um alquilante dos grupamentos sulfidrila e sulfoximina de butionina (BSO), um bloqueador da enzima γ -glutamylcysteinyl synthetase que participa da síntese da glutathione, ambos no modelo de úlcera induzida por etanol. A participação do CSL na citoproteção gástrica foi demonstrada nos modelos de úlcera induzida por indometacina e etanol. A utilização do NEM revelou que o CSL tem importante participação nos efeitos protetores da mucosa gástrica através de grupamentos sulfidrila. Os experimentos realizados com BSO demonstraram que o CSL participa da síntese da glutathione que está envolvida neste processo antiulcerogênico. Nos modelos de úlcera induzida por estresse por imobilização e frio e por reserpina o CSL parece não ter participação na proteção gástrica. Nestes casos, os modelos de indução estão envolvidos no estímulo à secreção ácida gástrica. O CSL revelou-se um importante coadjuvante dietético no tratamento e/ou prevenção de úlceras gástricas, através do mecanismo de citoproteção.

Milk whey proteins have been suggested for the prevention and/or treatment of several pathology due to the following actions: immunomodulation, antiviral and antibacterial activity, anticarcinogenic and antiinflammatory activity, stimulation of glutathione synthesis and mucosal citoprotection. The objective of this investigation was to search for the protective effects of a bovine milk whey protein concentrate (WPC) on gastric mucosa by induced models of gastric ulcer using indomethacin, ethanol, immobilization and cold and reserpine as ulcerogenic agents. For indomethacin and ethanol induced ulcer the rats were submitted to acute, repetitive and subchronic treatments. For the ulcers induced by stress, immobilization in the cold and reserpine, acute and repetitive treatments were applied. Specific mechanism of action was explored by the use of N-ethylmaleimide (NEM) a sulphhydryl alkylating agent and buthionine sulfoximine (BSO) an inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase, an enzyme indispensable for glutathione synthesis. Both blocking agents were tested for the ethanol induced type of ulcer only. The effectiveness of protection for the WPC was demonstrated for indomethacin and ethanol induced models of gastric ulcers. The utilization of NEM revealed that WPC act as inhibitor of gastric ulcerative lesions (ULI) through active sulphhydryl (SH) compounds. On the other hand, the BSO experiment revealed the participation of glutathione in the gastric mucosa ulcerative lesion protection. No significant action of the WPC in the protection of gastric mucosa against immobilization and cold stress and reserpine as was observed these models are involved in the gastric acid secretion. Therefore WPC constitutes important dietetic adjuvant for the prevention or treatment of certain types of stomach ulcers, mainly through a cytoprotection mechanism.

1 Introdução e Justificativa

Muitas pesquisas demonstram o efeito protetor da nutrição contra algumas patologias (Woodward, 1998).

Recentes avanços científicos têm demonstrado um importante aumento do número de pesquisas que relacionam a interação entre patologias e o estado nutricional dos indivíduos.

Os recentes achados nas áreas de bioquímica nutricional e biomédica, que contribuem para desvendar as complexas relações existentes entre nutrição e doenças, sugerem que proteínas dos alimentos e peptídios delas derivados podem desempenhar funções importantes na prevenção, tratamento ou controle de algumas condições patológicas. Alguns dos agentes funcionais derivados destes nutrientes poderiam ser importantes na melhoria da saúde, na promoção do bem-estar e no aumento da longevidade (Brink, 1996; Sgarbieri, 2000).

Estudos comprovam a eficácia das proteínas do soro do leite na atividade imunomodulatória, anticancerígena, antibacteriana e antiviral, além de estimular a absorção e função intestinal (Bounous & Kongshavn, 1985; Bounous et al., 1989a; Bounous et al., 1993; Brink, 1997; Parodi, 1998; Brink, 1999; Sgarbieri, 1999).

O concentrado protéico do soro de leite (CSL) possui elevada concentração de aminoácidos sulfurados como a cisteína e a metionina, que parecem ser responsáveis pelo aumento da síntese de glutathione, molécula que possui efeito desintoxicante e antioxidante, capaz de proteger o organismo de determinadas doenças como câncer,

imunossupressão e processos infecciosos (Bounous & Gold, 1991; Baruchel et al., 1995; Parodi, 1998; Sgarbieri, 1999; Walzem, 1999).

Sabe-se que o estado nutricional tem influência direta na maior ou menor incidência de patologias como úlcera, câncer gástrico e intestinal, além de outros processos inflamatórios, que têm seus fatores determinantes agravados por situações comuns na realidade atual, como o estilo de vida, dieta, estresse, além da predisposição genética, que somadas, elevam o potencial agressivo, ou reduzem os processos de defesa do revestimento mucoso do estômago (Brunton, 1996; Pontes et al., 1998; Walzem, 1999; Rang et al., 2001).

Estudos experimentais de úlcera gástrica induzida em ratos sugerem que esse processo poderá ser minimizado na presença de substâncias sulfidríla que participem da proteção da mucosa (Dias et al., 2000). A partir disto, e baseado na participação das proteínas do soro do leite em estimular o aumento da síntese e da concentração da glutatona intracelular, acredita-se que esse mecanismo possa resultar em inibição ou diminuição das lesões gástricas.

Com isto, propõe-se neste trabalho, a utilização do CSL visando através de sua funcionalidade, diminuir os efeitos da úlcera gástrica induzida por diferentes agentes, visto que, em resultados preliminares deste projeto, obteve-se uma aparente inibição das lesões induzidas, sugerindo que haja uma interação importante entre o CSL e a diminuição das agressões na mucosa gástrica em ratos.

Procurou-se investigar também a atividade antiulcerogênica do CSL em modelos de úlcera induzida por etanol, indometacina e estresse em ratos. Além disto, objetivou-se testar esta atividade antiulcerogênica do CSL em tratamento com dose-única, doses repetitivas e tratamento

subcrônico, nos diferentes modelos de indução de úlcera, e por fim, avaliar o mecanismo de ação antiulcerogênica do CSL na capacidade de estimular a síntese de glutathiona.

2 Revisão Bibliográfica

Propriedades funcionais das proteínas de concentrado de soro de leite bovino (CSL)

O avanço dos conhecimentos científicos, a inter-relação entre dieta e o processo saúde/doença, os custos da saúde pública e interesses econômicos, beneficiaram o surgimento de novos produtos, cujas funções pretendem ir além do conhecido papel nutricional e sensorial dos alimentos. Hoje, se admite que certos componentes da dieta não servem apenas para evitar uma deficiência nutricional, mas para ajudar na redução de riscos de futuras doenças (Lajolo, 2000; Borges et al., 2001).

Neste contexto, tem havido um crescente interesse nos alimentos que apresentam componentes ou substâncias funcionais, ou seja, aqueles que estimulam ou modulam o sistema fisiológico do organismo de modo a promover a saúde e reduzir os custos de assistência à saúde (Park et al., 1997; Hasler, 1998). O consumo de alimentos funcionais aumentou drasticamente nas últimas décadas, em virtude dos benefícios à saúde, principalmente para auxiliar pacientes de grupo de risco como idosos e indivíduos imunodeprimidos (Walzem, 1999; Novartis, 2001).

O termo alimentos funcionais foi primeiramente introduzido no Japão em meados dos anos 80, referindo-se aos alimentos processados contendo ingredientes que auxiliam funções específicas do corpo, além de serem nutritivos (Hasler, 1998).

Na década de 90, nos Estados Unidos, esta terminologia começou a se difundir a partir de um projeto denominado "Program Designer Food" realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI), com o intuito de realizar pesquisas sobre alimentos que apresentassem atividade anticancerígena e imunomodulatória (Park et al., 1997).

Os benefícios dos alimentos funcionais têm sido atribuídos a vários nutrientes conhecidos e utilizados pelo homem há muito tempo (McIntosh et al., 1998). O interesse por alimentos que apresentem características funcionais vem sendo desenvolvido desde a antiguidade, na chamada medicina tradicional popular, em países da Europa e Ásia.

Nos últimos anos tem-se observado um importante crescimento tanto nas pesquisas, quanto na produção destes alimentos funcionais. Nos Estados Unidos, percebe-se interesse não apenas pelo meio acadêmico, mas pelas indústrias alimentícias, impulsionando uma crescente demanda desses alimentos no mercado mundial. O Brasil, devido aos amplos recursos naturais e pela sua biodiversidade, pode oferecer a possibilidade de descobertas de novos alimentos funcionais, bem como dos seus componentes, trazendo benefícios para a saúde da população brasileira, além de ser importante em termos econômicos (Park et al., 1997).

A expectativa é que dentro de poucos anos, as prateleiras dos supermercados estejam repletas de produtos com propriedades funcionais (Salgado, 2000). Estes novos ingredientes dos alimentos irão trazer uma outra dimensão para a consciência de saúde no século XXI e certamente outro paradigma em nutrição. O mercado mundial de alimentos funcionais atingiu US\$ 70 milhões em vendas em 1999, e

cerca de 100 milhões no final de 2001, o que representa 5% da alimentação humana comercializada no mundo (Novartis, 2001).

O aumento das doenças crônico-degenerativas no Brasil e no mundo, dentre elas, doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, obesidade, entre outras, tem sido relacionado às modificações no padrão alimentar e no estilo de vida das pessoas. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que estas doenças são responsáveis por 70-80% da mortalidade nos países desenvolvidos e 40% naqueles em desenvolvimento. As principais causas de morte no mundo, segundo a OMS, foram por doenças que poderiam ser prevenidas ou controladas através da dietoterapia. Estes dados têm contribuído para o rápido progresso científico e industrial ocorrido nas últimas décadas (Salgado, 2000).

As recentes descobertas nas áreas da bioquímica nutricional e biomédica, que têm contribuído para desvendar as complexas relações existentes entre nutrição e doenças, sugerem que proteínas dos alimentos e peptídios delas derivados podem desempenhar funções importantes na prevenção ou controle de algumas condições patológicas. Alguns dos agentes funcionais derivados destes nutrientes poderiam ser importantes na melhoria da saúde, na promoção do bem-estar e no aumento da longevidade (Sgarbieri, 2000).

As proteínas foram as primeiras substâncias a serem reconhecidas como parte vital dos tecidos vivos. As proteínas da dieta participam na síntese de tecidos e outras funções metabólicas especiais. No anabolismo fornecem aminoácidos necessários para a construção e manutenção dos tecidos corpóreos. Desempenham papel estrutural não apenas em todos os tecidos do corpo, mas também na formação de

enzimas, hormônios e vários fluidos e secreções corpóreas, além de estar envolvidas nas funções do sistema de defesa do organismo (Mahan & Arlin, 1995; Dutra-de-Oliveira & Marchini, 1998).

A importância da modulação da síntese protéica tem sido investigada. O envelhecimento ou algumas patologias pode causar declínio na síntese de proteínas e, conseqüentemente comprometer o desempenho de suas funções orgânicas, com isto, influenciando nos processos fisiológicos e patológicos (Brink, 1999).

Nas últimas duas décadas, têm sido relatados novos estudos sobre o efeito da utilização de fontes alimentares protéicas para induzir maior ativação dos processos imunes e diminuição dos processos patológicos (Bounous & Gold, 1991; Bounous et al., 1993; Brink, 1996; Sgarbieri, 1996).

O leite bovino tem sido reconhecido como uma importante fonte de alimento funcional por causa de suas frações protéicas. Somente nas últimas décadas incentivaram-se pesquisas sobre a utilização do leite na promoção da saúde. Há evidências de que o leite bovino contém inúmeros componentes com atividades biológicas que potencializam o efeito sobre a resposta imune e a resistência dos indivíduos às infecções (Bounous & Kongshavn, 1985; Bounous et al., 1988; Bounous & Gold, 1991; Brink, 1999; Walzem, 1999; Sgarbieri, 1999).

Tem sido sugerido que algumas propriedades funcionais das proteínas ou peptídios do leite bovino possam ser utilizados no tratamento e/ou na prevenção de importantes condições patológicas (Dial & Lichtenberger 1987; McIntosh et al., 1998; Parodi, 1998; Sgarbieri, 1999; Matsumoto et al., 2001). Há referências na literatura

italiana do século XVII de que este alimento era utilizado por muitas culturas e sociedades para prevenir e tratar doenças, afirmando sua funcionalidade fisiológica (McIntosh et al., 1998).

Na indústria de leite e seus manufaturados muitas frações protéicas, como caseínas e soro de leite, têm sido utilizadas por possuírem várias propriedades funcionais tecnológicas importantes (Walzem, 1999; Usdec, 2001). Desde a década de 80, a utilização destes produtos derivados do leite, aumentou significativamente por representarem importante acréscimo à economia das indústrias leiteiras (Usdec, 2000).

O soro de leite é formado por um grupo heterogêneo de proteínas com características especiais (Parodi, 1998). Apresenta uma rica e variada mistura de proteínas com propriedades químicas, físicas e funcionais tecnológicas e fisiológicas (McIntosh et al., 1998). Estas propriedades dependem, em parte, da concentração em aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) nas proteínas do soro de leite, as quais representam aproximadamente 20% do total de proteínas do leite bovino. Os outros 80% são caseínas (Fonseca et al., 1999; Borges et al., 2001).

Efeitos biológicos e fisiológicos das proteínas do soro de leite são atribuídos às frações α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, soroalbumina, lactoferrina, lactoperoxidase, imunoglobulinas, além de uma pequena quantidade de substâncias bioativas, incluindo hormônios, fatores de crescimento celular e citocinas, que estão presentes em concentrações que podem ser consideradas significativas para benefícios ao organismo. Estas frações protéicas têm sido implicadas em inúmeros efeitos

biológicos observados em estudos com humanos e animais (McIntosh, 1998; Parodi, 1998).

Baruchel et al. (1998), revelam quais as concentrações dos componentes do soro de leite que são citados como responsáveis pelas propriedades funcionais fisiológicas deste produto. Na molécula da albumina do soro bovino encontram-se 17 resíduos de cisteína e 6 sequências de ácido glutâmico-cisteína. Na lactoferrina há 17 resíduos de cisteína e 4 sequências de ácido glutâmico-cisteína. Na α -lactoalbumina há 4 resíduos de cisteína e na β -lactoglobulina, 2 resíduos de cisteína. Este estudo evidencia as frações que contêm aminoácidos sulfurados, julgados responsáveis pela funcionalidade fisiológica do soro de leite bovino.

Pesquisas realizadas em diferentes modelos experimentais (animais, humanos e células *in vitro*) utilizando a proteína do soro de leite têm comprovado a eficácia deste produto na função orgânica, incluindo aumento da capacidade imunomodulatória, ação antibacteriana e antiviral, estímulo da absorção e função intestinal, aumento da absorção de minerais, aumento da síntese de hormônios, ação anticancerígena, aumento no combate às infecções e processos inflamatórios, promoção da síntese de glutathione, além do efeito citoprotetor da mucosa gástrica (Bounous & Kongshavn, 1985; Bounous et al., 1989b; Bounous & Gold, 1991; Bounous et al., 1993; Kennedy et al., 1995; Brink, 1996; Parodi, 1998; McIntosh et al., 1998; Fonseca et al., 1999; Brink, 1999; Sgarbieri, 2000; Rosaneli et al., 2001; Matsumoto et al., 2001).

Úlcera gástrica e seus fatores determinantes

O estilo de vida e sua influência nos hábitos alimentares aumentaram a exposição dos indivíduos a fatores agressivos à mucosa gástrica. A incidência da úlcera gástrica tem aumentado devido principalmente ao estresse, ingestão de bebidas alcoólicas, abuso de antiinflamatórios e a presença de várias bactérias, entre elas, a mais citada e estudada, *Helicobacter pylori* (Dias, 1997; Silva et al., 1997; Bighetti, 1999).

Calcula-se que 15 entre 1000 indivíduos sofram desta afecção, sendo maior a ocorrência em mulheres entre 40 e 70 anos de idade. Além de sua elevada incidência, os custos de suas complicações, particularmente hemorragias e perfurações, constituem pesado ônus para o indivíduo e para os sistemas assistenciais (Penteado, 2001).

Modelos experimentais com animais, servem para reproduzir a ação dos causadores de úlceras gástricas, para avaliar a atividade de importantes agentes com atividade antiulcerogênica, além da finalidade de determinar a atividade de drogas frente a diferentes agentes ulcerogênicos (Dias, 1997).

Mecanismos de proteção da mucosa gástrica

Como porta de entrada de diversos agentes no organismo, o estômago desenvolveu diversos mecanismos de proteção. Os mecanismos citoprotetores e os mecanismos de secreção ácida gástrica, que aumentam a resistência das células e limitam o acesso dos agentes agressores a elas (Allen et al., 1993).

O estômago é dividido em quatro regiões anatômicas, cárdia, fundo, corpo e antro, que são revestidas pela mucosa gástrica constituída de uma série de depressões e glândulas. Nas depressões estão as células epiteliais superficiais, enquanto que as glândulas são constituídas por três tipos distintos de células. As parietais que são responsáveis pela secreção do ácido clorídrico, as exócrinas pela secreção de muco e as principais que secretam o pepsinogênio (Rang et al., 2001).

Em relação à secreção ácida gástrica, esta é controlada por mecanismos complexos e interativos que atuam nos níveis periférico, central e celular. O sistema nervoso central participa da iniciação do processo secretório, pois alguns fatores emocionais e mentais desencadeiam a secreção. As principais substâncias que participam deste processo são a histamina, acetilcolina e gastrina (Dias, 1997).

O ácido liberado na mucosa gástrica é produzido e excretado pelas células parietais, através da estimulação de alguns receptores localizados em sua superfície (Hirschowitz et al., 1995). A acetilcolina age diretamente sobre as células parietais do estômago, estimulando a secreção ácida. Ela também é co-estimuladora da gastrina e histamina que regulam a secreção ácida (Schubert, 1994).

Na citoproteção gástrica entre os principais fatores de proteção estão os secretados no lúmen, incluindo ácido, muco, bicarbonato e substâncias antibacterianas. Ainda que o ácido clorídrico tenha o potencial de causar injúria à mucosa gástrica, sua função é proteger esta mucosa de microorganismos agressores (Wallace & Chin, 1997; Bighetti, 1999).

As prostaglandinas são produtos do ácido araquidônico e são sintetizadas em todo o trato gastrointestinal sendo os principais agentes endógenos responsáveis pela citoproteção gástrica. Além de possuírem efeitos anti-secretórios, as prostaglandinas estimulam a secreção de muco e bicarbonato e aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa, possibilitando a remoção mais rápida de substâncias tóxicas, além de aumentar, conseqüentemente, a oferta de oxigênio e nutrientes para as células (Felix et al., 1986; Konturek et al., 1997; Dias, 1997).

As prostaglandinas controlam a produção basal de ácido clorídrico e a secreção de pepsina em resposta à alimentação, estimulação vagal ou administração de histamina ou pentagastrina. As propriedades antiulcerogênica das prostaglandinas estão relacionadas com receptores específicos localizados na membrana plasmática das células parietais gástricas, juntamente com os receptores para histamina (Alarcon de la Lastra, et al., 1999).

O bicarbonato é secretado pelas células superficiais do estômago e pelo duodeno em resposta a vários estimulantes, como as prostaglandinas, peptídios gastrointestinais e contato com o ácido clorídrico (Bighetti, 1999). Ele permanece em grande parte abaixo ou na camada mucosa. Deste modo, a superfície mucosa está em contato com um líquido com pH mais elevado do que o observado na luz do

estômago. Em condições normais, o bicarbonato neutraliza os íons H^+ , enquanto se difunde através da camada de muco, estabelecendo um gradiente de pH entre a luz e as células epiteliais superficiais (Smedfors & Johansson, 1986; Hojgaard et al., 1996).

Existem basicamente dois tipos de muco no estômago. O muco luminal que pode ser facilmente removido e que não apresenta propriedades citoprotetoras específicas, participando somente como lubrificante, protegendo a mucosa contra forças mecânicas do processo de digestão. Já o muco aderido à mucosa, é constituído por uma camada de glicoproteína em forma de gel, denominada mucina. Esta camada é insolúvel em água e protege a mucosa do contato direto com ácido clorídrico e a pepsina (Sellers et al., 1986; Dias, 1997; Bighetti, 1999).

O óxido nítrico tem sido objeto de estudos intensos que procuram esclarecer seu papel na defesa da mucosa gástrica (Elliot et al., 1995). Foi demonstrado que esta substância tem influência sobre a secreção de muco, fluxo sanguíneo, bem como sobre a resistência da mucosa à injúria gástrica (Wallace & Chin, 1997). Seu efeito citoprotetor se dá pela promoção de vasodilatação, com conseqüentemente aumento do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, proporcionando uma retirada mais acelerada dos íons H^+ nocivos a esta e ainda aumenta o suporte de nutrientes para a mesma (Konturek et al., 1995, Kato et al., 1998).

Agentes ulcerogênicos da mucosa gástrica

A indometacina, introduzida nos anos 60 como agente antiinflamatório, comporta indicações clínicas limitadas por causa de sua toxicidade, além da formação de espécies reativas de oxigênio que formam lesões gástricas. Pelo uso abusivo ou doses crônicas de antiinflamatório, a ação das prostaglandinas na proteção da mucosa gástrica é afetada, tornando a lesão mais agressiva (Silva et al., 1997).

O modelo de úlcera induzida por indometacina é considerado um dos mais completos, pois afeta simultaneamente os mecanismos de citoproteção, através do bloqueio à síntese de prostaglandinas, e da secreção ácida gástrica, principalmente pelo estímulo à produção de histamina e gastrina (Konturek & Pawlik, 1986; Morimoto et al., 1991; Katori & Majima, 1997; Bighetti, 1999).

O etanol é um agente irritante local da mucosa gástrica, é capaz de destruir a camada estacionária formada pelo muco e bicarbonato para proteger o estômago contra o suco gástrico e outros agressores químicos (Bighetti, 1999; Rang et al., 2001). Este agente indutor é ainda descrito na literatura para definir a participação de substâncias inibidoras das lesões ocasionadas pelo bloqueio da citoproteção gástrica, através de precipitação protéica, ocasionando um aumento de radicais livres tóxicos para as células (Robert, 1979; Szabo, 1981; Dias, 1997).

O etanol diminui significativamente o conteúdo de grupamentos sulfidrila da mucosa gástrica. Estes efeitos lesivos são produzidos por radicais livres acumulados nas células (Szabo, 1981; Loguercio et al., 1993; La Casa et al., 2000). Estudos mostram que o mecanismo de citoproteção é mediado pelas prostaglandinas e

substâncias sulfidríla da mucosa, que impedem o aumento da permeabilidade vascular, e ainda bloqueiam a ação dos radicais livres tóxicos sobre a mucosa (Takeuchi et al., 1989; Martin et al., 1998).

O suco gástrico normal é uma mistura de secreção parietal (ácido clorídrico e fator intrínseco) e de secreções não-parietais (muco, bicarbonato, Na, K, pepsinogênio). Três mediadores químicos endógenos, a acetilcolina, a gastrina e a histamina, estimulam a produção do ácido clorídrico (Bighetti, 1999).

A acetilcolina age diretamente sobre as células parietais, estimulando fatores que aumentam o cálcio intracelular, importante mensageiro no processo de secreção gástrica (Dias, 1997). Por outro lado, a acetilcolina induz a liberação da histamina que também é responsável pela estimulação da secreção ácida, além de estimular a secreção de gastrina, que induzirá a inibição do ácido pelas células parietais (Schubert, 1994; Hirschowitz et al., 1995).

Várias causas físicas e fisiológicas causam úlceras em humanos e animais experimentais. O aumento da motilidade gástrica, diminuição do fluxo sanguíneo na mucosa, diminuição dos níveis de prostaglandinas durante condições de estresse estão envolvidos na lesão gástrica atuando sobre o sistema nervoso central e este desencadeando aumento na secreção gástrica (Das & Banerjee, 1993).

O estresse também gera importantes conseqüências na geração de radicais livres e estes na peroxidação lipídica das membranas. Isto tem sido demonstrado em algumas formas de estresse induzido em animais por exercício intenso, frio, imobilização ou imersão em água.

A reserpina utilizada em altas concentrações promove danos gástricos através da depleção de catecolaminas, e para compensar esta estimulação adrenérgica ocorre uma descarga vagal, com conseqüente liberação de acetilcolina, um dos mediadores da secreção ácida gástrica, como escrito no modelo por estresse (Gupta et al., 1974).

A reserpina causa depleção das reservas de catecolaminas nas terminações nervosas simpáticas pós-ganglionares e no sistema nervoso central. A depleção é seguida de uma relativa incapacidade em armazenar catecolaminas. A depleção de catecolaminas resulta na inibição da transmissão do impulso nervoso nas placas terminais do sistema nervoso simpático, levando ao decréscimo do tônus simpático mas, sem prejudicar a atividade do sistema nervoso parassimpático. Portanto, a reserpina reduz a pressão arterial elevada, e a frequência cardíaca, enquanto exerce um efeito sedativo através do sistema nervoso central (Sanihelp, 2001).

A reserpina também causa depleção de outros transmissores e co-transmissores, inclusive serotonina, dopamina, neuropeptídeo e adrenalina nos neurônios centrais e periféricos (Gupta et al., 1974).

Drogas antiulcerogênicas

Os inibidores da bomba de prótons (H^+/K^+ -ATPase), inibem acentuadamente a secreção do ácido gástrico tanto basal quanto estimulada (Rang et al., 2001). No ambiente ácido do estômago, estes inibidores são convertidos num composto que reage com os grupamentos sulfidrílica presentes na molécula de cisteína que fazem parte da H^+/K^+ -ATPase, enzima responsável pela etapa final da secreção

ácida gástrica. As drogas mais utilizadas com esta finalidade são o omeprazol, lansoprazol e pantoprazol (Dias, 1997; Rang et al., 2001).

Uma das classes de antissecretores mais utilizada atualmente para o tratamento de úlceras são os bloqueadores de receptores H₂. Eles são capazes de reduzir a secreção ácida através de um mecanismo competitivo no receptor H₂ da histamina, localizada na membrana basolateral da célula parietal (Silva et al., 1997).

A cimetidina e a ranitidina são as drogas mais recomendadas para prevenir úlcera provocada pela secreção ácida por ter eficácia de 60-85% dos casos (Brunton, 1996; Silva et al., 1997; Rang et al., 2001).

A carbenoxolona, é uma droga antiulcerogênica, obtida a partir das raízes e rizomas do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*). O mecanismo de ação desta droga está relacionado com o aumento dos níveis de prostaglandinas na mucosa gástrica através da inibição das enzimas que promovem o catabolismo das prostaglandinas, além da inibição da secreção da pepsina. Para tanto, esta droga é recomendada para modelos de úlcera gástrica que estejam envolvidos com a citoproteção gástrica (Brunton, 1996; Dias, 1997).

A atropina é uma importante droga utilizada para promover a inibição da secreção ácida gástrica, atuando através de receptores muscarínicos localizados na célula parietal da mucosa estomacal, participando do bloqueio neurogênico da secreção ácida gástrica, além disso, diminui a motilidade gástrica retardando o esvaziamento do conteúdo estomacal (Gupta et al., 1974; Silva et al., 1997; Bighetti, 1999).

Participação de substâncias sulfidrila na citoproteção gástrica

Estudos recentes têm demonstrado que a existência de substâncias sulfidrila na mucosa tem envolvimento direto com o mecanismo de citoproteção gástrica. O modelo de indução de úlcera por etanol tem sido o mais sugerido para determinar este envolvimento, pelo fato do etanol participar diretamente do bloqueio das substâncias protetoras da mucosa gástrica, resultando numa agressão direta desta mucosa (Szabo, 1981; Robert et al., 1984; Takeuchi et al., 1989; Loguercio et al., 1996; Altomare et al., 1998).

Para avaliar a participação de substâncias sulfidrila na citoproteção gástrica, animais são tratados previamente com N-etilmaleimida (NEM), que é um composto que promove alquilação dos grupamentos sulfidrila, presentes na mucosa gástrica, inativando-os (Takeuchi et al., 1989; Rastogi et al., 1998; Bighetti, 1999).

Outro mecanismo também pode avaliar a participação das substâncias sulfidrila, através de inibidores da síntese da glutathiona. A utilização de sulfoximina de butionina (BSO), um potente inibidor da enzima γ -glutamilcisteína-sintetase, que promove a síntese da glutathiona, demonstrou que o bloqueio desta enzima, induz severos danos na mucosa gástrica (Martensson et al., 1990; Yamagushi et al., 1998; Hultberg et al., 1999), visto que a glutathiona tem uma função antioxidante importante na defesa da mucosa gástrica contra agentes ulcerogênicos (Hiraishi et al., 1994; Wakulich & Tepperman, 1997; Yamaguchi et al., 1998).

Importância da glutathiona

Desde sua descoberta em 1888, a glutathiona tem sido pesquisada por sua variada função biológica. Em 1929, Hopkins & Rendall descobriram que a glutathiona era uma molécula multifatorial, composta por três aminoácidos, cisteína, glicina e glutamato, formando o tripeptídeo L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, que exerce sua atividade bioquímica através do grupamento sulfidrila de sua estrutura (Meister, 1991; Cotgreave & Gerdes, 1998).

A glutathiona é encontrada em todas as células do organismo, sendo que sua síntese intracelular ocorre a partir de seus precursores, porém a cisteína é fator limitante para sua formação. Mínimas quantidades de cisteína são encontradas em alimentos como clara de ovo crua, leite, carnes, porém são suficientes para que o organismo utilize-a para a síntese da glutathiona (Meister, 1991).

A glutathiona tem um papel central na proteção contra os efeitos danosos de bactérias, vírus, poluentes e radicais livres. É essencial na manutenção dos grupos tióis das proteínas e outros componentes, está envolvida no transporte de aminoácidos e participa da iniciação e progressão de células de defesa do sistema imune. Sem a glutathiona, importantes antioxidantes como vitamina C e E não poderiam desempenhar suas funções biológicas. Além de interagir com várias drogas, participa também como cofator das enzimas formaldeído desidrogenase, maleilactoacetato isomerase, glioxalase, prostaglandina endoperoxidase isomerase e outras enzimas similares (Meister, 1991; Bounous, 1997; Anderson, 1998; Bulger & Helton, 1998).

A presença de um importante agente antioxidante natural na mucosa gástrica tem sido freqüentemente reportada (Martin et al., 1998; Rosaneli et al., 2001). Sabe-se que a glutathione está distribuída nas células da mucosa gastrointestinal de animais e do homem em elevadas concentrações. Estas concentrações estão intimamente relacionadas com a citoproteção gástrica por impedir a ação nociva de radicais livres tóxicos sobre as células da mucosa, sendo uma possível mediadora das defesas contra injúrias, mas o exato papel de como este antioxidante protegeria a mucosa do estômago não está esclarecido (Boyd et al., 1981; Szabo, 1981; Robert et al., 1984; Victor et al., 1991; Szabo et al., 1992; Hiraishi et al., 1994; Smith et al., 1996; Bighetti, 1999; Loguercio & Di Pierro, 1999; Ovrebo et al., 1999).

Das & Banerjee (1993), mostraram que a administração intraperitoneal de glutathione antes da indução de úlcera por estresse promoveu uma maior proteção da mucosa gástrica.

Espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na patogênese da úlcera induzida pelo etanol. Estudos mostram que a utilização de bloqueador da síntese da glutathione foi capaz de danificar ainda mais a mucosa gástrica, uma vez que, a glutathione não consegue exercer seu efeito antioxidante neste tecido (Loguercio et al., 1993; Smith et al., 1996; Loguercio et al., 1996; Wakulich & Tepperman, 1997; Altomare et al., 1998; Hiraishi et al., 1999).

Verhulst et al. (2000), demonstraram que há uma relação inversa entre câncer gastrointestinal e a atividade da glutathione e enzimas associadas na mucosa gástrica. Segundo Parodi (1998), a glutathione

pode ter participado da inibição de tumores gástricos ou processos ulcerativos em ratos.

Evidências de estudos *in vivo* e *in vitro* comprovaram que as proteínas do soro de leite parecem ser um importante recurso para viabilizar uma melhor defesa para as células gástricas, tanto nos processos patológicos, como no efeito preventivo, e que são capazes de induzir a síntese da glutathione, oferecendo subsídios através da dietoterapia para uma resposta mais eficiente, garantindo assim, uma melhora da qualidade de vida para pacientes com úlcera gástrica (Dial & Lichtenberger, 1987; Matsumoto et al., 2001).

3 Materiais e Métodos

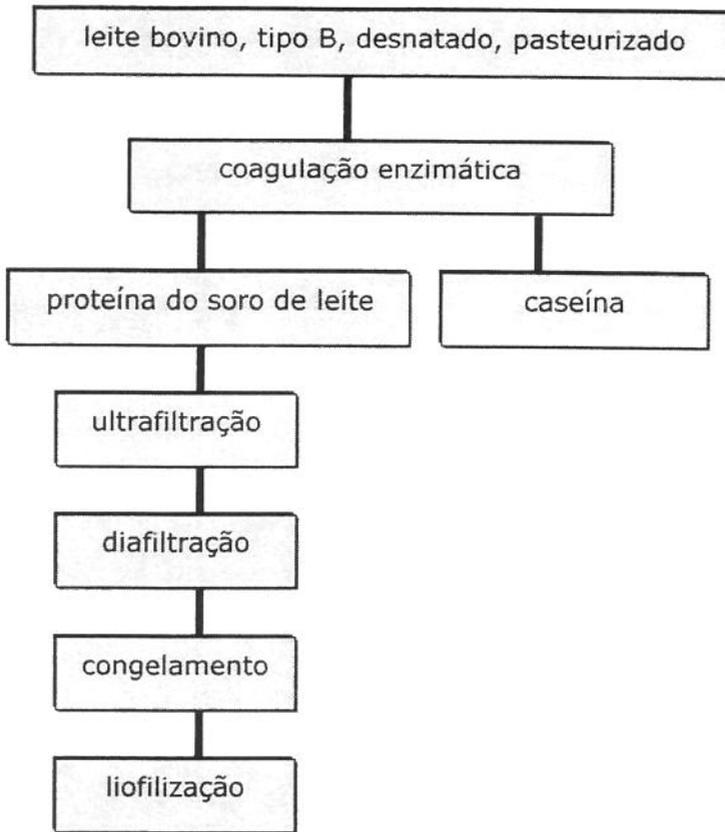
3.1 Obtenção do concentrado protéico do soro de leite (CSL)

Os processamentos para obtenção do CSL foram realizados no Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL.

O CSL foi preparado a partir de leite bovino tipo B, desnatado e pasteurizado (72°C, 20 segundos). Em seguida, realizou-se a coagulação enzimática (quimosina + pepsina) utilizando-se coágulo comercial. A separação do soro do coágulo de caseína foi feita por decantação e filtração.

Para concentrar o produto foi utilizado um sistema de ultrafiltração e diafiltração em membranas, peso molecular de corte de 10 Kda. Posteriormente, realizou-se o congelamento e liofilização para obtenção de um concentrado protéico desidratado (Borges et al., 2001; Jacobucci, 1999). O esquema geral para obtenção do CSL é ilustrado no Fluxograma 1.

A partir de 1000 litros de leite pasteurizado e desnatado obteve-se aproximadamente 5,5 Kg do produto liofilizado, contendo cerca de 83% de proteínas.



Fluxograma 1. Obtenção de um concentrado protéico de soro de leite bovino desidratado.

3.2 Testes para avaliar a atividade antiulcerogênica do CSL na mucosa gástrica em ratos

Os experimentos realizados para determinar a atividade antiulcerogênica do CSL foram desenvolvidos na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.2.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos *Wistar* machos, com média de peso corporal entre 300-400g. Os animais foram adquiridos do Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP e utilizados nos experimentos após período mínimo de sete dias de adaptação ao biotério, com ciclo de claro-escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 20°C, com água e ração comercial *ad libitum*, até realização dos testes, quando foram submetidos a jejum prévio.

Todas as drogas e substâncias administradas foram baseadas no peso corpóreo do animal, com exceção do etanol absoluto, cuja dosagem foi um volume fixo (1 mL).

3.2.2 Testes do efeito protetor do CSL em diferentes modelos de indução de úlcera gástrica em ratos

- **Úlcera induzida por indometacina**

- **Modelo agudo**

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 300-400g divididos em grupos de 5 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, via oral por gavagem, o tratamento correspondente. Tratou-se um dos grupos com solução de NaCl a 0,9 % (solução salina) no volume de 10 mL/kg de peso corpóreo, pc, (controle negativo), outro grupo com suspensão aquosa de cimetidina (agente antiulcerogênico) na dose de 100 mg/kg pc (controle positivo) e o último grupo recebeu o CSL (substância teste) na dose de 1000 mg/Kg pc, dissolvido em 10 mL de solução salina.

Após 30 minutos dos tratamentos, cada animal recebeu injeção subcutânea de suspensão aquosa de indometacina, na dose de 30 mg/kg pc, segundo metodologia descrita por Morimoto et al. (1991).

Quatro horas após a administração da suspensão aquosa de indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas.

O protocolo seguido para o modelo agudo de indução é ilustrado no fluxograma 2.

- **Modelo repetitivo**

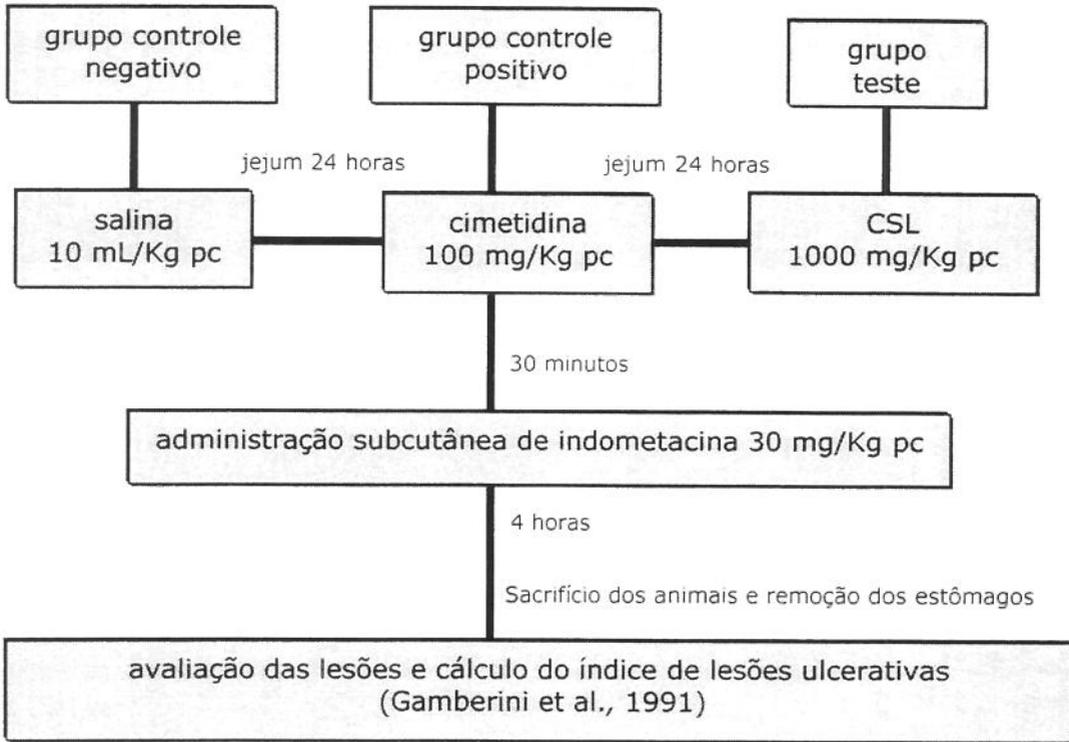
No modelo repetitivo os animais receberam duas doses de seus respectivos tratamentos.

Os grupos controle negativo, positivo e teste, após jejum de 24 horas receberam seus tratamentos respectivos (salina, cimetidina e CSL). Em seguida foram alimentados por 8 horas, recebendo ração e água *ad libitum*, e após jejuados por 16 horas antes da segunda administração dos tratamentos. Após o segundo tratamento, prosseguiu-se com o mesmo protocolo do modelo agudo de indução de úlcera por indometacina.

- **Modelo subcrônico**

Neste modelo, os animais receberam seus respectivos tratamentos por 10 dias consecutivos, nos quais foram submetidos a ciclos alternados de alimentação (8 horas) e jejum (16 horas) antes de cada novo tratamento.

No décimo dia os animais dos diferentes grupos (controle positivo, negativo e teste) foram tratados conforme protocolo para modelo agudo de indução de úlcera por indometacina.



Fluxograma 2. Modelo agudo de indução de úlcera por indometacina em ratos.

O Índice de Lesões Ulcerativas (ILU) foi calculado através da somatória dos parâmetros abaixo, de acordo com a metodologia descrita por Gamberini et al. (1991).

Até 10 petéquias	1 ponto
Até 20 petéquias	2 pontos
Até 30 petéquias	3 pontos
Úlceras de até 1 mm	*n x 2
Úlceras maiores que 1 mm	*n x 3
Hemorragia	1 ponto
Perda de pregas	1 ponto
Perda da coloração	1 ponto
* n = número de lesões encontradas	

Para a determinação da porcentagem de inibição do ILU apresentados pelos grupos tratados em relação ao grupo controle negativo, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição do ILU} = \frac{\text{média controle negativo} - \text{média amostra}}{\text{média controle negativo}} \times 100$$

- **Determinação dose efetiva (DE₅₀) do CSL em modelo de úlcera induzida por indometacina.**

A dose efetiva (DE₅₀) que produz o efeito farmacológico da substância a ser investigada em 50% da população em estudo, foi realizada através da construção de uma curva dose-efeito, utilizando-se o modelo agudo de úlcera induzida por indometacina, conforme metodologia descrita anteriormente.

Os animais foram tratados oralmente com doses crescentes do CSL de 100, 300, 500 e 1000 mg/Kg pc.

O valor da DE₅₀ foi obtido por cálculo de regressão linear, utilizando-se a equação da reta ($y = ax + b$).

- **Úlcera induzida por etanol**

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 300-400 g, divididos em grupos de 5 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, via oral por gavagem, o tratamento correspondente. Tratou-se um dos grupos com solução salina no volume de 10 mL/kg pc (controle negativo), outro grupo com solução aquosa de carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg pc (controle positivo) e o último grupo recebeu CSL (substância teste) na dose de 1000 mg/Kg pc, dissolvido em 10 mL de solução salina.

Após 30 minutos dos tratamentos, os animais receberam por via oral 1,0 mL de etanol absoluto, de acordo com a metodologia descrita por Robert (1979).

Após 1 hora da administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram

retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados com solução salina, para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O ILU foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema de Gamberini et al. (1991), descrito anteriormente.

O protocolo seguido para o modelo agudo de indução é ilustrado no fluxograma 3.

- **Modelo repetitivo**

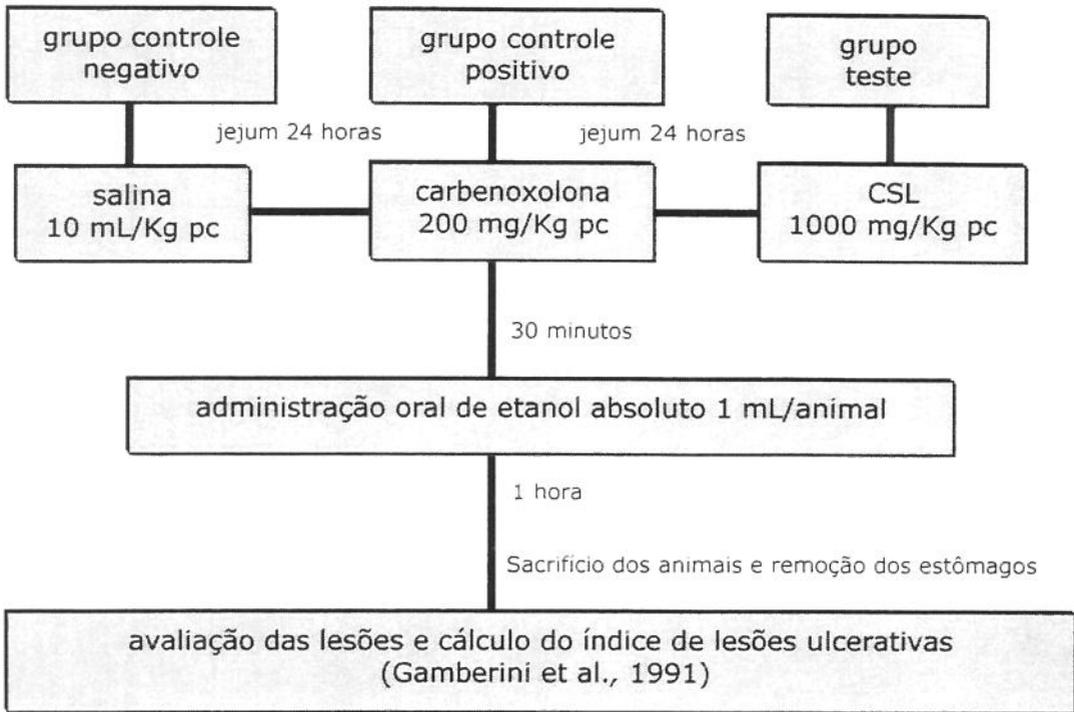
No modelo repetitivo os animais receberam duas doses de seus respectivos tratamentos.

Os grupos controle negativo, positivo e teste, após jejum de 24 horas receberam seus tratamentos respectivos (salina, carbenoxolona e CSL). Em seguida, os ratos foram alimentados por 8 horas recebendo ração e água *ad libitum*, seguindo-se 16 horas de jejum antes da segunda administração dos respectivos tratamentos. A partir do segundo tratamento prosseguiu-se com o mesmo protocolo do modelo agudo de indução de úlcera por etanol.

- **Modelo subcrônico**

Neste modelo, os animais receberam seus respectivos tratamentos por 10 dias consecutivos, nos quais foram submetidos inicialmente a jejum de 24 horas, seguindo ciclos alternados de alimentação (8 horas) e jejum (16 horas) até o último tratamento.

No décimo dia os animais dos diferentes grupos (controle positivo, negativo e teste) foram tratados conforme protocolo para modelo agudo de indução de úlcera por etanol.



Fluxograma 3. Modelo agudo de indução de úlcera por etanol em ratos.

- **Determinação da dose efetiva (DE₅₀) do CSL em modelo de úlcera induzida por etanol.**

A DE₅₀ do CSL no modelo agudo de úlcera induzida por etanol, foi determinada através da construção de uma curva dose-efeito, conforme metodologia descrita anteriormente para este modelo.

Os animais foram tratados oralmente com doses crescentes do CSL de 250, 500, 750 e 1000 mg/Kg pc.

O valor da DE₅₀ foi obtido por cálculo de regressão linear, utilizando-se a equação da reta ($y = ax + b$).

- **Úlcera induzida pelo estresse por imobilização e frio**

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 300-400 g divididos em grupos de 5 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, via oral por gavagem, o tratamento correspondente. Tratou-se um dos grupos com solução salina no volume de 10 mL/kg pc (controle negativo), outro grupo com suspensão aquosa de cimetidina, na dose de 100 mg/kg pc (controle positivo) e o último grupo recebeu o CSL (substância teste) na dose de 1000 mg/Kg pc, dissolvidos em 10 mL de solução salina.

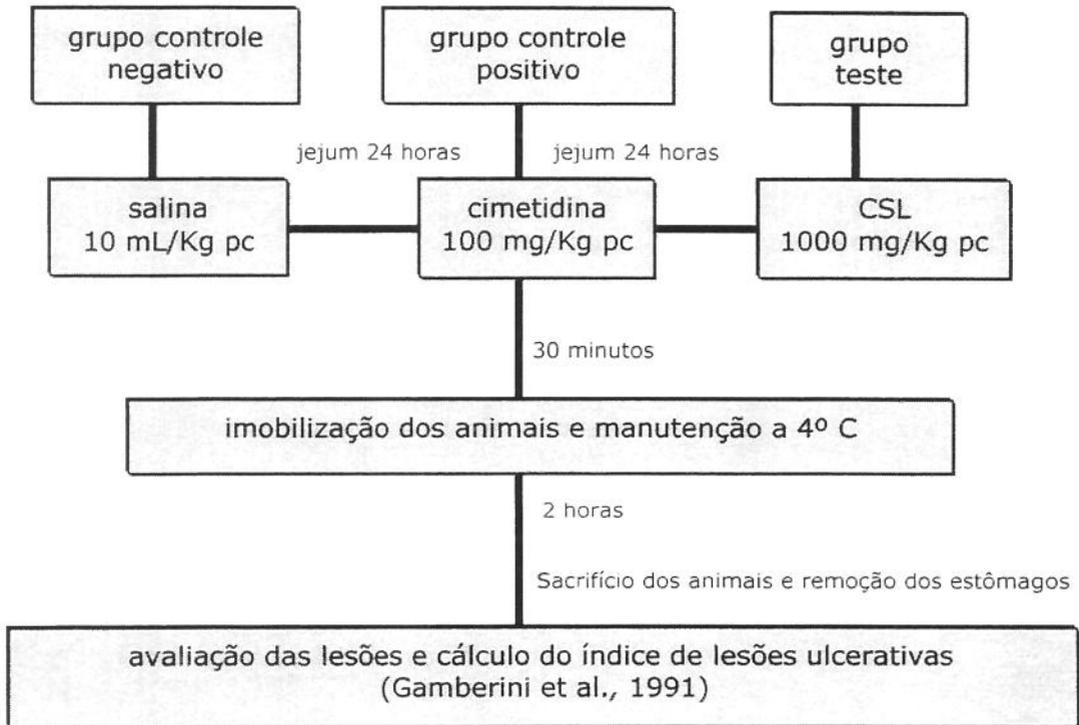
Após 30 minutos dos tratamentos, os animais tiveram as patas traseiras e dianteiras imobilizadas com fitas de esparadrapo, e posteriormente, colocados no interior de contêntores. Estes contêntores foram colocados em câmara fria a uma temperatura de 4°C por 2 horas, segundo metodologia descrita por Levine et al. (1971). Este método é capaz de avaliar o efeito do estresse sobre a secreção gástrica.

Após este período, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O ILU foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema de Gamberini et al. (1991), descrito anteriormente.

O protocolo seguido no experimento agudo é ilustrado no fluxograma 4.

Para este mesmo modelo de indução de úlcera também foram realizados tratamentos repetitivos (tratamento dos diferentes grupos um dia antes do experimento e no dia do experimento).

Após jejum de 24 horas os animais receberam o primeiro tratamento como no tratamento agudo. Seguiu-se 8 horas de alimentação com ração comercial e 16 horas de novo jejum, quando foi administrado o segundo tratamento. A partir deste ponto seguiu-se o protocolo do fluxograma 4.



Fluxograma 4. Modelo agudo de indução de úlcera pelo estresse em ratos.

• Úlcera induzida por reserpina

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 300 – 400g, os quais foram divididos em grupos de 5 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Um dos grupos foi tratado com solução salina no volume de 10 mL/kg pc (controle negativo), outro grupo com solução aquosa de atropina, na dose de 10 mg/kg pc (controle positivo) e o último grupo recebeu CSL (substância teste) na dose de 1000 mg/Kg pc, dissolvido em 10 mL de solução salina.

Após 30 minutos dos tratamentos, os animais receberam por via intraperitoneal solução aquosa de reserpina, na dose de 10 mg/kg pc, segundo metodologia modificada de Gupta et al. (1974).

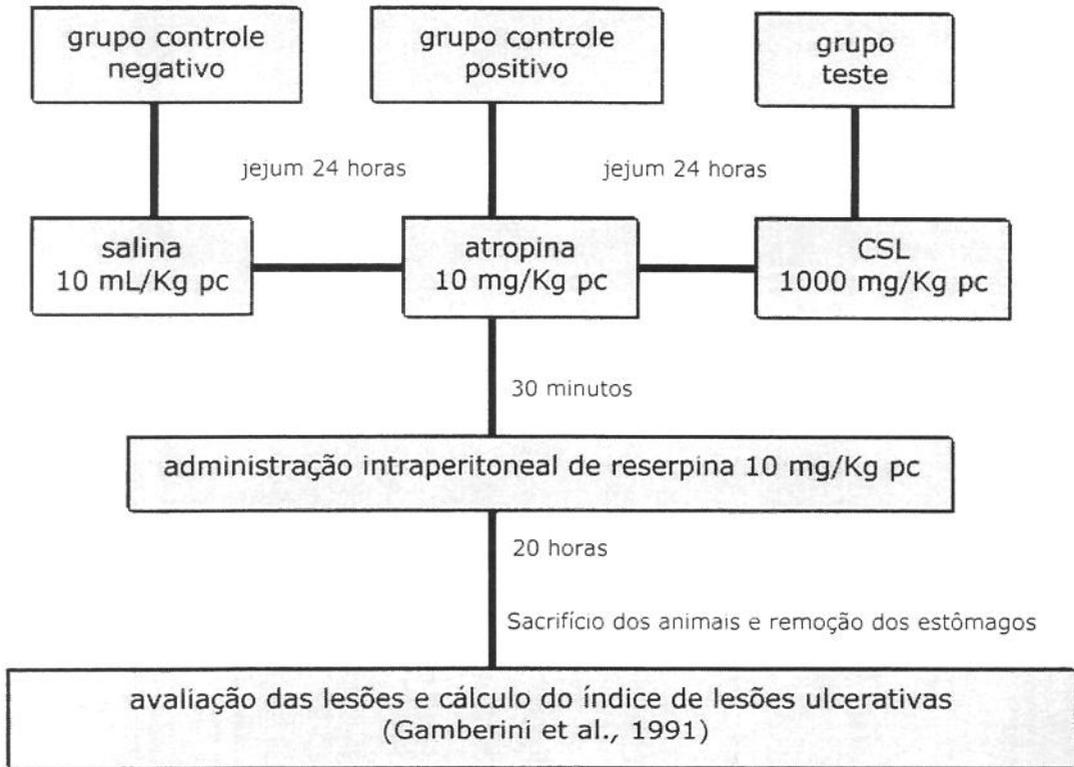
Decorridas 20 horas de latência após a administração de reserpina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O ILU foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema de Gamberini et al. (1991), descrito anteriormente.

O protocolo geral deste experimento é ilustrado no fluxograma 5.

Para este mesmo modelo de indução de úlcera também foram realizados tratamentos repetitivos (tratamento dos diferentes grupos um dia antes do experimento e no dia do experimento).

Após jejum de 24 horas, os animais receberam o primeiro tratamento, como no experimento agudo. Seguiu-se 8 horas de alimentação com ração comercial e água *ad libitum* e 16 horas de jejum,

quando em seguida, foi administrado o segundo tratamento. A partir deste ponto, seguiu-se o protocolo do fluxograma 5.



Fluxograma 5. Modelo agudo de indução de úlcera por reserpina em ratos.

3.2.3 Determinação do mecanismo de ação específica do CSL nos processos de proteção da mucosa gástrica

- **Participação das substâncias sulfidrila na citoproteção gástrica**

Para estudar a possível participação de substâncias sulfidrila sobre a citoproteção gástrica utilizou-se o modelo agudo e repetitivo de indução de úlcera por etanol.

No modelo agudo foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 300-400g, divididos em grupos de 5 animais. Após jejum de 24 horas, com livre acesso à água, todos estes grupos receberam tratamentos prévios com uma solução aquosa de N-etilmaleimida (NEM) na dose de 10 mg/kg pc, por via subcutânea, com exceção de um grupo, que somente recebeu solução salina no volume de 10 mL/kg pc (controle negativo), de acordo com metodologia descrita por Szabo (1981).

Após 30 minutos cada grupo de animais recebeu, por via oral, o tratamento correspondente. Dois grupos foram tratados com solução salina no volume de 10 mL/kg pc (controle positivo e negativo) e o outro grupo recebeu CSL (amostra teste) na dose de 1000 mg/Kg pc, dissolvidos em solução salina.

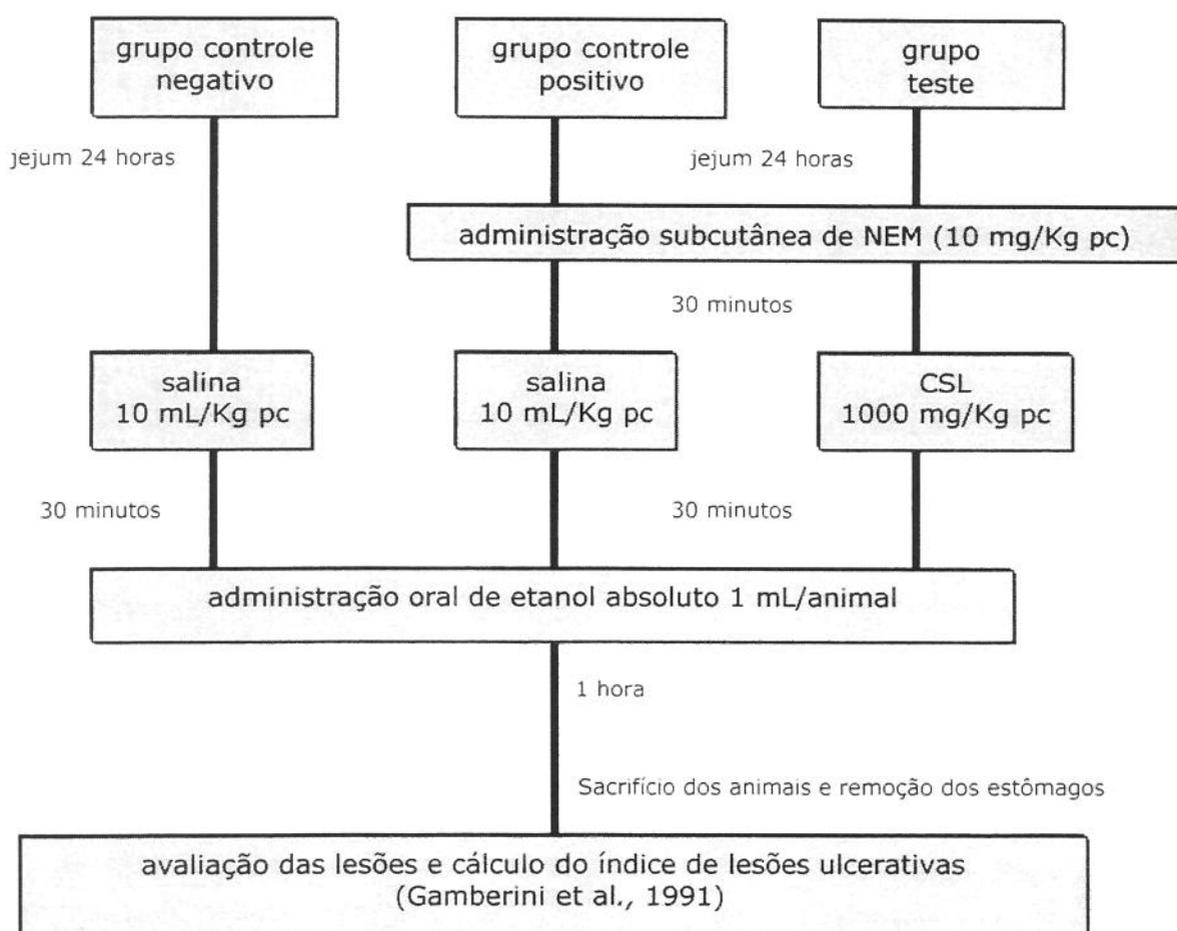
Decorridos 30 minutos, os animais de todos os grupos, receberam por via oral 1,0 mL de etanol absoluto, de acordo com a metodologia descrita por Robert (1979).

Após 1 hora da administração do etanol, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina, para realização de contagem e avaliação das lesões produzidas. O ILU foi calculado posteriormente, de acordo com o esquema de Gamberini et al. (1991), descrito anteriormente.

O protocolo para modelo agudo de úlcera induzida por etanol seguido neste experimento é mostrado no fluxograma 6.

○ **Modelo repetitivo**

Para o modelo repetitivo os animais receberam seus respectivos tratamentos (1 grupo com CSL e 2 grupos com salina) após jejum de 24 horas. Em seguida os ratos foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum* por 8 horas, seguido de 16 horas de jejum, quando receberam o segundo tratamento. A partir deste ponto seguiu-se o protocolo do fluxograma 6



Fluxograma 6. Administração subcutânea de NEM em modelo agudo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos.

- **Participação da glutatona na citoproteção gástrica**

Para avaliar o envolvimento do CSL no estímulo à síntese da glutatona como antioxidante e protetora do processo ulcerativo, utilizou-se sulfoximina de butionina (BSO), que bloqueia a síntese da glutatona através da inibição da enzima γ -glutamilcisteína sintetase (Baruchel et al., 1995).

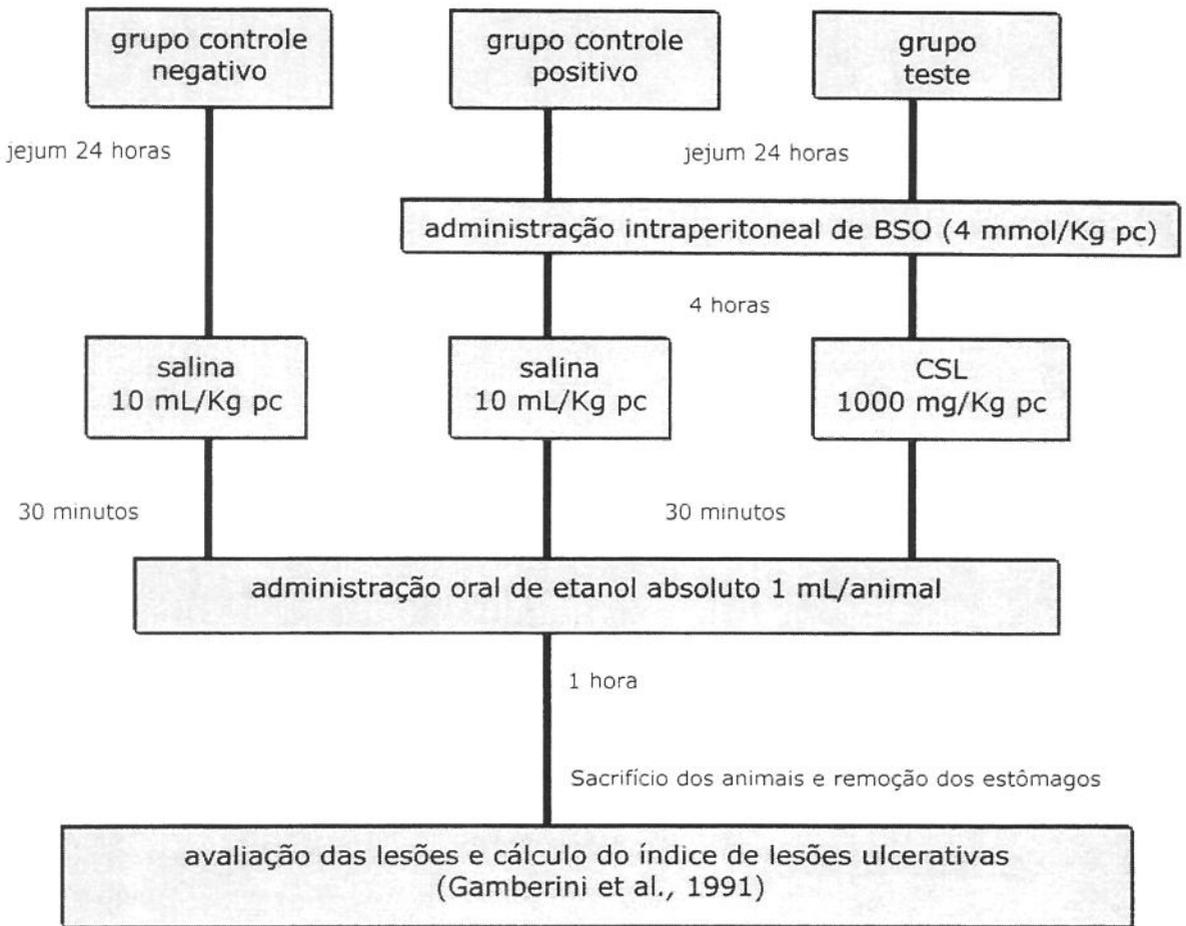
No modelo agudo foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 300-400g, divididos em 3 grupos de 5 animais. Após jejum de 24 horas os animais de 2 grupos receberam administração intraperitoneal de BSO de 4 mmol/Kg pc, 4 horas antes de receberem os respectivos tratamentos (salina como controle positivo e negativo e CSL como amostra teste).

Trinta minutos após os tratamentos os grupos receberam administração oral de etanol absoluto, e decorrida uma hora os animais foram sacrificados conforme protocolo descrito para modelo agudo de úlcera induzida por etanol.

O protocolo geral para este experimento é mostrado no fluxograma 7.

- **Modelo repetitivo**

Para o modelo repetitivo os animais receberam seus respectivos tratamentos (1 grupo com CSL e 2 grupos com salina) após jejum de 24 horas e submetidos posteriormente ao ciclo alternado de alimentação (8 horas com ração e água e 16 horas em jejum), antes de serem submetidos ao tratamento com o BSO. A partir deste ponto seguiu-se o protocolo como descrito no fluxograma 7.



Fluxograma 7. Administração intraperitoneal de BSO em modelo agudo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos.

3.3 Análise estatística

Todos os resultados dos experimentos com a participação do CSL na proteção da mucosa gástrica foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e Teste de *Duncan* para os quais foi utilizado como critério de significância estatística o nível crítico de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

4 Resultados

4.1 Composição aminoacídica do CSL

A composição em aminoácidos do CSL é ilustrada na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil de aminoácidos do CSL

aminoácidos	g/100g amostra (CSL)	g/100g proteína
Asparagina	9,55	11,39
Treonina	6,40	7,63
Serina	5,14	6,13
Glutamato	16,56	19,75
Prolina	5,55	6,61
Glicina	1,66	1,98
Alanina	4,42	5,27
Cisteína	2,28	2,71
Valina	5,04	6,01
Metionina	2,29	2,73
Isoleucina	5,29	6,30
Leucina	9,81	11,70
Tirosina	2,92	3,48
Fenilalanina	3,20	3,81
Lisina	9,27	11,05
Histidina	5,15	6,14
Arginina	1,45	1,73

Na composição de aminoácidos do CSL destacam-se os aminoácidos: ácido glutâmico, aminoácidos sulfurados como metionina, cisteína, leucina e lisina.

4.2 Avaliação da atividade antiulcerogênica

• Úlcera induzida por indometacina

No modelo agudo de úlcera induzida por indometacina o CSL, administrado por gavagem, na dose 1000 mg/kg pc, não apresentou atividade antiulcerogênica estatisticamente significativa, com uma porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas (ILU) de apenas 23,3%, enquanto que a droga antiulcerogênica (cimetidina) utilizada como controle positivo, administrada pela mesma via, na dose de 100 mg/kg pc, foi capaz de reduzir o ILU em 74,4%. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU, estão apresentados na Figura 1.

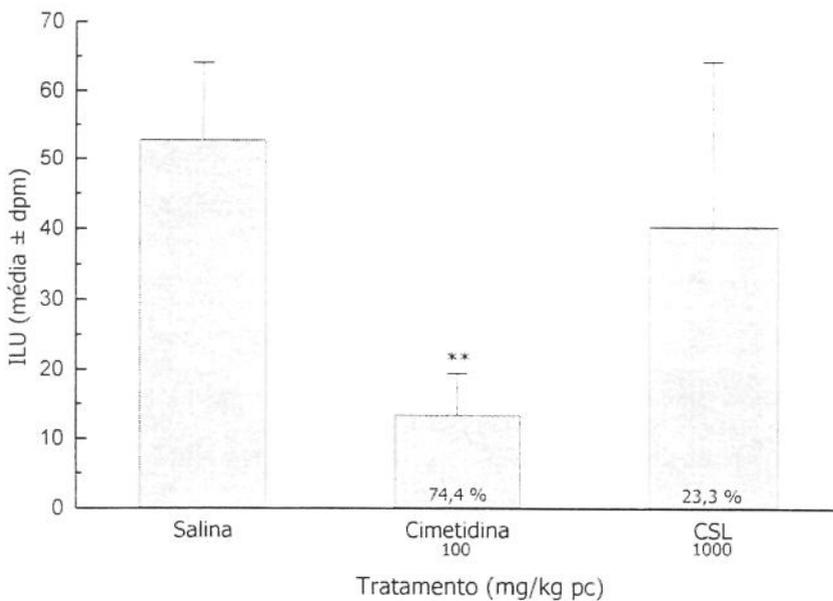


Figura 1. Efeito do tratamento agudo do CSL e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina. (ANOVA $F_{(2,14)} = 8,9$ $p < 0,01$. Teste de Duncan $**p < 0,01$ em relação à salina).

No modelo repetitivo de úlcera induzida por indometacina o CSL, administrado por gavagem, na dose 1000 mg/kg pc, apresentou atividade antiulcerogênica, com uma porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas (ILU) de 50,1%, enquanto que a droga antiulcerogênica (cimetidina) utilizada como controle positivo, administrada pela mesma via, na dose de 100 mg/kg pc, foi capaz de reduzir o ILU em 86,2%. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU, são apresentados na Figura 2.

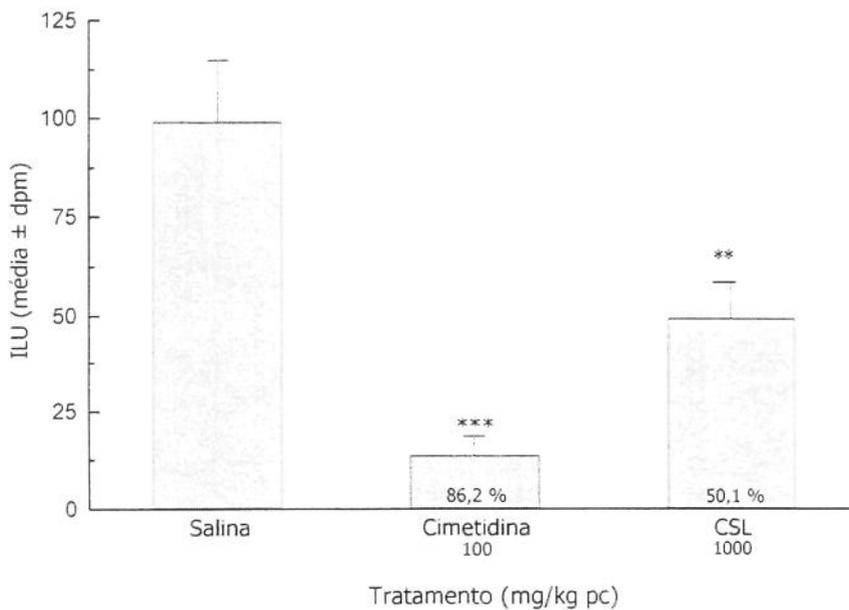


Figura 2. Efeito do tratamento repetitivo do CSL e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina. (ANOVA $F_{(2,14)} = 87,5$ $p < 0,001$. Teste de Duncan *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ em relação à salina).

No modelo subcrônico de úlcera induzida por indometacina o CSL, administrado por gavagem, na dose 1000 mg/kg pc, apresentou atividade antiulcerogênica, com uma porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas (ILU) de 44,0% enquanto que a droga antiulcerogênica (cimetidina) utilizada como controle positivo, administrada pela mesma via, na dose de 100 mg/kg pc, foi capaz de reduzir o ILU em 72,1%. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU, são mostrados na Figura 3.

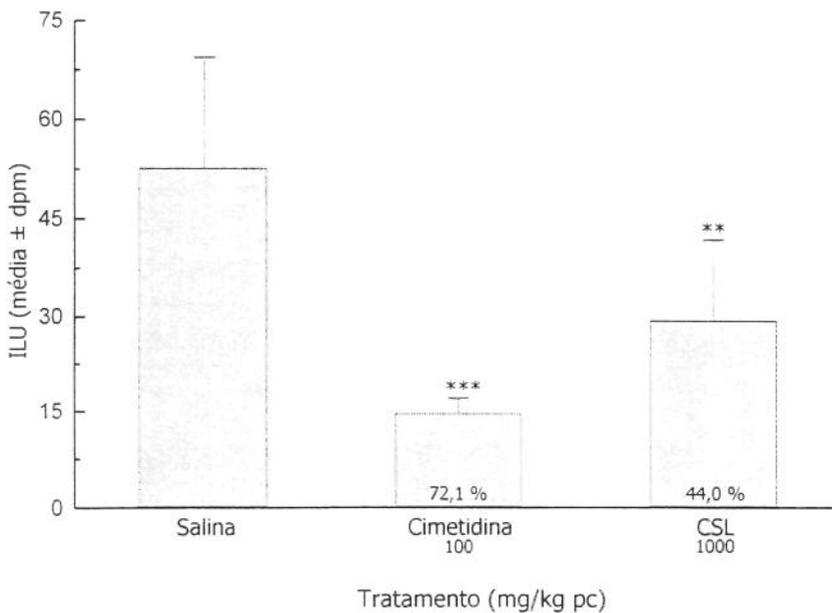


Figura 3. Efeito do tratamento subcrônico do CSL e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por indometacina. (ANOVA $F_{(2,15)} = 15,1$ $p < 0,001$. Teste de Duncan *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ em relação à salina).

• **Determinação da dose efetiva 50% (DE₅₀) no modelo de úlcera induzida por indometacina**

O efeito antiulcerogênico apresentado pelo CSL no modelo de úlcera induzida por indometacina, quando administrado oralmente em doses agudas de 300, 500, 1000 mg/kg pc, apresentou uma DE₅₀, calculada por regressão linear, de 756,23 mg/kg pc. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU e a porcentagem de inibição deste, são apresentados na Tabela 2 e o valor numérico da DE₅₀ foi calculado pela equação da reta demonstrado na Figura 4.

Tabela 2. Curva dose efetiva do CSL no modelo de úlcera induzida por indometacina.

tratamento	dose	ILU (média ± dpm)	% inibição ILU
salina	10 mL	71,8 ± 16,6	--
cimetidina	100 mg/Kg pc	16,6 ± 8,3 ***	76,9
CSL	300 mg/Kg pc	58,0 ± 11,4	19,2
CSL	500 mg/Kg pc	34,2 ± 21,5 **	52,4
CSL	1000 mg/Kg pc	40,5 ± 23,99 ***	74,4

ANOVA $F_{(4,20)} = 12,59$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ em relação à salina.

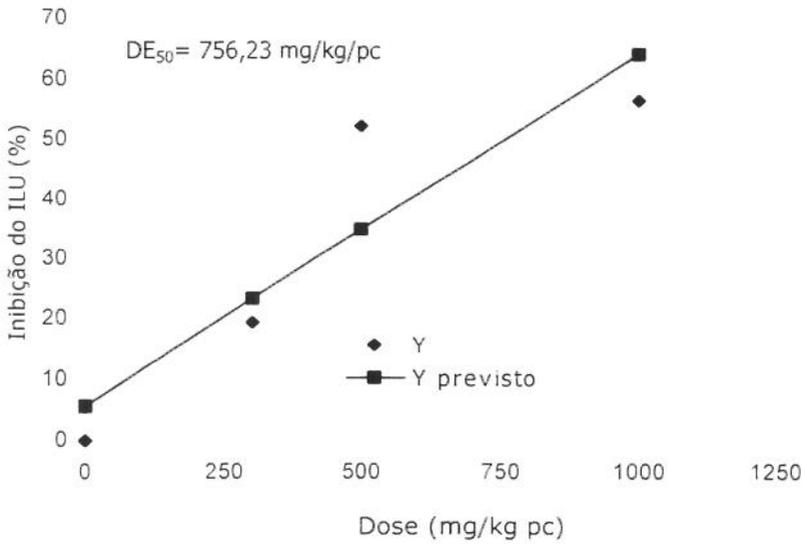


Figura 4. Curva dose efetiva do CSL em modelo de úlcera induzida por indometacina ($y = 0,058X + 5,80$ e $r = 0,903$).

• Úlcera induzida por etanol

No modelo agudo de úlcera induzida por etanol o CSL, administrado por gavagem, na dose 1000 mg/kg pc, apresentou inibição do índice de lesões ulcerativas de 40,7%, enquanto que carbenoxolona, administrada pela mesma via, na dose de 200 mg/kg pc, utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o ILU em 87,1%. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU, são apresentados na Figura 5.

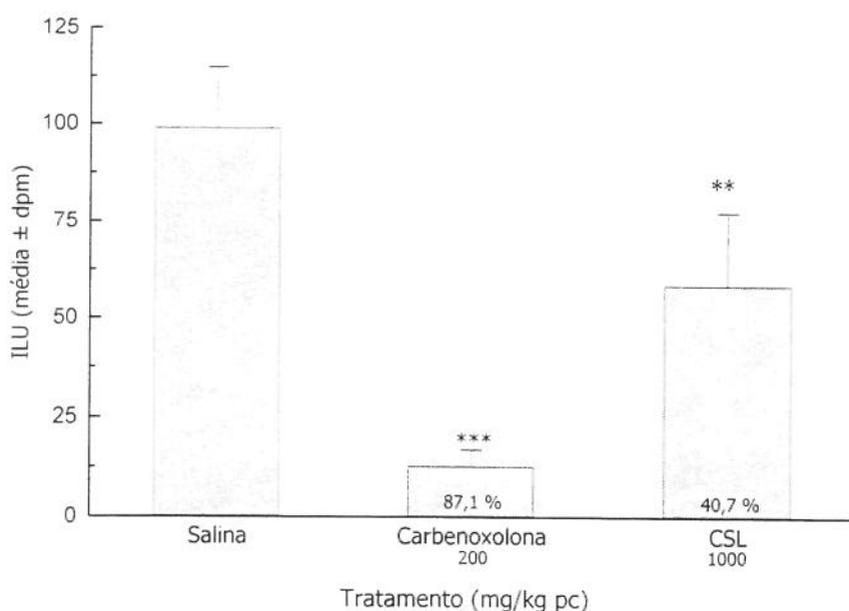


Figura 5. Efeito do tratamento agudo do CSL e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol. (ANOVA $F_{(2,14)} = 49,5$ $p < 0,001$. Teste de Duncan *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ em relação à salina).

No modelo repetitivo de úlcera induzida por etanol, o CSL administrado por gavagem, na dose 1000 mg/kg pc, apresentou atividade antiulcerogênica, com uma porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas (ILU) de 73,1%, enquanto que a droga antiulcerogênica (carbenoxolona) utilizada como controle positivo, administrada pela mesma via, na dose de 200 mg/kg pc, foi capaz de reduzir o ILU em 86,5%. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU, estão apresentados na Figura 6.

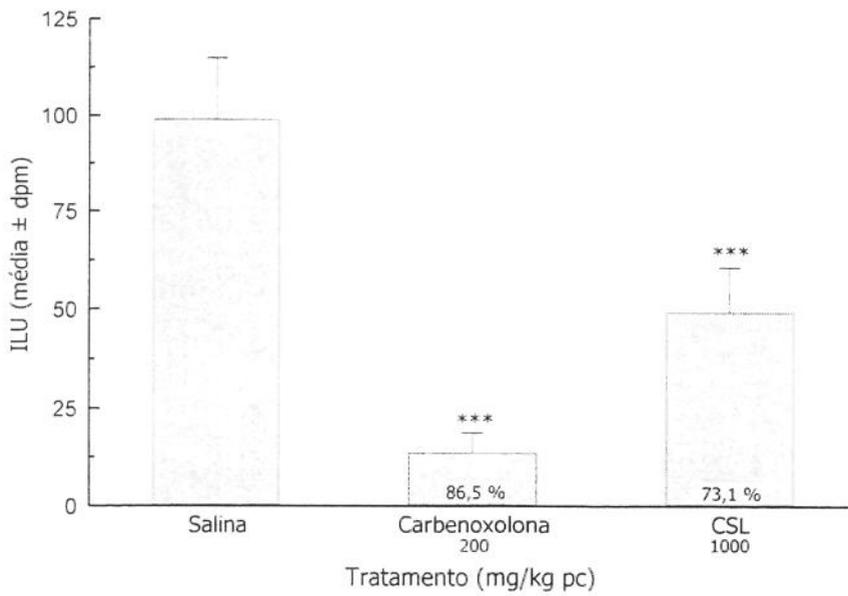


Figura 6. Efeito do tratamento repetitivo do CSL e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol. (ANOVA $F_{(2,14)} = 87,5$ $p < 0,001$. Teste de Duncan *** $p < 0,001$ em relação à salina).

No modelo subcrônico de úlcera induzida por etanol, o CSL administrado por gavagem, na dose 1000 mg/kg pc, apresentou atividade antiulcerogênica, com uma porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas (ILU) de 64,2% enquanto que a droga antiulcerogênica (carbenoxolona) utilizada como controle positivo, administrada pela mesma via, na dose de 200 mg/kg pc, foi capaz de reduzir o ILU em 87,5%. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU, são apresentados na Figura 7.

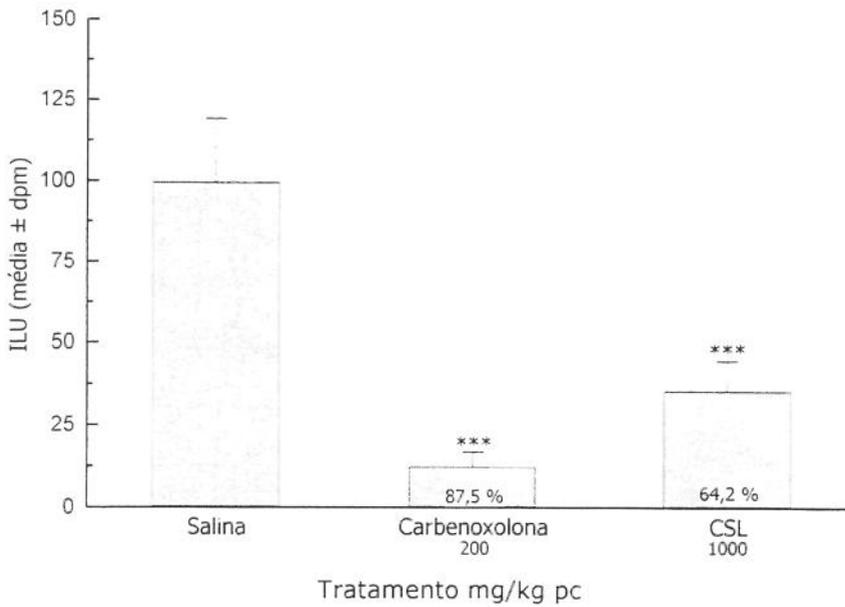


Figura 7. Efeito do tratamento subcrônico do CSL e da carbenoxolona, em modelo de úlcera induzida por etanol. (ANOVA $F_{(2,17)} = 88,3$ $p < 0,001$. Teste de Duncan *** $p < 0,001$ em relação à salina).

- **Determinação da dose efetiva 50% (DE₅₀) no modelo de úlcera induzida por etanol**

O efeito antiulcerogênico apresentado pelo CSL no modelo de úlcera induzida por etanol, quando administrado oralmente em doses agudas de 250, 500, 750 e 1000 mg/kg pc, apresentou uma DE₅₀, calculada por regressão linear, de 1310,0 mg/kg pc. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do ILU e a porcentagem de inibição deste, estão ilustrados na Tabela 3 e na Figura 8.

Tabela 3. Curva dose efetiva 50% do CSL no modelo de úlcera induzida por etanol.

tratamento	dose	ILU (média ± dpm)	% inibição ILU
salina	10 mL	112,0 ± 14,51	--
carbenoxolona	200 mg/Kg pc	16,8 ± 5,36***	76,9
CSL	250 mg/Kg pc	80,6 ± 7,23*	28,0
CSL	500 mg/Kg pc	90,6 ± 15,33*	19,1
CSL	750 mg/Kg pc	44,33 ± 14,56***	60,4
CSL	1000 mg/Kg pc	42,33 ± 11,88***	62,2

ANOVA $F_{(5,26)} = 149,84$ $p < 0,001$. Teste de Duncan *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ em relação à salina.

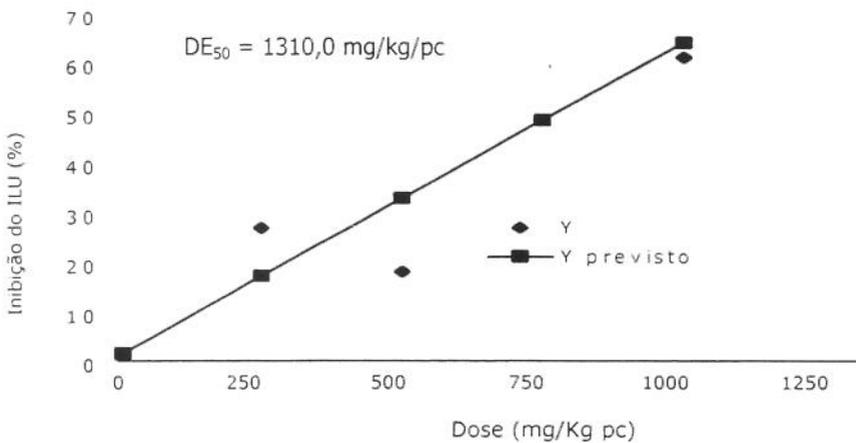


Figura 8. Curva dose efetiva 50% do CSL no modelo de úlcera induzida por etanol ($y=0,025X + 17,25$, $r: 0,84$).

• Úlcera induzida pelo estresse por imobilização e frio

No modelo de úlcera induzida pelo estresse por imobilização e frio o CSL, administrado na dose de 1000 mg/kg pc, via oral por gavagem, não apresentou atividade antiulcerogênica significativa, inibindo apenas 16,7% das lesões ulcerativas, enquanto que carbenoxolona, agente antiulcerogênico, administrada pela mesma via, na dose de 200 mg/kg pc, utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o ILU em 52,1%. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU, estão apresentados na Figura 9.

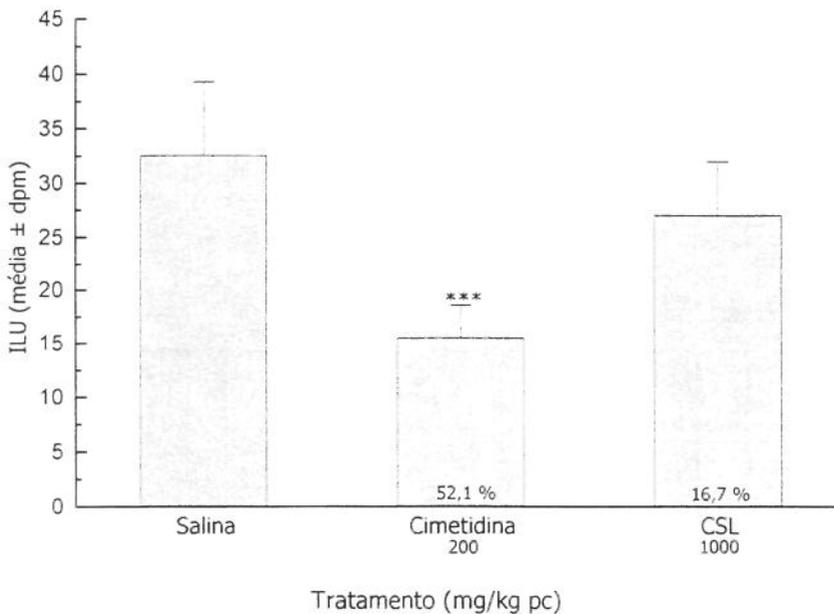


Figura 9. Efeito do tratamento agudo do CSL e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por estresse por imobilização e frio. (ANOVA $F_{(2,13)} = 14,7$ $p < 0,001$. Teste de Duncan $***p < 0,001$ em relação à salina).

No modelo repetitivo de úlcera induzida pelo estresse por imobilização e frio, o CSL administrado por gavagem, na dose 1000 mg/kg pc, não apresentou atividade antiulcerogênica significativa, com uma porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas (ILU) de 22,1%, enquanto que a droga antiulcerogênica (cimetidina) utilizada como controle positivo, administrada pela mesma via, na dose de 200 mg/kg pc, foi capaz de reduzir o ILU em 52,1%. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU, estão demonstrados na Figura 10.

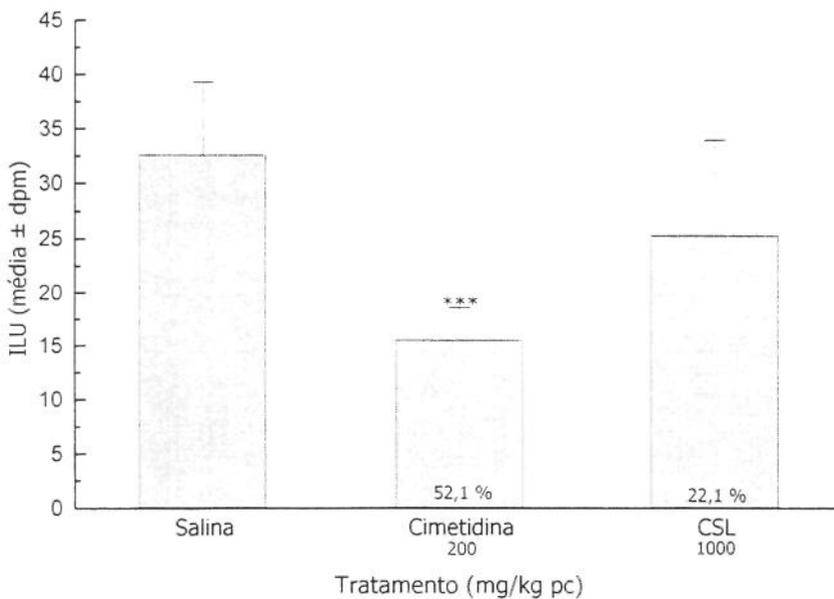


Figura 10. Efeito do tratamento repetitivo do CSL e da cimetidina, em modelo de úlcera induzida por estresse por imobilização e frio. (ANOVA $F_{(2,12)} = 8,9$ $p < 0,01$. Teste de Duncan *** $p < 0,001$ em relação à salina).

• Úlcera induzida por reserpina

No modelo agudo de úlcera induzida por reserpina o CSL administrado na dose 1000 mg/kg pc, por gavagem, não apresentou atividade antiulcerogênica, inibindo apenas em 23,8% as lesões ulcerativas, enquanto que atropina, administrada pela mesma via, na dose de 10 mg/kg pc, utilizada como controle positivo, reduziu o ILU em 53,2%. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU, estão mostrados na Figura 11.

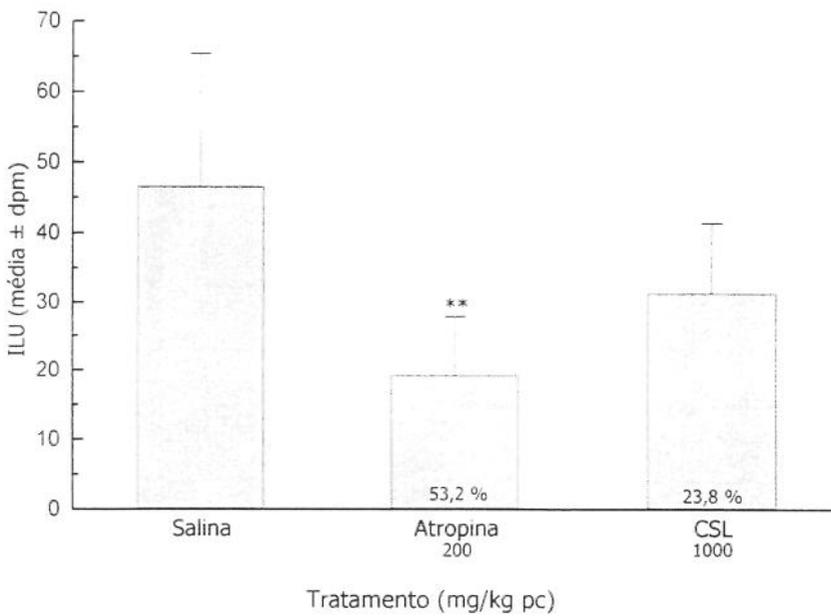


Figura 11. Efeito do tratamento agudo do CSL e da atropina em modelo de úlcera induzida por reserpina. (ANOVA $F_{(2,14)} = 6,23$ $p < 0,05$. Teste de Duncan $**p < 0,01$ em relação à salina).

No modelo repetitivo de úlcera induzida por reserpina o CSL administrado na dose 1000 mg/kg pc, por gavagem, não apresentou atividade antiulcerogênica, inibindo apenas 19,4% as lesões ulcerativas, enquanto que atropina, administrada pela mesma via, na dose de 10 mg/kg pc, utilizada como controle positivo, reduziu o ILU em 53,2%. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU, estão mostrados na Figura 12.

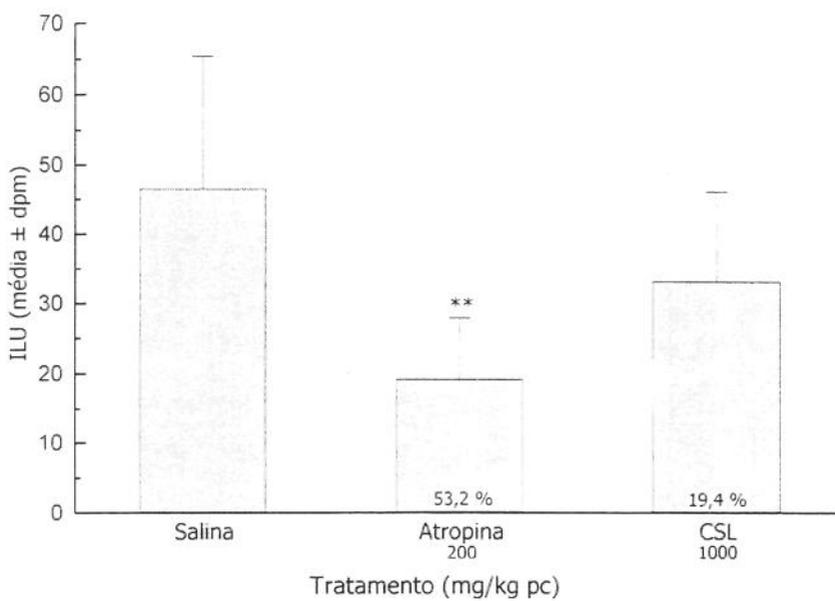


Figura 12. Efeito do tratamento repetitivo do CSL e da atropina em modelo de úlcera induzida por reserpina. (ANOVA $F_{(2,14)} = 5,47$ $p < 0,05$. Teste de Duncan $**p < 0,01$ em relação à salina).

• Estudo da participação das substâncias sulfidrila na citoproteção gástrica

No modelo agudo e repetitivo de úlcera induzida por etanol, com administração prévia de N-etilmaleimida (NEM) na dose de 10 mg/kg pc, por via intraperitoneal, o CSL na dose de 1000 mg/kg pc, por gavagem, não apresentou atividade antiulcerogênica significativa. Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU, são mostrados na Figura 13.

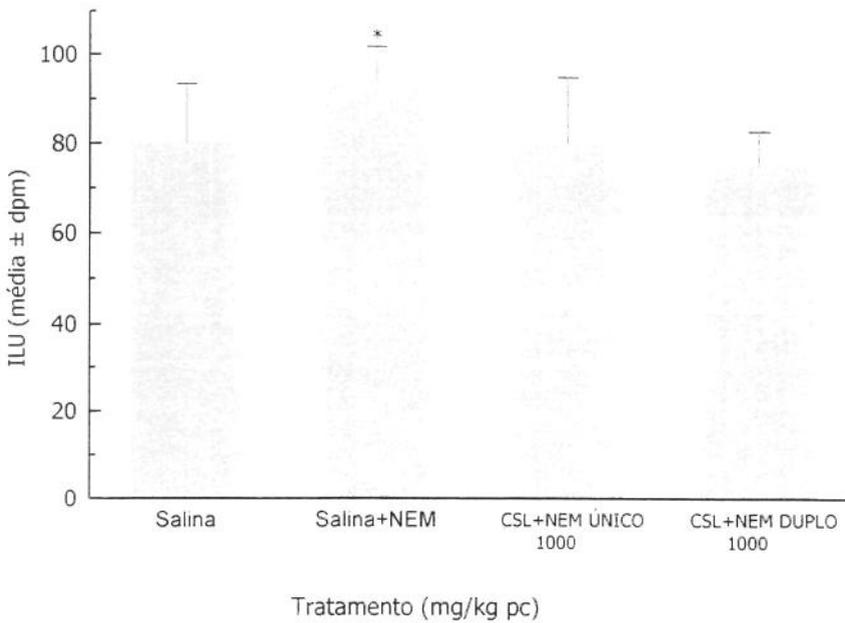


Figura 13. Efeito do tratamento agudo e repetitivo do CSL em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com NEM. (ANOVA $F_{(3,25)} = 4,53$ $p < 0,05$. Teste de Duncan * $p < 0,05$ em relação à salina+NEM).

• Participação da glutatona na citoproteção gástrica

No modelo agudo e repetitivo de úlcera gástrica induzida por etanol, com administração prévia de BSO 4 mmol/Kg pc, por via intraperitoneal, o CSL na dose de 1000 mg/kg pc, por gavagem, apresentou atividade antiulcerogênica inferior à proteção oferecida sem o tratamento com o BSO, mas superior à proteção após tratamento com NEM (Figura 13). Os resultados, expressos como média \pm desvio padrão da média do ILU, são mostrados na Figura 14.

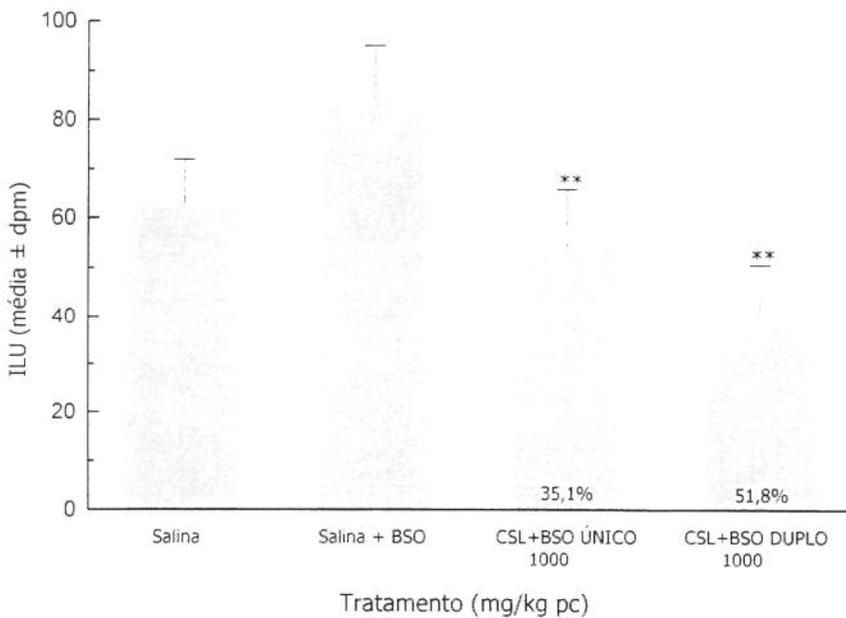


Figura 14. Efeito do tratamento agudo e repetitivo do CSL em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados previamente com BSO. (ANOVA $F_{(3,20)} = 15,30$ $p < 0,001$. Teste de Duncan $**p < 0,01$ em relação à salina+BSO).

5 *Discussão*

A úlcera gástrica tem se revelado um dos problemas mais comuns de saúde pública. Cerca de 50% dos indivíduos adultos sadios queixam-se de queimações gástricas, indicativo para lesões e formações de úlceras na mucosa, decorrentes de uma má-alimentação e estresse adicionado ao estilo de vida da população (Al Moutaery & Tariq, 1997; Rang et al., 2001; Penteado, 2001).

Por muito tempo acreditou-se que a hipersecreção de ácido gástrico era o fator principal e dominante no aparecimento e permanência da úlcera e que outros fatores externos como estresse, alimentação, bebidas alcoólicas e medicamentos pudessem apenas ser os fatores estimulantes (Hojgaard et al., 1996; Bighetti, 1999).

Hoje, há clareza nos fatores que ocasionam esta patologia. Há muitas drogas de potente efeito para o tratamento que, associado à dietoterapia, parecem ser de grande importância para a área clínica e qualidade de vida dos pacientes (Usdec, 2001).

Através de alguns estudos têm-se demonstrado que proteínas do leite têm importante papel em potencializar a defesa da mucosa gastrointestinal (Dial & Lichtenberger, 1987; Matsumoto, et al., 2001).

Este trabalho objetivou estudar os efeitos de um concentrado protéico de soro de leite bovino na inibição de lesões ulcerativas, através de diferentes modelos de indução da úlcera gástrica.

Para triagem da atividade antiulcerogênica do CSL foi utilizado o modelo de úlcera experimental induzida por indometacina (Morimoto

al., 1991). Este modelo de indução foi escolhido por tratar-se de um dos modelos mais completos afetando simultaneamente os mecanismos de citoproteção e de secreção ácida gástrica (Konturek & Pawlik, 1986; Morimoto et al., 1991; Katori & Majima, 1997; Bighetti, 1999).

A indometacina é um antiinflamatório não esteroide, inibidor da ciclooxigenase, enzima que converte ao ácido araquidônico em prostaglandinas, sendo esta a classe de substâncias mais importante no processo de citoproteção gástrica (Konturek & Pawlik, 1986; Morimoto et al., 1991; Katori & Majima, 1997; Bighetti, 1999).

Nesta triagem o CSL promoveu uma redução no índice de lesões ulcerativas (ILU) de 23,3%, um índice estatisticamente não significativo comparado com a cimetidina, agente antiulcerogênico utilizado para este modelo experimental e que administrada por via oral em dose única, inibiu 74,4% do ILU.

Portanto, havia a necessidade de testar o CSL em outros tratamentos, que por ser um alimento, poderia provocar efeito cumulativo em doses repetidas.

Para tal, quando administrado em duas doses, o CSL promoveu uma redução do ILU de 50,1%, estatisticamente significativo ($p < 0,001$), comparado com a cimetidina que foi de 86,2%, indicando que o CSL tem participação e efeito benéfico na proteção da mucosa gástrica para este agente lesivo, no tratamento repetitivo.

O resultado positivo das doses repetitivas motivou a realização de um experimento subcrônico. Portanto, realizou-se um tratamento durante 10 dias utilizando o CSL e a cimetidina como controle positivo.

O CSL reduziu o ILU em 44,0%, significativo no nível de 99% ($p < 0,01$) e a cimetidina em 72,1%, ($p < 0,001$).

Com estes resultados pode-se observar que o CSL teve uma importante participação na proteção da mucosa gástrica, comparada à droga antiulcerogênica específica utilizada, que promove a redução da secreção ácida através de um mecanismo competitivo no receptor H_2 da histamina, localizada na membrana basolateral da célula parietal. Além disto, o CSL no modelo de úlcera induzida por indometacina apresentou melhor atividade antiulcerogênica a partir de tratamento repetitivo e esta atividade não aumentou com doses sucessivas.

Matsumoto et al. (2001) relataram que uma proteína isolada do soro de leite bovino, a α -lactoalbumina, no modelo de úlcera induzida por indometacina, foi capaz de diminuir significativamente a lesão na mucosa gástrica, sugerindo que parte desta função protetora poderia ser através do estímulo que esta proteína é capaz de promover à síntese das prostaglandinas, importante agente protetor da mucosa gástrica contra diferentes agressões no estômago.

Segundo Baruchel et al. (1998) o CSL possui importantes concentrações de α -lactoalbumina. Este mecanismo pode estar relacionado ao seu efeito protetor no modelo de indução de úlcera por indometacina (Matsumoto et al., 2001). Neste trabalho não foi usada a α -lactoalbumina isolada, não sendo possível atribuir o efeito protetor a essa proteína.

Em função da ação antiulcerogênica promovida pelo CSL, buscou-se neste mesmo modelo, definir sua dose efetiva 50% (DE_{50}). Para esta finalidade diferentes doses foram testadas e por regressão linear,

determinou-se que a DE_{50} é de 756,23 mg/kg de peso corpóreo para o rato.

A análise comparativa do efeito do CSL e da cimetidina, uma droga antiulcerogênica comercialmente utilizada, sugere que o CSL poderia ser utilizado como um coadjuvante dietético no controle e/ou tratamento de úlcera gástrica provocada por antiinflamatórios não esteroidais, provavelmente como um mecanismo de proteção à mucosa gástrica.

Procurou-se também determinar se a atividade antiulcerogênica estaria presente em outros modelos de indução, avaliando sua possível participação em mecanismos de citoproteção ou de secreção ácida gástrica.

O modelo de indução de úlcera por etanol foi utilizado para definir a participação do CSL na citoproteção gástrica.

Segundo Matsumoto et al. (2001), a injúria causada pelo etanol pode levar a uma falta na difusão de íons hidrogênio para a barreira protetora que o muco é capaz de formar contra este agente lesivo. Além disto, mediadores da inflamação como leucotrieno e fator necrose tumoral, podem estar comprometidos por causa deste processo agressivo à mucosa.

A carbenoxolona, droga antiulcerogênica utilizada como controle positivo para este modelo de úlcera induzida, participa da citoproteção da mucosa alterando a composição e aumentando a quantidade de muco, acentuando portanto, a barreira mucosa ao ácido clorídrico (Brunton, 1996). No modelo agudo de úlcera induzida por etanol, esta

droga demonstrou uma redução do ILU em 87%, enquanto que o CSL reduziu o ILU em 40,7%, estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

No tratamento repetitivo observou-se uma redução no ILU de 73,1%, ($p < 0,001$) para o CSL e de 86,5% para a carbenoxolona. Estes dados demonstram que o CSL foi eficaz em promover a proteção da mucosa gástrica neste modelo de úlcera induzida através dos mecanismos de citoproteção contra a agressão provocada pelo etanol.

No tratamento subcrônico a redução do ILU para o CSL foi de 64,2% e para a carbenoxolona de 87,5%, resultado significativo ($p < 0,001$) e quando comparado com o modelo repetitivo seu efeito protetor foi igualmente eficaz.

Os dados sugerem que o mecanismo de ação do CSL pode estar relacionado com a citoproteção gástrica, por apresentar índices significativos de inibição das lesões gástricas comparados à droga antiulcerogênica específica utilizada como controle.

A DE_{50} do CSL para o modelo de indução por etanol foi de 1310,0 mg/kg de peso corpóreo. Se esta dose for comparada com a DE_{50} do CSL para úlcera induzida por indometacina, percebe-se que para o etanol é maior porque este modelo é muito mais agressivo à mucosa, necessitando assim, de concentrações maiores para haver um efeito do CSL na proteção da mucosa gástrica.

O modelo de estresse pela imobilização e frio reproduz importante efeito lesivo na mucosa gástrica, por isto, tem sido um dos mais descritos na literatura para modelos de indução de úlcera por estresse, por desencadear o mecanismo de ação da secreção ácida gástrica.

Portanto, este modelo foi utilizado para verificar a participação do CSL neste processo fisiológico.

No modelo de úlcera induzida por estresse causado por imobilização e pelo frio (Levine et al., 1971), a cimetidina reduziu o ILU em 52,1%, enquanto que o CSL em tratamento agudo e repetitivo não reduziu o ILU de forma significativa, não evidenciando uma participação importante em promover a inibição das lesões ulcerativas quando provocadas pelo mecanismo de ação que envolve o estresse, a secreção ácida gástrica, via ação colinérgica com produção de acetilcolina.

No modelo de úlcera induzida por indometacina e estresse, a cimetidina, agente antiulcerogênico utilizado, participa do bloqueio dos mecanismos de secreção ácida gástrica e promove a citoproteção, bloqueando os receptores H₂ das células parietais, inibindo a ação da histamina e promovendo a ação das prostaglandinas que protegem a mucosa gástrica (Rang et al., 2001).

O modelo de indução de úlcera gástrica por reserpina foi utilizado para avaliar a ação do CSL na secreção ácida gástrica, como no modelo de estresse, servindo para reafirmar a hipótese do não envolvimento do CSL na proteção da mucosa neste modelo de ulceração gástrica.

A atropina utilizada como controle neste modelo de úlcera induzida, é uma droga que participa do bloqueio neurogênico da secreção ácida gástrica, além disso, diminui a motilidade gástrica retardando o esvaziamento do conteúdo estomacal. Esta droga foi capaz em reduzir o ILU em 53,2%, enquanto que o CSL não reduziu de forma significativa o ILU, para tratamentos agudo e repetitivo, reforçando a

hipótese do não envolvimento do CSL com os mecanismos de secreção ácida gástrica.

Os mecanismos que induzem a secreção do ácido clorídrico pelas células parietais envolvem AMP_c como mediador da secreção estimulada pela histamina, enquanto a estimulação da acetilcolina é facilitada pela entrada do cálcio (Bighetti, 1999). Por isto, a atropina é indicada para tratamento de úlcera induzida por reserpina.

O CSL demonstrou uma importante participação na proteção da mucosa gástrica em modelos que estão envolvidos com a citoproteção. Para avaliar esta participação e demonstrar o envolvimento das substâncias sulfidrila presentes no CSL e descritas na literatura como capazes de promover, através do aumento da síntese da glutathione, proteção desta mucosa, os animais foram tratados previamente com sulfoximina de butionina (BSO), na dose de 4 mmol/Kg de peso corpóreo, no modelo agudo e repetitivo de úlcera induzida por etanol. O etanol é capaz de diminuir significativamente o conteúdo de grupamentos sulfidrila da mucosa gástrica (La Casa et al., 2000). Alguns autores demonstraram a importância da glutathione na proteção da mucosa gástrica (Martensson et al., 1990; Yamagushi et al., 1998; Hultberg et al., 1999).

Observou-se no modelo agudo de úlcera induzida por etanol com tratamento prévio com BSO que o CSL apresentou uma inibição do ILU. Quando comparados com os resultados do CSL no modelo de etanol sem a utilização do BSO, os dados demonstram que o CSL apresentou uma diminuição da sua capacidade de inibição do ILU no tratamento agudo de 40,7% para 35,1% ($p < 0,01$), e para o repetitivo de 73,1% para 51,8% ($p < 0,01$).

Estes resultados sugerem que o mecanismo antiulcerogênico do CSL está envolvendo a síntese de glutathiona, e esta, participa auxiliando o processo de citoproteção da mucosa gástrica, como citado em estudos utilizando BSO, em úlceras induzidas por etanol em roedores (Dial & Lichtenberger, 1987; Matsumoto et al., 2001).

Elevadas concentrações de substâncias sulfidríla são encontradas na mucosa gástrica e sabe-se que a presença destas substâncias esta intimamente relacionada com o mecanismo de citoproteção, por impedir um aumento da permeabilidade vascular e ainda bloquear a ação dos radicais livres tóxicos para as células desta mucosa (Szabo, 1981; Martin et al., 1998).

Para avaliar a participação do CSL no mecanismo que envolve substâncias sulfidríla na proteção da mucosa gástrica, utilizou-se N-etilmaleimida (NEM), no modelo de úlcera induzida por etanol, sendo este um composto capaz de promover a alquilação dos grupamentos sulfidríla, inativando-os.

Para o modelo agudo o CSL não reduziu de forma significativa o ILU, sugerindo que o mecanismo de ação antiulcerogênica do CSL possa envolver a participação de substâncias com grupamentos sulfidríla ativos, das quais a glutathiona é uma delas.

No modelo repetitivo o CSL também não apresentou índices significativos de proteção da mucosa quando se fez o tratamento prévio com NEM, tendo-se assim mais uma evidência do envolvimento de substâncias com grupamentos sulfidríla participando da citoproteção gástrica, visto que, quando alquilados, deixaram de exercer seu efeito

protetor, anulando a proteção oferecida pelo CSL sem pré-tratamento com NEM..

Nos modelos experimentais utilizados neste trabalho, o CSL inibiu significativamente o índice de lesões ulcerativas nos modelos repetitivos de úlceras induzidas por indometacina e etanol. Estes dois modelos estão relacionados com o mecanismo de citoproteção da mucosa gástrica.

Neste mecanismo de ação, as substâncias sulfidrila e outros agentes antioxidantes da mucosa, como a glutathione, parecem ser imprescindíveis para a defesa das células. Esta proteção oferecida à mucosa pelo CSL deve estar na dependência tanto do estímulo à síntese de glutathione como da elevada concentração de aminoácidos sulfurados, particularmente cisteína, limitante para a síntese da glutathione, presentes neste concentrado protéico. O estímulo à síntese de prostaglandinas, particularmente pela α -lactoalbumina, também deve ser considerado, segundo Matsumoto et al., 2001.

Deste modo, o CSL poderá ser uma alternativa importante na dietoterapia para a prevenção de lesões ulcerativas, garantindo melhores condições fisiológicas, possivelmente diminuindo a morbidade de pacientes com úlceras gástricas.

6 Conclusões

Os resultados desta pesquisa permitem concluir:

- O concentrado de soro de leite bovino (CSL) utilizado no tratamento prévio dos animais foi capaz de reduzir as lesões gástricas produzidas nos modelos de úlcera induzida por indometacina e por etanol, o que demonstra um possível envolvimento deste produto protéico no mecanismo de citoproteção.
- Os tratamentos repetitivos e subcrônicos para os modelos de úlcera induzida por indometacina e etanol foram os que apresentaram melhor proteção da mucosa gástrica, demonstrando que este efeito protetor parece ser mais eficaz a partir de duas doses e que este efeito parece estabelecer um nível máximo de proteção próximo com o tratamento subcrônico.
- Nos estudos do mecanismo de ação da secreção ácida gástrica nos modelos de úlcera induzida pelo estresse por imobilização e frio e por reserpina, o CSL não apresentou redução significativa do ILU, o que demonstra que a atividade antiulcerogênica deste produto parece não ser mediada por este mecanismo.

- No estudo do mecanismo de ação do CSL através da promoção da síntese da glutathione foi utilizado sulfoximina de butionina (BSO), bloqueador da síntese da glutathione, em modelos agudo e repetitivo de úlcera induzida por etanol, o qual demonstrou que o CSL foi capaz de inibir parcialmente as lesões desta mucosa, evidenciando a participação da glutathione na citoproteção gástrica, embora outros mecanismos devam estar envolvidos nesta proteção.

- A utilização do N-etilmaleimida (NEM), alquilante dos grupamentos sulfidríla envolvidos no mecanismo da citoproteção, nos modelos agudos e repetitivos de úlcera induzida por etanol demonstrou-se uma eliminação da ação protetora do CSL, indicando que as substâncias sulfidrílas são responsáveis pela proteção da mucosa gástrica.

7 Referências Bibliográficas

ALARCON DE LA LASTRA, C; MOTILVA, V; MARTÍN, M.J; NIETO, A; BARRANCO, M.D; CABEZA, J; HERREIRAS, J.M. **Protective effect of melatonin on indomethacin induced gastric injury in rats.** Journal Pineal Research, Copenhagen. v.26, n.2, p.101-107, 1999.

ALLEN, A; FLEMSTRÖM, G; GARNER, A; KIVILAAKSO, E. **Gastroduodenal mucosal protection.** Physiological Reviews, Baltimore. v.73, n.4, p.823-857, 1993.

AL MOUTAERY, A .R.; TARIQ, M. **Effect of quinacrine, a phospholipase A2 inhibitor on stress and chemically induced gastroduodenal ulcers.** Digestion, Basel. v.58, p.129-137, 1997.

ALTOMARE, E; GRATTAGLIANO, I; DIDONNA, D; GENTILE, A; VENDEMIALE, G. **Gastric and intestinal ethanol toxicity in the rats. Effect of glutathione level and role of alcohol and acetaldehyde metabolism.** Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology, Ospedaletto. v.30, n.1, p.82-90, 1998.

ANDERSON, M.E. **Glutathione: an overview of biosynthesys and modulation.** Chemico-Biological Interaction, Limerick. v.111-112, p.1-14, 1998.

BARUCHEL, S; WANG, T; FARAH, R; JAMALI, M; BATIST, G. **In vivo modulation of tissue glutathione in a rat mammary carcinoma model.** Biochemical Pharmacological, New York. v.50, n.9, p.1505-1508, 1995.

BARUCHEL, S.; VIAU, G.; OLIVIER, R.; BOUNOUS, G.; WAINBERG, M.A.; Nutraceutical modulation of glutathione with a humanized native milk serum protein isolate, Immunocal™: application in AIDS and cancer. In: Montagner, L.; Olivier, R.; Pasquier, C. **Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases**. New York: Marcel Dekker, 1998. cap. 42, p. 447-462.

BIGHETTI, A.E. **Atividade Antiulcerogênica do extrato bruto e da cumarina isolada da *Mikania laevigata* Schultz Bip.** Campinas, 1999. 100p. Dissertação (Mestre em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

BORGES, P.F.Z; SGARBIERI, V.C; JACOBUCCI, H.B; PACHECO, M.T.B; BALDINI, V.L.S. **Produção piloto de proteína de leite bovino: composição e valor nutritivo.** Brazilian Journal Food Technology, Campinas. v.4, n.52, p.1-8, 2001.

BOUNOUS, G; KONGSHAVN, P.A.L. **Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice.** Journal of Nutrition, Philadelphia. v.115, p.1403-1408, 1985.

BOUNOUS, G; KONGSHAVN, P.A.L; GOLD, P. **The immunoenhancing property of dietary whey protein concentrate.** Clinical Investigative Medicine, Ottawa. v.11, n.4, p.271-278, 1988.

BOUNOUS, G; GERVAIS, F; AMER, V; BATIST, G; GOLD, P. **The influence of dietary whey protein on tissue glutathione and diseases of aging.** Clinical Investigative Medicine, Ottawa. v.12, p.343-349, 1989a.

BOUNOUS, G; BATIST, G; GOLD, P. **Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione.** Clinical Investigative Medicine, Ottawa. v.12, n.3, p.154-161, 1989b.

BOUNOUS, G; GOLD, P. **The biological activity of undenatured dietary whey protein: role of glutathione.** Clinical Investigative Medicine, Ottawa. v.14, n.4, p.296-309, 1991.

BOUNOUS, G; BARUCHEL, S; FALUTZ, J; GOLD, P. **Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals.** Clinical Investigative Medicine, Ottawa. v.16, n.3, p.204-209, 1993.

BOUNOUS, G. **The fascinating story behind a health-promoting product-patented milk serum (whey) protein concentrate.** Immunotec Research. p.1-16, 1997.

BOYD, S.C; SASAME, H.A; BOYD, M.R. **Gastric glutathione depletion and acute ulcerogenesis by dimethylmaleate given subcutaneously to rats.** Life Sciences, New York. v.28, n.26, p.2987-2992, 1981.

BRINK, W. **That fights disease and extends lifespan.** Life Extension Report. p.21-28, Jan., 1996. Acesso em: 31/01/02. Disponível em: <http://www.lef.org/magazine/mag96/mag96_all.html>

BRINK, W. **Fighting cancer with whey.** Life Extension Report. p.13-15, Nov., 1997. Acesso em: 31/01/02. Disponível em: <http://www.lef.org/magazine/mag97/mag97_11.html>

BRINK, W. **The wonders of whey.** Life Extension Report. p.35-38, May, 1999. Acesso em: 31/01/02. Disponível em: <http://www.lef.org/magazine/mag99/mag99_5.html>

BRUNTON, L.L. Fármacos para controle da acidez gástrica e tratamentos de úlceras pépticas. In: Hardman, J.; Limbird, L.E. **Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica.** 9 ed. México: Mc Grawhill, 1996. cap. 37, p.663-674.

BULGER, E.M; HELTON, W.S. **Nutrient antioxidants in gastrointestinal diseases.** Clinical Nutrition, Saint Louis. v.27, n.2, p.403-419, 1998.

COTGREAVE, I.A.; GERDES, R.G. **Recent trends in glutathione biochemistry – glutathione – protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation?** Biochem. Biophysical Research Communications, Orlando. v.242, n.1, p.1-9, 1998.

DAS, D.; BANERJEE, R.K. **Effects of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration.** Molecular Cell Biochemical, Amsterdam. v.125, n.2, p.115-125, 1993.

DIAL, E.J; LICHTENBERGER, L.M. **milk protection against experimental ulcerogenesis in rats.** Digestive Diseases and Sciences, New York. v.32, n.10, p.1145-1150, 1987.

DIAS, P.C. **Atividade antiulcerogênica dos extratos brutos e das frações semipurificadas de Artemisia annua L.** Campinas, 1997. 85p. Dissertação (Mestre em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

DIAS, P.C; FLOGIO, M.A; POSSENTI, A; CARVALHO, J.E. **Antiulcerogenic activity of crude hidroalcoholic extract of Rosmarinus officinalis L.** Journal Ethnopharmacology, Limerick. v.69, n.1, p.57-62, 2000.

DUTRA-DE-OLIVEIRA, J.E; MARCHINI, J.S; **Ciências Nutricionais.** São Paulo: Sarvier, 1998.

ELLIOT, S.N.; MSKNIGHT, W.; CIRINO, G.; WALLACE, J.L. **A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats.** Gastroenterology, Amsterdam. v.109, n.2, p.524-530, 1995.

FELIX, W.L.; MILLER, J.C.; GUTH, P.H. **Dissociated effects of misoprostol on gastric acid secretion and mucosal blood flow.** Digestive Diseases and Sciences, New York. v.31, n.2, p.86S-90S. 1986.

FIDELUS, R.K.; TSAN, M.F. **Glutathione and lymphocytes activation: a function of ageing and auto-immune disease.** Immunology, Oxford. v.61, p.503-508, 1987.

FONSECA, L.M.; FONSECA, C.S.P.; BRANDÃO, S.C.C. **Propriedades anticarcinogênicas de componentes do leite.** Indústria de Laticínios, Porto Alegre. v.4, n.21, Mai/Jun., p.6-9, 1999.

GAMBERINI, M.T., SKORUPA, L.A., SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. **Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* mart.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. v.86 (Suppl. II), p.137-139, 1991.

GUPTA, M.B., TANGRI, K.K., BHARGAVA, K.P. **Mechanism of ulcerogenic activity of reserpine in albino rats.** European Journal of Pharmacology, Amsterdam. v.27, n.2, p.269-271, 1974.

HASLER, C.M. **A new look at an ancient concept.** Chemical Industry, Baltimore. v.2,n.2, p.84-89, 1998.

HIRAIISHI, H; TERANO, A; OTA, S; MUTOH, H; SUGIMOTO, T; HARADA, T; RAZANDI, M; IVEY, K.J. **Protection of cultured rat gastric cells against oxidant-induced damage by exogenous glutathione.** Gastroenterology, Amsterdam. v.106, n.5, p.1199-1207, 1994.

HIRAIISHI, H; SHIMADA, T; IVEY, K.J; TERANO, A. **Role of antioxidant defenses against ethanol-induced damage in cultures rat gastric epithelial cells.** Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutic, Bethesda. v.289, n.1, p.103-109, 1999.

HIRSCHOWITZ, B.I.; KEELING, D.; LEWIN, M.; OKABE, S.; PARSONS, M.; SEWING, K.; WALLMARK, B.; SACHS, G. **Pharmacological aspects of acid secretion.** Digestive Diseases and Sciences, New York. v.40, n.2, p.3S-23S, 1995. *In*: DIAS, P.C. **Atividade antiulcerogênica dos extratos brutos e das frações semipurificadas de *Artemisia annua* L.** Campinas, 1997. 85p. Dissertação (Mestre em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

HOJGAARD, L.; NIELSON, A.M.; RUNE, S.J. **Peptic Ulcer Pathophysiology: Acid, Bicarbonate, and Mucosal Function.** Scandinavian Journal of Gastroenterology, Stockholm. v.31, suppl 216, p.10-15, 1996.

HULTBERG, B.; ANDERSSON, A.; ISAKSSON, A. **Thiol and redox reactive agents exert different effects on glutathione metabolism in HeLa cell cultures.** Clinica Chimica Acta, Amsterdam. v.283, n. 1-2, p.21-32, 1999.

JACOBUCCI, H.B. **Características nutricionais e efeito sobre lipídeos sanguíneos e hepáticos das proteínas de lactosoro e caseinato de sódio, comparados à caseína e proteína de soja, comerciais.** Campinas, 1999. 82p. Dissertação (Mestre em Ciências da Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

KATO, S.; KITAMURA, M.; KOROLKIEWICZ, R.P.; TAKEUCHI, K. **Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: effects of NO donors and NO synthase inhibitor.** British Journal of Pharmacology, Hants. v.123 n.5, p.839-846, 1998.

- KATORI, M.; MAJIMA, M. **Multiple roles of inducible cyclooxygenase-2 and its selective inhibitors.** Nippon Yakurigaku Zasshi, Tokyo. v.109, n.6, p.247-258, 1997. In: BIGHETTI, A.E. **Atividade Antiulcerogênica do extrato bruto e da cumarina isolada da *Mikania laevigata* Schultz Bip.** Campinas, 1999. 100p. Dissertação (Mestre em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.
- KENNEDY, R.S; KONOK, G.P; BOUNOUS, G; BARUCHEL, S; LEE, T.D.G. **The use of a whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: a phase I-II clinical study.** Anticancer Research, Attiki. v.15, n.6B, p.2643-2650, 1995.
- KONTUREK, S.J.; PAWLIK, W. **Physiology and pharmacology of prostaglandins.** Digestive Diseases and Sciences, New York. v.31, n.2, p.6S-19S, 1986.
- KONTUREK, S.J; BROZOWSKY, T; PYTKO-POLONCZYK, J; DROZDOWICZ, D. **Comparison of cholecystikinin, pentagastrin and duodenal oleate in gastroprotection in rats.** Scandinavian Journal of Gastroenterology, Stockholm. v.30, n.7, p.620-630, 1995.
- KONTUREK, S.J; BROZOWSKY, T; KONTIREK, S.I; MÁRQUEZ, M; TORRES, J; ORTIZ, J.A. **Studies on the cytoprotetion and antisecretory activity of ebrotidine. A review.** Arzneimittelforschung, Basel. v.47, n.4A, p.578-589, 1997. In: BIGHETTI, A.E. **Atividade Antiulcerogênica do extrato bruto e da cumarina isolada da *Mikania laevigata* Schultz Bip.** Campinas,

1999. 100p. Dissertação (Mestre em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

LA CASA, C; VILLEGAS, I; ALARCÓN DE LA LASTRA, C; MOTILVA, V. MARTIN CALERO, M.J. **Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions.** Journal of Ethnopharmacology, Limerick. v.71, n.1-2, p.42-53, 2000.

LAJOLO, F.M. Legislação dos Alimentos Funcionais. In: Simpósio Alimentos Funcionais para o Novo Milênio: qualidade de vida e saúde. 2000, Campinas. **Anais.** Campinas: Unicamp, 2000. p.9.

LEVINE, R.J. **A method for rapid production of stress ulcers in rats.** Peptic Ulcer. p.92-97, 1971. In: BIGHETTI, A.E. **Atividade Antiulcerogênica do extrato bruto e da cumarina isolada da *Mikania laevigata* Schultz Bip.** Campinas, 1999. 100p. Dissertação (Mestre em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

LOGUERCIO, L.C; TARANTO, D; BENEDEUCE, F; DEL VECCHIO BLANCO, C; DE VINCENTEIS, A; NARDI, G; ROMANO, M. **Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans.** Gut, London. v.34, n.2, p.161-165, 1993.

LOGUERCIO, C; PISCOPO, P; GUERREIRO, C; DE GIROLAMO, V; DISALVO, D; DEL VECCHIO BLANCO, C. **Effect of alcohol abuse and glutathione administration on the circulating levels of glutathione and on antipyre metabolism in patients with**

alcoholic liver cirrhosis. Laboratory Investigation, Baltimore. v.56, n.5, p.441-447, 1996.

LOGUERCIO, C.; DI PIERRO, M. **The role of glutathione in the gastrointestinal tract: a review.** Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology, Ospedaletto. v.31, n.5, p.401-407, 1999.

MAHAN, L.K; ARLIN, M.T. **Krause Alimentos, Nutrição e Dietoterapia.** 8 ed. São Paulo: Roca, 1995.

MARTENSSON, J.; JAIN, A.; MEISTER, A. **Glutathione is required for intestinal function.** Proceeding National of the Academy of the Sciences of the United States of America, Washington. v.87, n.5, p.1715-1719, 1990.

MARTIN, M.J; LA CASA, C; ALARCÓN DE LA LASTRA, C; CABEZA, J; VILLARGAS, J; MOTILVA, V. **Antioxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin.** Z. Naturforsch (C), v.53 n.1-2, p.82-88, 1998. *In:* Bighetti, A.E. **Atividade Antiulcerogênica do extrato bruto e da cumarina isolada da *Mikania laevigata* Schultz Bip.** Campinas, 1999. 100p. Dissertação (Mestre em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

MATSUMOTO, H; SHIMOKAWA, Y; USHIDA, Y; TOIDA, T; HAYASAWA, H. **New biological function of bovine α -lactoalbumin: protective effect against ethanol and stress-induced gastric mucosal injury in rats.** Bioscience Biotechnology Biochemical, Tokyo. v.65, n.5, p.1104-1111, 2001.

MCINTOSH, G.H; ROYLE, P.J; LE LEU, R.K; ROGESTER, G.O; JOHNSON, M.A; GRINSTED, R.L; KENWARD, R.S; SMITHERS, G.W. **Whey protein as functional food ingredients?** International Dairy Journal, Barking. v.8, n.5-6, p.425-434, 1998.

MEISTER, A. **Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy.** Pharmacology Therapeutics. v.51, n.2, p.155-194, 1991.

MORIMOTO, Y; SHIMOHARA, K; OSHIMA, S; KAKAYUKI, S. **Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal less and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine.** Japan Journal Pharmacological, Osaka. v.57, n.4, p.495-505, 1991.

NOVARTIS – Movimento em Medicina. São Paulo: Novartis Biociências, ano XI, n.2, p.12-15, 2001.

OVREBO, K.K; SVARDAL, A; KVINNSLAND, S; GRONG, K; SVANES, K; SORBYE, H. **Glutathione modulation changes the penetration of N-(H³)methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine into gastric mucosal of rats.** Digestive Diseases and Sciences, New York. v.44, n.10, p.2063-2075, 1999.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; CARVALHO, P.O. **Recentes progressos dos alimentos funcionais.** Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas. v.31, n.2, p.200-206, 1997.

PARODI, P.W. **A role for milk protein in cancer prevention.** The Australian Journal of Dairy Techonology, Highett. v.53, n.1, p.37-47, 1998.

PENTEADO, J.F. **Úlcera Péptica: uma doença nova, uma nova doença ou uma síndrome multifatorial.** Acesso em: 04/07/2001. Disponível em: <<http://www.riogastroclinica.com.br>>

PONTES, J.F.; MARCHESE, M.A.; MAGALHÃES, M.B. Farmacologia e tratamentos das doenças do estômago e duodeno. In: SILVA, P. **Farmacologia.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 88, p.830-853.

RANG, H.P; DALE, M.M; RITTER, J.M. **Farmacologia.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RASTOGI, L.; PATNAIK, G.K.; DIKSHIT, M. **Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury rats.** Pharmacological Research, London. v.38, n.2, p.125-132, 1998.

ROBERT, A. **Cytoprotection by prostaglandins.** Gastroenterology, Philadelphia. v.77, n.4, p.761-767, 1979.

ROBERT, A; EBERLE, D; KAPLOWITZ, N. **Role of glutathione mucosal cytoprotection.** American Journal Physiology, Baltimore. v.247, n.3 Pt 1, p. G 296-304, 1984.

ROSANELI, C.F.; SGARBIERI, V.C.; BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; CARVALHO, J.E. Efeito de um concentrado de soro de leite bovino (CSL) em úlcera gástrica induzida por etanol em modelos experimentais. In: 4º Simpósio Latino Americano de Ciências dos Alimentos. 2001, Campinas. **Anais**. Campinas: Unicamp. p.350.

SALGADO, J.M. Novas fronteiras da ciência da nutrição no Brasil e no mundo. In: Simpósio Alimentos Funcionais para o Novo Milênio: qualidade de vida e saúde. 2000, Campinas. **Anais**. Campinas: Unicamp, 2000. p.18-19.

SANIHELP ENCICLOPÉDIA. Acesso em: 14/12/2001. Disponível em: <<http://www.sanihelp.it>>

SCHUBERT, M.L. **Regulation of gastric secretion**. Current Opinion in Gastroenterology, New York. v.10, p.575-588, 1994.

SELLERS, L.A.; CARROL, N.J.H.; ALLEN, A. **Misoprostol-induced increases in adherent gastric mucus thickness and luminal mucus output**. Digestive Diseases and Sciences, New York. v.31, n.2, p.91S-95S, 1986. In: DIAS, P.C. **Atividade antiulcerogênica dos extratos brutos e das frações semipurificadas de *Artemisia annua* L.** Campinas, 1997. 85p. Dissertação (Mestre em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

SEN, C.K. **Nutritional biochemistry of cellular glutathione**. Journal of Nutrition Biochemistry, New York. v.8, n.12, p.660-672, 1997.

SGARBIERI, V.C. **Food protein and peptides presenting specific protection to human health (a review)**. In: Food for health in the Pacific Rim, Food and Nutrition Press, Inc., Trumbull, Conn, 1999, p.335-352.

SGARBIERI, V.C. Proteínas e peptídios com propriedades funcionais fisiológicas. In: Simpósio Alimentos Funcionais para o Novo Milênio: qualidade de vida e saúde. 2000, Campinas. **Anais**. Campinas: Unicamp, 2000. p.14-15.

SILVA, E.P.; SILVA, D.F.S.; JANSEN, J.T.; LUDVIG, J.C.; NOGARA, M.A.S. **Úlcera Péptica**. Revista Brasileira de Medicina, São Paulo. v.54, p.83-96, 1997.

SMEDFORS, B.; JOHANSSON, C. **Stimulation of duodenal bicarbonate secretion by misoprostol**. Digestive Diseases and Sciences, New York. v.31, n.2, p.96S-100S, 1986.

SMITH, G.S.S; TORNWALL, M.S; BARRETO, J.C; MILLE, T.A. **Gastric injury and protection against alcohol and acid: influence of perturbations in glutathione metabolism**. Journal of Surgical Research, San Diego. v.61, n.2, p.395-403, 1996.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

SZABO, S. **Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection**. Science, Washington. v.214, n.4517, p.201-202, 1981.

SZABO, S; NAGY, L; PEVEBANI, M. **Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection.** Clinica Chimica Acta, Amsterdam. v.206, n.1-2, p.95-105, 1992.

TAKEUCHI, K; OKADA, M; NIIDA, H; OKABE, S. **Role of sulfhydryls in mucosa injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric motility and citoprotetion.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Baltimore. v.248, n.2, p.836-841, 1989.

USDEC NEWS INGREDIENTS. v.3, n.2, p.5, oct., 2000.

USDEC NEWS INGREDIENTS. v.3, n.3, p.2, jan., 2001.

VERHULST, M.L; VAN OIJEN, A.H; ROELOFS, H.M; PETER, W.H; JANSEN, J.B. **Antral glutathione concentration and glutathione S-transferase activity in patients with and without *H. Pylori*.** Digestive Diseases of Sciences, New York. v.45, n.3, p.629-632, 2000.

VITOR, B.E; SCHMIDT, K.L; SMITH, G.S; MILLER, T.A. **Protection against ethanol injury in the canine stomach: role of mucosal glutathione.** American Journal Physiological, Bethesda. v.261, n.6 Pt 1, p.G 966-973, 1991.

WAKULICH, C.A.; TEPPERMAN, B.L. **Role of glutathione in nitric oxide-mediated injury to rat gastric mucosal cells.** European Journal of Pharmacology, Tokyo. v.319, n.2-3, p.333-341, 1997.

WALLACE, J.L.; CHIN, B.C. **Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury.** Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Malden, v.214, n.3, p.192-203, 1997. *In:* BIGHETTI, A.E. **Atividade Antiulcerogênica do extrato bruto e da cumarina isolada da *Mikania laevigata* Schultz Bip.** Campinas, 1999. 100p. Dissertação (Mestre em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

WALZEM, R.L. **Health enhancing properties of whey proteins and fractions.** Usdec/Applications Monograph, p.108, 1999.

WOODWARD, B. **Protein, calories e immune defenses.** Nutrition Reviews, New York. v.56, n.1, p.584-592, 1998.

YAMAGUCHI, N.; YAJIMA, N.; ISHIDA, M.; SHIMADA, T.; HIRAISHI, H. **Protection of cultured gastric cells against *tert*-butyl hidroperoxide by glutathione isopropyl ester.** European Journal of Pharmacology, Tokyo. v.351, n.3, p.363-369, 1998.