



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITOS DOS COMPOSTOS DE SELÊNIO E ZINCO NAS LESÕES
GASTROINTESTINAIS INDUZIDAS POR ETANOL EM RATOS**

TESE DE DOUTORADO

Rafael Porto Ineu

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**EFEITOS DOS COMPOSTOS DE SELÊNIO E ZINCO NAS LESÕES
GASTROINTESTINAIS INDUZIDAS POR ETANOL EM RATOS**

Rafael Porto Ineu

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Ester Pereira

Santa Maria, RS, Brasil

2012

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Porto Ineu, Rafael
Efeitos dos compostos de selênio e zinco nas lesões
gastrointestinais induzidas por etanol em ratos / Rafael
Porto Ineu.-2012.
91 f.; 30cm

Orientadora: Maria Ester Pereira
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2012

1. úlcera 2. estresse oxidativo 3. organoselênio 4.
cloreto de zinco 5. antioxidante I. Pereira, Maria Ester
II. Título.

©2012

Todos os direitos autorais reservados a Rafael Porto Ineu. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Email: rpineu@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

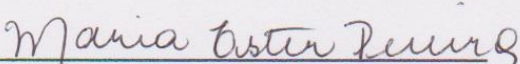
A Comissão Examinadora, Abaixo Assinada,
Aprova a Tese de Doutorado

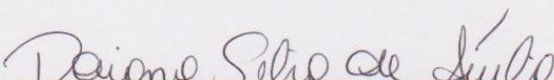
**EFEITOS DOS COMPOSTOS DE SELÊNIO E ZINCO NAS
LESÕES GASTROINTESTINAIS INDUZIDAS POR ETANOL EM
RATOS**

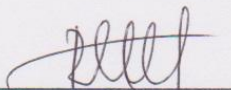
elaborada por
Rafael Porto Ineu

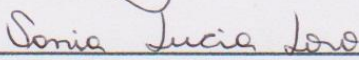
Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica


COMISSÃO EXAMINADORA


Prof.^a. Dr.^a. Maria Ester Pereira (UFSM)
(Presidente/Orientadora)


Prof.^a. Dr.^a. Daiana Silva de Ávila (UNIPAMPA)


Prof. Dr. Rafael Noal Moresco (UFSM)


Prof.^a. Dr.^a. Vânia Lúcia Loro (UFSM)


Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares (UFSM)

Santa Maria, 30 de março de 2012

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e saúde concedida;

Agradeço aos meus pais Édison e Lia Mara e a minha irmã Raquel, pelo exemplo de força, amor, bondade e por sempre me incentivarem na busca por mais conhecimentos. Obrigado;

Agradeço a Francieli, minha companheira, pelo amor e carinho de sempre;

Agradeço à banca examinadora que se dispôs a avaliar o meu trabalho. Muito obrigado.

A Prof^a. Dr^a. Maria Ester Pereira pela orientação e ensinamentos transmitidos, e principalmente pela amizade e confiança. Muito obrigado;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, especialmente ao Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha, que de alguma maneira ou outra contribuíram para a minha formação científica;

Ao pessoal dos outros laboratórios pelo companheirismo e amizade;

Aos colegas de laboratório Cláudia, Vítor, Lucélia, Lucieli, Taíse, Mariana, Alexandre, Carina e demais pelo companheirismo que além de colegas, demonstraram ser grandes amigos. Agradeço-os pelo convívio e conhecimento compartilhado ao longo desse período;

Agradeço a todos os funcionários do PPGBTox;

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso;

Agradeço também a CAPES, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho;

Enfim, agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Não devemos respeitar os velhos somente
pelos seus cabelos brancos, pois os
crápulas, corruptos e canalhas também
envelhecem”*

(Autor desconhecido)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITOS DOS COMPOSTOS DE SELÊNIO E ZINCO NAS LESÕES GASTROINTESTINAIS INDUZIDAS POR ETANOL EM RATOS

Autor: RAFAEL PORTO INEU
Orientadora: MARIA ESTER PEREIRA
Local e data da defesa: Santa Maria, 30 de Março de 2012

A úlcera gástrica é uma doença que afeta um grande número de pessoas no mundo, sendo consequência do estilo de vida, dos hábitos alimentares, do alcoolismo e tabagismo associados ou não ao estresse. Essas lesões estão intimamente associadas à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Sabe-se que elementos como o selênio e o zinco apresentam grande eficiência em eliminar as EROs, evitando assim uma série de danos causados pela formação das mesmas. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito da administração oral do disseleneto de difenila (PhSe)₂ e do cloreto de zinco (ZnCl₂) no modelo experimental de lesão gastrointestinal induzido oralmente por etanol 70% em ratos, avaliando o envolvimento do estresse oxidativo. Foram avaliados a produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os níveis de espécies reativas (RS), o conteúdo de ácido ascórbico e de grupos tióis (SH) totais e não protéicos, a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT), bem como os danos teciduais através de análises micro/macroscópicas e histopatológicas do tecido gastrointestinal. O modelo de indução de lesões gastrointestinais por etanol é bastante utilizado por diversos autores, pois causa diversas alterações no tecido gástrico; formação exacerbada de EROs, desequilíbrio nas defesas antioxidantes e modificação na atividade de diversas enzimas responsáveis pela detoxificação das EROs. Nesse trabalho, o etanol 70% foi administrado aos ratos por via oral a fim de induzir lesões gástricas e aumentar o estresse oxidativo no tecido gastrointestinal. Os resultados mostram que nas análises macro e microscópicas de estômago o (PhSe)₂, em baixas doses (0,01 à 1,0 mg/kg), reverteu e protegeu o tecido gástrico frente às lesões. O pré- e o pós-tratamento com (PhSe)₂ apresentaram efeitos benéficos contra a peroxidação lipídica através da medida dos níveis de TBARS os quais diminuíram, bem como um aumento no conteúdo de ácido ascórbico e aumento na atividade da SOD de estômago de ratos quando comparados ao etanol. O mesmo ocorreu para o ZnCl₂ que na dose de 27 mg/kg demonstrou ser eficaz na proteção e reversão das injúrias gastrointestinais causadas pelo etanol, uma vez que restaurou os parâmetros bioquímicos analisados a níveis normais. Na análise macroscópica, o ZnCl₂ apresentou resultados positivos na proteção e na reepitelização do tecido gástrico frente as lesões. O ZnCl₂ protegeu e reverteu significativamente os níveis de TBARS e de RS gastrointestinais que foram aumentados pelo etanol, também preveniu e restaurou o decréscimo nos níveis de

grupos SH totais de estômago e intestino. Entretanto, o $ZnCl_2$ somente protegeu a diminuição no conteúdo de ácido ascórbico gastrointestinal. O decréscimo na atividade da CAT de estômago e de intestino foi prevenido e restaurado pelo zinco frente às lesões. Portanto, este trabalho trata de um campo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos e de novas terapêuticas e poderá nos levar a uma melhor compreensão dos mecanismos de ação envolvidos no processo antioxidante gástrica, bem como contribuir no avanço das pesquisas contra lesões gastrointestinais.

Palavras chave: Úlcera, Antioxidante, Estresse Oxidativo, Selênio, Zinco, Enzimas.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Post Graduation Program in Biological Sciences:
Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECTS OF SELENIUM AND ZINC COMPOUNDS AGAINST GASTRICINTESTINAL LESIONS INDUCED BY ETHANOL IN RATS

Author: RAFAEL PORTO INEU

Adviser: MARIA ESTER PEREIRA

Place and data of defense: Santa Maria, March, 30th of 2012

Gastric ulcer is a world widespread illness that affects a great number of people and it is correlated to life style, food intake, alcohol and smoke in association or not to stress behavior. The lesions are in association with oxygen reactive species (ROS) production. It is been know that some elements, selenium and zinc, shows great effect scavenger in detoxification of ROS production, avoiding many damages caused by ROS. Based on these considerations, the present study intend to investigate the effect of oral administration of diphenyl diselenide (PhSe)₂ and zinc chloride (ZnCl₂) in an experimental model of gastric lesion induced by oral administration of ethanol 70% in rats and, particularly the involvement of oxidative stress. For this propose we measured TBARS production, reactive species (RS) levels, ascorbic acid content, total e non-protein thiol groups, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities from stomach and intestine of rats exposed to ethanol additionally, damage in tissues were measure by micro and macroscopic histopathology analyses. The model of gastrointestinal lesions induced by ethanol is widely used by many authors because it is a model that causes various changes in gastric tissue, exacerbated ROS formation, imbalance in antioxidant defenses and modification of the activity of several enzymes involved in ROS detoxification. In this study, oral ethanol 70% was administered in rats to cause gastric lesions and to enhance oxidative stress. Stomach's micro and macroscopic analyses showed that (PhSe)₂ at low doses (0.01 and 1.0 mg/kg) protected and reverted gastric lesions and attenuated the oxidation alterations caused by ethanol. Similar results could be verified when ZnCl₂ (27 mg/kg) was administered orally. ZnCl₂ demonstrated to be efficient in to protect and reverse the injuries against gastrointestinal damage caused by ethanol. These elements restored the biochemical parameters to normal values. Macroscopic analyses revealed that both elements, selenium and zinc, could protect and re-epithelialize the stomach. Pre- and post-treatment with (PhSe)₂ showed benefic effects against lipid peroxidation measured by TBARS production, wich diminished, even as an enhancement of ascorbic acid content and stomach SOD activity when compared to ethanol. It was also verified for ZnCl₂ (27 mg/kg), an ability to protect and to reverse against gastrointestinal damages caused by ethanol, even though this element was able to restore biochemical parameters to control values. Macroscopic analyses showed that ZnCl₂ had positive results in prevent and re-epithelialize the mucosa against lesions. ZnCl₂ significantly protected and reversed gastrointestinal TBARS and RS production that were enhanced by ethanol as well as

prevented and reversed for total SH groups. However, ZnCl₂ only protected the diminished in gastrointestinal ascorbic acid content and prevented and restored the decreased of stomach and intestine CAT activity. Therefore, this study is a promising field to development of new drugs and new therapies and also can take to a better understanding of mechanism of action involved in the gastric antioxidant process, even though to enhance the research about elements effects in gastrointestinal ulcers.

Keywords: Ulcers, Antioxidant, Oxidative Stress, Selenium, Zinc, Enzymes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Representação anatômica do estômago.....21

Figura 2 – Representação das camadas da parede gástrica.....21

ARTIGO

Figura 1 – Aparência macroscópica de estômago dos grupos não tratados (A), etanol + óleo de soja (B), pré-tratado + etanol (C), etanol + pós-tratado (D), 1 mg/kg de disseleneto de difenila ou 50 mg/kg de cimetidina (E).....43

Figura 2 – Avaliação histológica (40x) de estômagos dos grupos não tratados (A), etanol + óleo de soja (B), pré-tratado + etanol (C), etanol + pós-tratado (D), 1 mg/kg de disseleneto de difenila ou 50 mg/kg de cimetidina (E). O grupo etanol apresenta inchaço e um processo de desorganização celular (1), zona confluyente de necrose na margem (2) causada pelo etanol.....44

Figura 3 – Efeitos do disseleneto de difenila nos níveis de TBARS em estômago de ratos. Os dados estão expressos em média±erro padrão médio de cinco animais por grupo. ANOVA de uma via seguida do teste de LSD e *p < 0.05 comparado com todos os grupos.....45

Figura 4 - Efeitos do disseleneto de difenila no conteúdo de ácido ascórbico em estômago de ratos. Os dados estão expressos em média±erro padrão médio de cinco animais por grupo. ANOVA de uma via seguida do teste de LSD e *p < 0.05 comparado com todos os grupos.....45

Figura 5 - Efeitos do disseleneto de difenila na atividade da superóxido dismutase de estômago de ratos. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de auto-oxidação da epinefrina em 50% a 26°C. Os dados estão expressos em média±erro padrão médio de cinco animais por grupo. ANOVA de uma via seguida do teste de LSD e *p < 0.05 comparado com todos os grupos.....46

MANUSCRITO

Figura 1 - Aparência macroscópica de estômago dos grupos: (A) salina, (B) etanol, (C) zinco, (D) zinco + etanol (E) etanol + zinco.....67

Figura 2 – Peroxidação lipídica (TBARS) de tecidos de ratos expostos a indução da lesão por etanol e tratados com zinco (27 mg/kg): A) estômago, B) intestino, C) rim. Os dados estão expressos em média±erro padrão médio. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (p<0.05), (n=6 por grupo).....68

Figura 3 – Espécies Reativas (RS) de tecidos de ratos expostos a indução da lesão por etanol e tratados com zinco (27 mg/kg): A) estômago, B) intestino, C) rim. Os dados estão expressos em média±erro padrão médio. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (p<0.05), (n=6 por grupo).....69

Figura 4 – Conteúdo de vitamina C de tecidos de ratos expostos a indução da lesão por etanol e tratados com zinco (27 mg/kg): A) estômago, B) intestino, C) rim. Os dados estão expressos em média±erro padrão médio. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (p<0.05), (n=6 por grupo).....70

Figura 5 – Atividade da catalase de tecidos de ratos expostos a indução da lesão por etanol e tratados com zinco (27 mg/kg): A) estômago, B) intestino, C) rim. Os dados estão expressos em média±erro padrão médio. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p<0.05$), (n=6 por grupo).....71

Figura 6 – Conteúdo de tióis totais de tecidos de ratos expostos a indução da lesão por etanol e tratados com zinco (27 mg/kg): A) estômago, B) intestino, C) rim. Os dados estão expressos em média±erro padrão médio. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p<0.05$), (n=6 por grupo).....72

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 – Efeitos do disseleneto de difenila nas lesões gástricas induzidas por etanol.....44

MANUSCRITO

Tabela 1 – Quantificação das lesões gástricas e dos parâmetros bioquímicos de soro de ratos expostos a lesões gástricas induzidas por etanol e tratados com zinco.....66

LISTA DE ABREVIATURAS

(PhSe)₂	Disseleneto de difenila
AA	Ácido araquidônico
ACh	Acetilcolina
AINEs	Antiinflamatório não esteroidais
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CCK-2	Colecistocinina tipo 2
COX	Cicloxigenase
DCFH-DA	Diclorofluorisceína diacetato
DL₅₀	Dose letal média
DNPH	Dinitrofenil hidrazina
ECL	Células enterocromoafins-símiles
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
IBP	Inibidores da bomba de prótons
MDA	Malonaldeído
mM	Mili molar
MT	Metalotioneína
NO	Óxido nítrico
O₂[°]	Ânion superóxido
OH[°]	Radical hidroxil
PG	Prostaglandinas
RS	Espécies reativas

R-SeH	Selenol
S.E.M	Erro padrão médio
Se	Selênio
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervosa entérico
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGI	Trato gastrointestinal
Zn	Zinco
δ-ALA-D	Delta aminolevulinato desidratase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Trato gastrointestinal	19
1.2 Fatores que regulam a secreção ácida	22
1.3 Integridade da mucosa gástrica	25
1.4 As ulcerações pépticas	27
1.5 Farmacoterapêutica da úlcera	29
1.6 Espécies reativas de oxigênio	29
1.7 Selênio	32
1.8 Zinco	36
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3 DESENVOLVIMENTO	40
3.1 Artigo	40
3.1.1 Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress	40
3.2 Manuscrito	48
3.2.1 Antioxidant effect of zinc chloride against ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats.....	48
4 DISCUSSÃO	73
5 CONCLUSÃO	78
6 PERSPECTIVAS	79
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

APRESENTAÇÃO

Essa tese segue as normas estabelecidas na Estrutura e Apresentação de Monografias, Dissertações e Teses – MDT da UFSM, Sétima Edição (7ª Ed) do ano de 2010. Os resultados estão apresentados sob a forma de artigo e manuscrito os quais se encontram no item “**DESENVOLVIMENTO**”. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussões e Referências Bibliográficas encontram-se no artigo e no manuscrito e representam a íntegra desse estudo. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais a respeito dos resultados demonstrados no artigo e no manuscrito contido neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta tese.

1 INTRODUÇÃO

A úlcera gástrica é uma doença com etiologia multifatorial ainda não bem determinada. Por décadas o excesso de secreção de ácido foi considerado a causa da ulceração na mucosa gástrica. Assim, a terapia da úlcera se baseou em drogas anticolinérgicas, antihistamínicos H₂, antiácidos e inibidores da bomba de prótons (IBP) (WALLACE & GRANGER, 1996). Pela complexidade da patogenia da úlcera gástrica, um modelo experimental comumente utilizado é o de lesões gástricas induzidas por etanol (ROBERT, 1979). Esse modelo indica que o dano gástrico produzido é uma consequência da interação de muitos fatores, podendo cada fator, individualmente, ser considerado um objetivo terapêutico potencial. Alguns fatores envolvidos no dano gástrico induzido pelo etanol são a diminuição da produção do muco, o aumento da geração de radicais livres, a diminuição da produção de grupos SH endógenos, o aumento da liberação de histamina, aumento do efluxo de sódio e potássio, aumento do influxo de cálcio, aumento da produção de leucotrienos, diminuição da produção de prostaglandinas, a diminuição do fluxo sanguíneo gástrico, aumento da isquemia e da permeabilidade vascular gástrica (GLAVIN & SZABO, 1992).

Atualmente um grande número de produtos naturais, de compostos sintéticos e fármacos vem sendo estudados a fim de avaliar seus efeitos contra as alterações causadas pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Entretanto, o uso de elementos traço dentre eles o selênio e o zinco ainda é um campo promissor a ser estudado. Incluindo-se a isso, verificamos a necessidade de estudar os possíveis efeitos desses elementos frente a lesões gastrointestinais causadas pela administração oral de etanol em ratos.

1.1 Trato gastrointestinal

O sistema digestório é constituído por um tubo muscular com epitélio especializado que compreende desde a cavidade bucal, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e grosso até o ânus. Além disso, existem órgãos anexos, tais como: glândulas salivares, fígado e pâncreas, os quais secretam substâncias que

auxiliam no processo digestivo dos alimentos. O trato gastrointestinal (TGI), auxiliados pelos órgãos anexos, têm a função de receber, digerir, absorver e eliminar substâncias ingeridas, e são todos controlados pelos sistemas nervoso e hormonal (GUYTON & HALL, 1997; MERCHANT, 2007).

O TGI possui um sistema nervoso próprio, denominado Sistema Nervoso Entérico (SNE), contendo cerca de 100 milhões de neurônios. O SNE inicia no esôfago e estende-se ao ânus controlando os movimentos e as secreções gastrintestinais. É formado pelo plexo mioentérico ou plexo de Auerbach (plexo externo situado entre as camadas musculares longitudinal e circular) e pelo plexo de Meissner ou submucoso (plexo interno localizado na submucosa), constituindo a inervação intrínseca do órgão (GUYTON & HALL, 1997; RANG et al., 2004; PASRICHA, 2006). O plexo mioentérico é responsável pelo controle motor (peristaltismo) e o plexo submucoso é responsável pela regulação da secreção, do transporte de líquidos e pelo fluxo sangüíneo (PASRICHA, 2006). As células nervosas de ambos os plexos recebem estímulos do sistema nervoso central (SNC), através de fibras do sistema nervoso simpático e parassimpático (inervação extrínseca), e de outros neurônios entéricos (incluindo neurônios sensoriais e interneurônios). Essa comunicação neuronal existente permite a realização das funções motoras e secretoras do TGI (GUYTON & HALL, 1997; PASRICHA, 2006).

As fibras vagais eferentes são fibras pré-ganglionares parassimpáticas, tendo como alvo o gânglio mioentérico, pelo qual o controle central da motilidade e secreção gástrica são regulados (GERSHON et al., 1994). As fibras vagais aferentes são fibras pós-ganglionares simpáticas que possuem extensas projeções para a mucosa gástrica e artérias, e são de particular interesse na proteção da mucosa gástrica (HOLZER, 1998).

O estômago é dividido anatomicamente em fundo, corpo e antro (Figura 1). O fundo está situado na região superior e tangencia a junção esofagogástrica; o corpo corresponde à maior parte do órgão; e o antro está situado na região proximal ao canal pilórico (DANGELO & FATTINI, 2007).

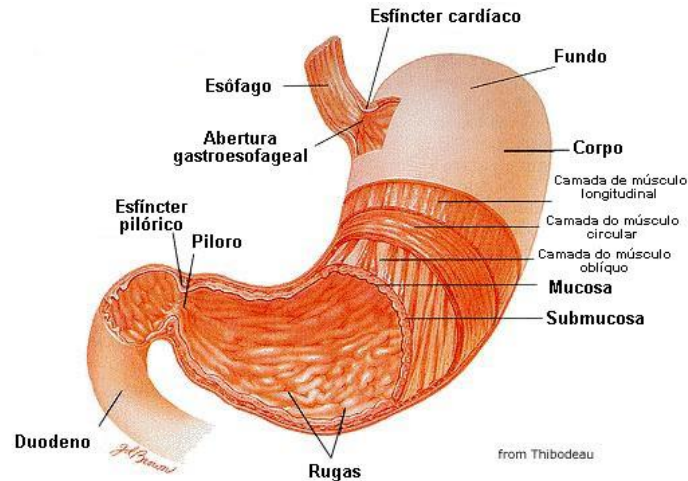


Figura 1 – Representação anatômica do estômago (Fonte: www.infoescola.com/sistema-digestivo/estomago).

A parede do estômago apresenta várias camadas teciduais, compreendendo a camada serosa, a muscular longitudinal, a muscular circular, a submucosa e a mucosa (Figura 2). A serosa é a camada tecidual que reveste a maior parte do órgão, exceto em uma pequena porção da parte posterior do estômago; a submucosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo e contém uma rica rede vascular e um plexo nervoso - conhecido como plexo submucoso; e a mucosa é a camada da parte interna do estômago que abriga numerosas glândulas gástricas (DANGELO & FATTINI, 2007).

Camadas da parede gástrica

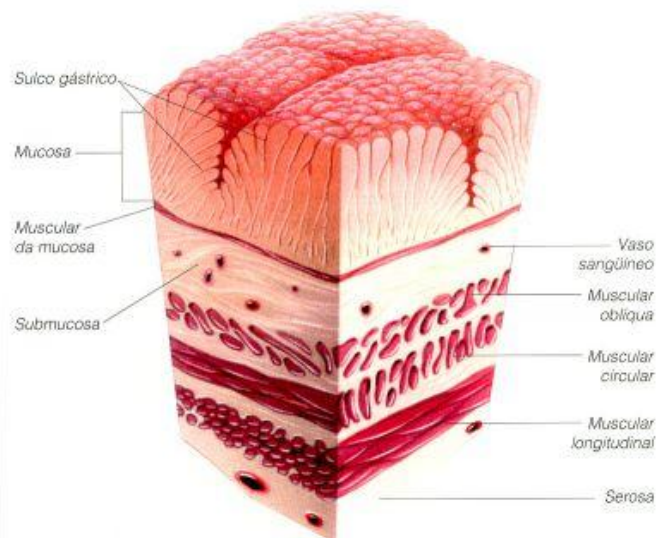


Figura 2 – Representação das camadas da parede gástrica. (Fonte: www.gastronet.com.br/gastrite.htm).

No estômago podem ser encontradas as glândulas oxínticas e as pilóricas, que secretam diversas substâncias responsáveis pelos processos digestivos e homeostáticos do estômago. As glândulas oxínticas estão localizadas na superfície interna do corpo e fundo do estômago, e são compostas por células mucosas, células pépticas ou principais (secreção do pepsinogênio, o qual, quando em contato com o ácido clorídrico, é convertido em pepsina atuando como enzima proteolítica), células parietais (secretam o ácido clorídrico), células D (secretam somatostatina) e células enterocromoafins-símiles (ECL) (secretam histamina). As glândulas pilóricas estão localizadas no antro e possuem células mucosas, células G (quando estimuladas liberam o hormônio gastrina, que tem papel importante na secreção ácida gástrica) e também células D (SCHUBERT & PEURA, 2008). Além disso, a superfície do estômago é recoberta por células mucosas superficiais que são especializadas em secretar grandes quantidades de muco extremamente viscoso e alcalino. Esse muco cobre toda a parede do estômago, chegando a ter mais de um milímetro de espessura, proporcionando uma barreira física de proteção contra as secreções ácidas que são produzidas pelas células parietais (SCHUBERT & PEURA, 2008).

Essas estruturas gástricas citadas desempenham funções específicas que promovem a manutenção da homeostasia do órgão, como a secreção de ácido clorídrico, pepsinogênio, muco, bicarbonato e prostaglandinas (PGs). Além disso, outras substâncias como o óxido nítrico (NO) e enzimas antioxidantes (superóxido dismutase - SOD, catalase – CAT e glutathione peroxidase - GPx) e glutathione reduzida (GSH) também estão relacionadas com a manutenção da integridade gástrica.

1.2 Fatores que regulam a secreção ácida

O ácido clorídrico é secretado nas células parietais mediante a ação da H^+K^+ - adenosina trifosfatase ($H^+K^+/ATPase$ – bomba de prótons). O ácido gástrico facilita a digestão de proteínas e absorção de ferro, cálcio e vitamina B12, além de prevenir o desenvolvimento bacteriano e outras infecções entéricas (SCHUBERT & PEURA, 2008). A enzima $H^+K^+/ATPase$ consiste de duas subunidades. Uma das

subunidades contém o sítio catalítico da enzima, responsável pela troca iônica do H^+ intracelular pelo K^+ luminal, e a outra subunidade é responsável pela estabilidade estrutural e funcional da enzima, protegendo a enzima de possível degradação (SCHUBERT, 2005; SCHUBERT & PEURA, 2008). A troca iônica (H^+/K^+) promovida pela bomba de prótons é acompanhada pela saída de íons Cl^- , da célula parietal, via canais de cloro localizados na membrana apical da célula parietal. Os íons H^+ e Cl^- ligam-se formando o ácido clorídrico, que atingirá o lúmen gástrico (SCHUBERT & PEURA, 2008).

Em um estado de repouso a célula parietal contém abundantes vesículas tubulares intracelulares que estocam a $H^+K^+/ATPase$. No momento que ocorre o estímulo (elevação da concentração de cálcio intracelular, AMPc, ou ambos), uma cascata de eventos intracelulares desencadeia a fusão das vesículas tubulares na membrana apical da célula parietal, promovendo ativação da bomba de prótons, iniciando o processo de secreção do ácido gástrico. Na medida em que o estímulo encerra-se, as bombas são recicladas e retornam ao compartimento vesicular intracelular (SCHUBERT, 2005).

A secreção do ácido gástrico é regulada pela via neuronal, parócrina e endócrina (KONTUREK et al., 2004). Neurônios aferentes e eferentes providenciam uma comunicação bidirecional entre o SNC e o estômago além de uma grande variedade de neuropeptídeos, que agem centralmente e periféricamente para regular a secreção ácida gástrica (SCHUBERT, 2005).

Os principais estimulantes da secreção do ácido são a acetilcolina (ACh), liberada de neurônios pós-ganglionares entéricos; a gastrina, liberada de células G do antro gástrico; e a histamina, liberada das ECL. O principal inibidor da secreção do ácido gástrico é a somatostatina liberada das células D da mucosa oxíntica e pilórica.

Na via neuronal, o SNC modula a atividade do SNE através da ACh, que estimula a secreção de ácido gástrico em resposta à antecipação ao alimento (odor, visão, salivação), o que caracteriza a “fase cefálica” da secreção ácida gástrica. As fibras eferentes que se originam nos núcleos motores dorsais, vão até o estômago através do nervo vago e fazem sinapses com células ganglionares do SNE. A ACh é liberada pelos neurônios pós-ganglionares e estimula diretamente a secreção do

ácido por atuar em receptores muscarínicos M_3 localizados na membrana basolateral da célula parietal. Além disso, há um estímulo indireto à liberação de histamina pelas ECL, bem como à liberação de gastrina pelas células G na região antral do estômago (SCHUBERT, 2005).

Existe outra forma de regulação da secreção de ácido gástrico, a qual se dá mediante mediadores, tais como: histamina, gastrina e somatostatina. A histamina é estocada principalmente em células ECL que comumente se localizam em estreita proximidade com as células parietais. Uma vez que a histamina é liberada, ocorre a estimulação da secreção do ácido gástrico diretamente pela ligação em receptores H_2 na célula parietal, levando a uma cascata de eventos intracelulares, resultando no aumento dos níveis de AMPc e ativação da PKA. A ativação da via dependente de AMPc estimula a bomba de prótons na célula parietal, resultando na secreção de ácido (JAIN et al., 2007). Além disso, a histamina modula a secreção do ácido de maneira indireta, por atuar em receptores H_3 na célula D do antro gástrico, inibindo a secreção de somatostatina (substância que inibe a secreção do ácido por suprimir a liberação de gastrina, mediante retroalimentação negativa); e atuar nas células G estimulando a liberação de gastrina (VUYYURU et al., 1995; ROULEAU et al., 2004).

A célula G do antro gástrico produz a gastrina, que também pode ser produzida em pequenas quantidades no intestino delgado, cólon e pâncreas. Este hormônio é o principal mediador da secreção ácida estimulada pela alimentação e age principalmente liberando histamina das células ECL no corpo e fundo do estômago. Quando liberada da célula G, liga-se em receptores de gastrina/colecistocinina do tipo 2 (CCK-2) localizados na célula parietal, promovendo aumento dos níveis de cálcio intracelular que estimulará a bomba de prótons (H^+/K^+ -ATPase), desencadeando a formação de ácido. Esses receptores estão presentes nas células ECL, aos quais a gastrina pode ligar-se promovendo a liberação de histamina (ALY et al., 2004; BEALES, 2004).

Entretanto, a somatostatina sintetizada a partir da molécula precursora pré-pró-somatostatina, presente nas células D da glândula oxíntica e pilórica, inibem a secreção ácida por agir diretamente na célula parietal; e indiretamente por inibir a secreção de histamina e gastrina. Quando ocorre redução excessiva do pH do lúmen gástrico, a secreção de somatostatina é estimulada, que por outro lado,

atenua a liberação de histamina, gastrina e conseqüentemente a formação de ácido clorídrico (SCHUBERT, 2005).

A regulação fisiológica da secreção ácida gástrica é a principal terapia no tratamento de distúrbios gástricos visto que a secreção do ácido gástrico é responsável pelo processo digestivo e por proteger o organismo contra possível contaminação bacteriana. Considerando que a integridade da mucosa gástrica depende da ação, em perfeita harmonia, dos fatores de proteção como as defesas antioxidantes, a barreira de muco e a ação das prostaglandinas, evitando que as secreções de substâncias responsáveis pela digestão lesionem o próprio tecido, qualquer fator de agressão ou medicamento que altere esse status no estômago, facilitaria ou estimularia a formação de lesões no epitélio do estômago.

1.3 Integridade da mucosa gástrica

A barreira muco-bicarbonato é formada pelo gel mucoso, bicarbonato e fosfolipídios surfactantes, os quais cobrem a superfície da mucosa retendo o bicarbonato secretado pelas células superficiais epiteliais para que o microambiente permaneça neutro, prevenindo a penetração da pepsina e a digestão proteolítica da superfície epitelial (LAINE et al., 2008).

O muco é secretado em todo o trato gastrointestinal desde o estômago até o cólon, formando um gel aderente entre a mucosa e o lúmen, protegendo a mucosa contra agentes nocivos. É secretado pelas células epiteliais da mucosa e contém 95% de água e 5% de mucina (glicoproteína). A secreção de muco é estimulada por hormônios gastrointestinais, como gastrina e secretina, bem como por prostaglandina E2 (PGE2) e agentes colinérgicos. Substâncias ulcerogênicas, como antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) e sais de bile, causam dissipação do gel mucoso e da camada de fosfolipídios, causando a lesão da mucosa (LAINE et al., 2008).

O bicarbonato ajuda a manter uma zona de pH neutro na mucosa oferecendo uma barreira protetora contra a difusão do ácido. Sabe-se que a PGE2 estimula a secreção de bicarbonato no estômago, via ativação dos receptores EP1; e no

duodeno, via ativação de receptores EP3 e EP4 em ratos (AOI et al., 2004; NAKASHIMA et al., 2004). Muitos investigadores relatam que a acidificação desses tecidos provoca a secreção de bicarbonato com concomitante aumento dos níveis de PGE2 (SUGAMOTO et al., 2001; KAGAWA et al., 2003; NAKASHIMA et al., 2004).

As PGs são derivadas de ácidos graxos de 20 carbonos e são encontradas em praticamente todos os tecidos e órgãos, desempenhando uma grande variedade de funções fisiológicas e patológicas. Elas são sintetizadas a partir de diferentes precursores, sendo um deles, o ácido araquidônico (AA), que é convertido a endoperóxidos instáveis, PG-G2 e PG-H2 pela ação da ciclooxigenase (COX). Três isoformas de COX foram descritas: COX-1 expressa constitutivamente; COX-2 induzível (SMITH & DEWITT, 1996); e COX-3, uma variante da COX-1 (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). As PGs derivadas do AA são denominadas PGs da série-2, incluindo a PGE2 e a prostaciclina (PGI2), que são extremamente importantes no trato gastrointestinal (CALDER, 2001). Isomerasas e sintases efetuam a transformação da PGH2 em prostanóides terminais, como PGI2 e PGE2. Uma vez liberados, esses prostanóides exercem suas funções biológicas pela interação com receptores específicos na superfície celular (NARUMIYA, 1994).

A geração contínua de PGE2 e PGI2 é crucial para a manutenção da integridade da mucosa, além de proteger contra agentes ulcerogênicos e necrotizantes. As PGs inibem a secreção de ácido; estimulam a secreção de muco, bicarbonato e fosfolipídios; aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa; e aceleram a restituição epitelial e cicatrização da mucosa. Além disso, inibem a ativação de mastócitos e leucócitos, bem como a aderência de plaquetas no endotélio vascular (LAINE et al., 2008). A PGE2 tem efeito estimulatório sobre a secreção de bicarbonato no estômago via receptores EP1, enquanto no duodeno, tal ação ocorre via receptores EP3 (TAKEUCHI et al., 1999). Destaca-se, ainda, como um potente secretagogo de mucina em células epiteliais gástricas de ratos (TANI et al., 1997).

Outro agente importante na proteção e manutenção da integridade gástrica é o óxido nítrico (NO). Esse gás volátil é formado a partir da L-arginina, cuja reação de oxidação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem três diferentes isoformas de NOS, das quais, duas são constitutivamente expressas

(óxido nítrico sintase neuronal - nNOS ou NOS-1; e óxido nítrico sintase endotelial - eNOS ou NOS-3), e uma terceira que é induzida (óxido nítrico sintase induzida - iNOS ou NOS-2). Quando gerado, o NO liga-se ao grupo heme da guanilil ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão de GTP para GMPc, aumentando por conseguinte a concentração de GMPc intracelular. Por sua vez, esse segundo mensageiro liga-se aos domínios específicos de moléculas efetoras, incluindo proteínas quinases, canais iônicos e fosfodiesterases, desencadeando as subsequentes respostas celulares. No trato gastrointestinal, as isoformas constitutivas são expressas a níveis basais no SNE, bem como nas células endoteliais vasculares. No trato gastrointestinal, o NO atua na manutenção da homeostase, sendo responsável por múltiplas funções fisiológicas, bem como na integridade do epitélio gástrico e da barreira de muco. Além disso, atua como vasodilatador e, portanto, regula o fluxo sanguíneo gástrico. Alguns trabalhos demonstram que os doadores de NO promovem aumento da camada de muco em ratos e estudos mais recentes, têm demonstrado que NO também protege o trato gastrointestinal ao inibir a secreção de ácido gástrico (LANAS, 2008).

1.4 As ulcerações pépticas

A úlcera péptica é uma lesão caracterizada pela perda circunscrita de tecido que ultrapassa os limites da camada muscular da mucosa e ocorre nas porções expostas à secreção ácida. A úlcera pode desenvolver-se na porção inferior do esôfago, no estômago e no duodeno. A úlcera péptica gastroduodenal é uma doença heterogênea, com múltiplos fatores envolvidos na sua gênese, afetando aproximadamente 5 a 10% da população, representando uma das doenças crônicas mais comuns. Apesar dos grandes avanços no conhecimento da doença ulcerosa péptica, a sua etiopatogenia não é totalmente conhecida. Dentre as hipóteses mais aceitas como causa dessa patologia, são: fatores genéticos, fatores endógenos (distúrbios fisiopatológicos) e fatores exógenos (estresse, tabagismo, dieta alimentar, uso de AINEs, etanol e infecção por *Helicobacter pylori* (CARVALHO, 2000). Em contra partida, o organismo possui potentes mecanismos de defesa (barreira muco-bicarbonato, fosfolipídios da superfície epitelial de revestimento,

camada lipoproteica da membrana, fluxo sanguíneo, síntese de PGs, NO e sistema antioxidante) que protegem a mucosa de possíveis lesões (YUAN et al. 2006).

Atualmente é bem conhecido que o uso prolongado de AINEs induz úlceras pépticas. O efeito sistêmico mais importante dos AINEs, em termos de induzir ulceração gástrica refere-se à sua habilidade de suprimir a síntese de PGs (WALLACE, 2008). De fato, vários estudos têm demonstrado que o uso de AINEs convencionais, ou inibidores seletivos de COX-2, provocam ulceração gastrointestinal tanto em animais quanto em humanos. (WALLACE, 2001).

Outro fator de grande importância no desenvolvimento de úlceras gástricas é o consumo de álcool pela população, que pode produzir erosão gástrica aguda hemorrágica. A ingestão excessiva pode resultar em gastrite caracterizada por edema, hemorragia subepitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias na mucosa gástrica (JAHOVIC et al., 2007; MATSUHASHI et al., 2007). Além disso, em modelos experimentais o etanol tem efeito ulcerogênico e necrotizante que resulta em dano direto da mucosa. Em cultura de células, o etanol pode retardar a restauração do epitélio gástrico por provocar danos no citoesqueleto dessas células (MATSUHASHI et al., 2007). O etanol também induz liberação de endotelinas, degranulação de mastócitos, inibição da síntese de PGs e consequente redução da produção de muco, além de provocar dano no endotélio vascular da mucosa gástrica, desorganização da microcirculação e isquemia, resultando na produção de EROs (PAN et al., 2008).

O TGI tem a capacidade de produzir grandes quantidades de EROs pelos processos de oxidação na mucosa, dentre os quais podemos citar: xantina oxidase, amina oxidase, aldeído oxidase bem como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida oxidase (NADPH oxidase) encontrada em leucócitos residentes (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos).

Portanto, a integridade da mucosa gastrointestinal depende de um equilíbrio entre os fatores agressivos e os fatores protetores, sendo que a úlcera é o resultado final de uma série de alterações fisiológicas.

1.5 Farmacoterapêutica da úlcera

Antigamente a maioria das úlceras pépticas era controlada cirurgicamente, resultando em altas taxas de mortalidade. Em meados da década de 70, a supressão farmacológica da secreção ácida gástrica foi efetivada com a introdução dos antagonistas de receptores H₂ histaminérgicos (cimetidina e ranitidina) e, até 1990, foram os fármacos mais prescritos no mundo inteiro. Atualmente, existem quatro antagonistas H₂ utilizados clinicamente: cimetidina, ranitidina, famotidina e nizatidina. Estes promovem a redução da secreção do ácido ao competir reversivelmente com a histamina pela sua ligação aos receptores H₂ nas células parietais, diminuindo os níveis de AMPc. Mais tarde, com o desenvolvimento dos inibidores irreversíveis da bomba de prótons H⁺/K⁺ATPase (IBP) houve uma acentuada redução no uso dos antagonistas de receptores H₂ histaminérgicos. Os IBP (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e esomeprazol) são medicamentos extremamente eficazes na inibição da secreção do ácido gástrico, resultando em melhoras significativas nas taxas de cicatrização das úlceras gastrointestinais. Porém, podem apresentar alguns efeitos adversos, dentre eles, destacam-se o desenvolvimento da hipergastrinemia (resultante da menor liberação de somatostatina a partir das células D, que ocorre subsequentemente à supressão da secreção ácida) e o aumento do risco de infecção bacteriana (como pela *Helicobacter pylori*), ressaltando-se que esses dois problemas podem levar à formação de câncer gástrico (YUAN et al., 2006).

1.6 Espécies reativas de oxigênio

Define-se como radical livre toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados. As EROs são produzidas normalmente durante o metabolismo celular. As EROs incluem radicais livres, como radicais hidroxil (OH[•]) e ânion superóxido (O₂^{•-}), bem como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) entre outros. Os radicais livres possuem uma grande reatividade, causando lipoperoxidação e oxidações de proteínas e DNA.

As membranas celulares, que contém grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados podem sofrer danos mediados por radicais livres. A lipoperoxidação é iniciada por algum desses radicais, que ao reagir com os lipídios insaturados das biomembranas resulta na formação de hidro ou lipoperóxidos. Estes últimos são altamente reativos e podem seguir uma cascata oxidativa, com severas conseqüências à integridade da membrana, liberando no meio, produtos da degradação de ácidos graxos tais como, o malondialdeído (MDA). A quantificação de tal composto tem sido utilizada para avaliar a extensão do dano oxidativo. Esta quantificação pode ser feita pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), a qual tem sido usada amplamente como uma medida de lipoperoxidação (OHKAWA et al., 1979).

Os antioxidantes são substâncias que direta ou indiretamente protegem os sistemas celulares dos efeitos tóxicos produzidos por radicais oxidativos (HALLIWELL, 1995). Existem diversos compostos com ação biológica e enzimas com importante função antioxidante, entre eles: vitamina C, glutathione, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (KRISHNA et al., 1996; EVANS et al., 1997; JOURD'HEUIL et al., 1998; MCKENZIE et al., 1998; HALLIWELL, 1999).

O ácido ascórbico (vitamina C) é um antioxidante hidrossolúvel, citosólico, que age como redutor biológico na remoção de radicais $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e oxigênio singlete. O ácido ascórbico também é importante na redução do radical alfa-tocoferil até alfa-tocoferol (NAMIKI, 1990). Durante sua função antioxidante o ascorbato sofre uma oxidação até ácido dehidroascórbico (forma oxidada da vitamina C) com a formação intermediária do radical ascorbil, que é relativamente pouco reativo. O ácido ascórbico é um dos antioxidantes mais importantes em tecidos de mamíferos (BANHEGYI et al., 1997) e tendo sido demonstrado que ele é eficiente na redução da toxicidade de vários xenobióticos, tais como chumbo e organofosfatos (FOX, 1975; CHAKRABORTY et al., 1978).

A SOD é uma metaloproteína que dismuta o $O_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2) (FRIDOVICH, 1986; MCCORD & FRIDOVICH, 1988). A catalase (CAT) é uma das mais eficientes enzimas conhecidas, pois não pode ser saturada biologicamente pelo H_2O_2 e por apresentar alta eficiência (LLEDIAS et al., 1998). A

CAT utiliza o H_2O_2 oriundo da atividade da superóxido dismutase (SOD) transformando o H_2O_2 em água e oxigênio molecular.

A glutathiona peroxidase (GPx), uma selenoenzima, que catalisa a redução de hidroperóxidos utilizando-se de grupos tiólicos (principalmente glutathiona) como doador de elétrons (agente redutor), protegendo dos danos oxidativos (MATES, 2000). Como já visto, a formação dos peróxidos é um importante passo na formação de EROs e conseqüente propagação da lipoperoxidação. Além da GPx, outras selenoenzimas contendo selenocisteína ou selenometionina podem manter uma linha de defesa dependente de glutathiona contra processos oxidativos, como por exemplo a peroxinitrito redutase (SIES et al., 1997).

As EROs podem ser tóxicas e determinantes do tempo de vida celular. Já está demonstrado que os metabólitos das EROs estão associados com muitos processos degenerativos (JANSSEN et al., 1998; MELOV et al., 1998). Os radicais livres podem modificar os grupos sulfidrílicos e mediante esta modificação pode ser reversível, enquanto a oxidação das membranas não é reversível. Esta reversão pode ser promovida enzimaticamente (CAT, SOD e GPx), ou de forma não enzimática, pela ação da vitamina C ou de tióis endógenos como a glutathiona (PRUIJN et al., 1991).

Dentre alguns tecidos destacamos o estômago onde, devido à produção exacerbada de radicais livres, levam a danos na mucosa gástrica predispondo o tecido à úlcera. (TOH & GUTH, 1985). Alguns estudos clínicos e experimentais relatam que fatores como o consumo de etanol (MIZUI et al., 1987; PIHAN et al., 1987), AINEs como ácido acetilsalicílico e indometacina (TAKEUCHI et al., 1991; VAANANEN et al., 1991; NAITO et al., 1998), bem como o estresse, a isquemia e reperfusão (YOSHIKAWA et al., 1987) e infestação com a bactéria *Helicobacter pylori* (DAVIES et al., 1994) levam a um aumento e ao acúmulo de H_2O_2 provocando o surgimento de EROs, as quais agredem o tecido, destruindo as membranas lipídicas das células, levando à lesão na mucosa gástrica (YOSHIKAWA et al., 1987).

Atualmente alguns agentes antioxidantes naturais ou sintéticos têm sido estudados a fim de evitar ou retardar os efeitos do estresse oxidativo, bem como o papel das EROs e conseqüentemente o processo de estresse oxidativo nas lesões

gastrointestinais. Desse modo, alguns compostos têm sido testados com essa finalidade e apresentam certa eficiência.

1.7 Selênio

O selênio é um elemento traço essencial na dieta, no entanto, concentrações ligeiramente superiores às requeridas apresentam efeitos tóxicos. Este elemento químico foi descoberto em 1817 pelo sueco Jons. J. Berzelius enquanto investigava uma doença que acometia trabalhadores em uma fábrica de ácido sulfúrico.

Já no século XIII, Marco Polo relatou que cavalos na região de Succuir, no oeste da China apresentavam perda de cascos e pêlos após a ingestão de certas plantas venenosas. Seis séculos após os relatos de Marco Polo, foram descritos os mesmos sintomas em animais que se alimentaram da vegetação nativa próxima ao Rio Missouri, entre o Sul de Dakota e Nebraska, Estados Unidos. A descoberta do agente etiológico destes efeitos tóxicos data do ano de 1928, quando Dr. Kurt Franke estudou estas plantas e seus grãos, concluindo que se tratava do selênio. Posteriormente verificou-se que a dose tóxica (400 µg) de selênio é de 100 vezes à ingestão diária recomendada (55 – 70 µg) (WHO, 1987).

A toxicidade do selênio foi descrita em 1941 (PAINTER, 1941) e na década de 60 já se especulava sobre os efeitos do selênio, onde seu excesso causaria inativação das enzimas sulfidrílicas (TSEN & COLLIER, 1959; SCHWARZ, 1961).

A toxicidade do selênio depende de sua forma química. O selênio elementar e os sais orgânicos são menos tóxicos enquanto que o ácido selenoso (H_2SeO_3) parece ser a forma mais tóxica. A toxicidade do selenito é em parte atribuída à sua redução até seleneto, pela glutatona, produzindo EROs (YAN & SPALLHOLZ, 1993).

Apesar, do mecanismo pelo qual este elemento exerce sua toxicidade não encontrar-se totalmente elucidado, vários estudos sugerem que os efeitos tóxicos do mesmo estão associados à habilidade em catalisar a oxidação de tióis endógenos e com a gênese de radicais livres (SEKO et al., 1989; SPALLHOLZ, 1994; BARBOSA et al., 1998; NOGUEIRA et al., 2004; NOGUEIRA & ROCHA, 2011).

O selênio apresenta uma variedade de efeitos protetores para humanos e animais contra determinadas doenças (COMBS & GRAY, 1998; NAVARRO-ALARCON & LOPEZ-MARTINEZ, 2000). O selênio foi inicialmente descrito como micronutriente essencial ao fim da década de 50, quando foram observadas desordens causadas pela sua deficiência em ovinos, bovinos, suínos e aves (EGGERT et al., 1957; MUTH et al., 1958; HARTLEY & GRANT, 1961; CALVERT et al., 1962). A deficiência de selênio tem sido apontada como causa de algumas patologias humanas como problemas musculares, alterações digestivas e distúrbios reumáticos (NEVE, 1996; ORTUÑO et al., 1996).

O selênio possui várias funções biológicas. A mais conhecida é sua ação antioxidante, por formar selenocisteína, no centro ativo da enzima glutathiona peroxidase (GPx) (FLOHE et al., 1973; ROTRUCK et al., 1973), que é responsável pela remoção de peróxidos. Inicialmente a selenocisteína presente no sítio ativo da enzima reage com um hidroperóxido orgânico para formar ácido selenênico, a seguir ocorre uma redução seqüencial (duas etapas) da enzima com oxidação da glutathiona (GSH) (SIES, 1993). Devido a essa função na GPx, o selênio provavelmente interage com qualquer nutriente que afete o balanço anti e pró-oxidante celular (LEVANDER & BURK, 1994; ALARCÓN & MARTÍNEZ, 2000). Mais recentemente foram descobertas outras selenoproteínas como a iodotironina 5'-deiodinase (FOSTER & SUMAR, 1997), glutathiona peroxidase de hidroperóxidos de fosfolipídios (URSINI et al., 1982), e a tioredoxina redutase (MAY et al., 1998).

O selênio compartilha propriedades químicas e físicas com o enxofre. Esta similaridade permite que o selênio substitua o enxofre, promovendo interações selênio-enxofre nos sistemas biológicos. Por outro lado, as diferenças nas propriedades físico-químicas entre selênio e enxofre constituem a base de seus papéis biológicos específicos (STADTMAN, 1980). Os selenóis (R-SeH) são as formas correspondentes aos tióis (R-SH), onde ocorre a substituição do átomo de enxofre pelo átomo de selênio (KLAYMAN & GÜNTHER, 1973).

Sabe-se que moléculas contendo selênio, como por exemplo o disseleneto de difenila (PhSe)₂ são nucleófilos, apresentando características antioxidantes (ARTEEL & SIES, 2001). A atividade antioxidante exibida pelo elemento selênio parece ser responsável pela sua eficácia no tratamento de doenças que tem o

estresse oxidativo como processo central no seu desenvolvimento. Além da propriedade antioxidante, determinados compostos de selênio exibem ação antiúlcera, antinociceptiva, neuroprotetora, anti-inflamatória, anticarcinogênica, hepatoprotetora e ação mimética à insulina (NOGUEIRA et al., 2004; INEU et al., 2008; NOGUEIRA & ROCHA, 2011).

A incorporação de selênio no organismo, especialmente como cofator de enzimas do sistema antioxidante, depende, além da quantidade absorvida, da sua conversão a uma forma biologicamente ativa (FOSTER & SUMAR, 1997).

As formas inorgânicas de selênio (selenito e selenato) são imediatamente destinadas à síntese de selenoproteínas e o excesso é excretado (ALARCÓN & MARTÍNEZ, 2000). Correlacionando diferentes fontes de selênio *in vitro*, Leist et al. (1999) encontraram que o selenito de sódio (Na_2SeO_3) e selenocistina N-etil-carbamato são doadores de selênio de alta biodisponibilidade, promovendo aumento na captação de selênio, indução de enzimas dependentes de GSH e proteção contra lipoperoxidação. Por outro lado, estes autores observaram que o selênio fornecido pela selenometionina foi incorporado pelos hepatócitos, mas não teve efeito citoprotetor. A selenometionina é uma forma orgânica de selênio que pode ser incorporada ao acaso em proteínas quando a quantidade de metionina disponível no organismo estiver baixa, ou ser catabolizada liberando o selênio. A selenocisteína não é estocada, e sim diretamente catabolizada com liberação do selênio. A selenocisteína pode também ser incorporada em selenoproteínas (LEVANDER & BURK, 1994). Consequentemente os níveis de GPx são principalmente regulados pelos níveis de selenocisteína ou de formas inorgânicas de selênio (BURK, 1986; HASSAN et al., 1990; EKHOLM et al., 1991; LANE et al., 1991).

A biodisponibilidade do selênio é bastante variável, dependendo de sua forma química. Experimentos *in vivo* demonstraram uma maior biodisponibilidade do selênio oriundo de fontes orgânicas (carne bovina) do que do selenito ou selenato (SHI & SPALLHOLZ, 1994). No entanto, a maioria dos estudos indica que a biodisponibilidade do selênio de fontes orgânicas (carnes, peixes, produtos lácteos, etc) é menor do que na forma de selenito (CANTOR et al., 1982; LEVANDER, 1983; DIAZ et al., 1994)

Dentre alguns compostos com propriedades antioxidantes, destacamos o ebselen, que é um composto orgânico de selênio que inibe a secreção das células ácidas parietais pela interferência com grupos sulfidrílicos na bomba de prótons gástrica, H^+/K^+ ATPase (BEIL et al., 1990; UNLUCERCI et al., 1999). Além disso, o ebselen é conhecido por possuir ação do tipo glutathione peroxidase (GPx), propriedades antiinflamatórias e antioxidantes (PARNHAM & GRAF, 1987), bem como atividade antiúlcera (UNLUCERCI et al., 1999).

O disseleneto de difenila $(PhSe)_2$ é um organocalcogênio empregado como intermediário em síntese orgânica (ZENI et al., 2003). A partir da década de 30, os organocalcogênios têm sido alvo de interesse para os químicos orgânicos em virtude da descoberta de aplicações sintéticas (COMASSETO, 1983), sendo importantes intermediários e reagentes muito utilizados em síntese orgânica (PAULMIER, 1986; BRAGA et al., 1996) e de propriedades biológicas (PARNHAM & GRAF, 1987; KANDA et al., 1999). Conseqüentemente, o risco de contaminação ocupacional por organocalcogênios tem motivado estudos toxicológicos. Outro aspecto relevante é a tentativa crescente de desenvolvimento de compostos organocalcogênios que possuam atividades biológicas e aplicações farmacológicas (NOGUEIRA et al., 2003; NOGUEIRA & ROCHA, 2011).

Conforme alguns estudos, o $(PhSe)_2$ possui atividade antiinflamatória e antinociceptiva, quando administrado de forma aguda em ratos e camundongos (NOGUEIRA et al., 2003). Recentemente, tem sido descrito que este composto orgânico de selênio apresenta propriedades antiúlcera (SAVEGNAGO et al., 2006; INEU et al., 2008) e hepato-protetora (BORGES et al., 2005). Além disto, diversos trabalhos têm demonstrado que o $(PhSe)_2$ possui efeito protetor contra a lipoperoxidação em ratos e camundongos (MEOTTI et al., 2004; SANTOS et al., 2005). De fato, Nogueira et al. (2004) sugerem que, pelo fato de o $(PhSe)_2$ possuir atividades semelhantes as da GPx, este composto é um bom candidato a ser um agente antioxidante. Partes destes efeitos protetores estão ligadas com a capacidade dos mesmos em decompor peróxidos na presença de tióis e de reduzir a peroxidação lipídica em diversos modelos experimentais.

Em doses farmacológicas o $(PhSe)_2$ apresenta baixa toxicidade tanto para ratos como para camundongos (PEROTTONI et al., 2005; FACHINETTO et al., 2006). No

entanto, a DL50 do disseleneto de difenila (via intraperitoneal [1200 $\mu\text{mol/kg}$] e subcutânea) para estes animais é maior que a do ebselen (400 $\mu\text{mol/kg}$ i.p.) (MEOTTI et al., 2003). Por outro lado, o tratamento crônico ou agudo com $(\text{PhSe})_2$, acarreta na inibição da atividade da enzima δ -ALA-D e na depleção de grupos tióis de moléculas endógenas de baixo peso molecular (MACIEL et al., 2003).

Alguns estudos relatam, que quando administrado de forma crônica, o $(\text{PhSe})_2$ pode causar danos cerebrais em camundongos e ratos (MACIEL et al., 2000; JACQUES-SILVA et al., 2001; NOGUEIRA et al., 2003). Além disso, o $(\text{PhSe})_2$ pode causar inibição da Na^+ , K^+ -ATPase cerebral de ratos (BORGES et al., 2005) e afetar o sistema glutamatérgico em plaquetas humanas (BORGES et al., 2004) e de ratos (NOGUEIRA et al., 2001). Dados da literatura também indicam que o $(\text{PhSe})_2$ possui efeito teratogênico, causando má formação óssea e outras anomalias em fetos de ratas tratadas com este composto (FAVERO et al., 2005).

1.8 Zinco

O zinco é classificado como metal essencial e tem várias funções biológicas comprovadas. Primariamente, destacam-se suas funções catalítica, estrutural e regulatória (MARET, 2005; MATHIE et al., 2006; CHAN et al., 2003). O zinco é um elemento imprescindível a uma variedade de funções bioquímicas e fisiológicas, nas quais estão envolvidas várias enzimas e proteínas que o requerem (VALLEE, 1995; ROFE et al., 2000; ZATTA et al., 2003; TAKEDA et al., 2005). É um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento, pois é fundamental para a proliferação e diferenciação celular. Além disso, é necessário para o sistema imune, metabolismo intermediário, metabolismo e reparação do DNA, reprodução e apoptose (MARET & SANDSTEAD, 2006).

O zinco é encontrado no plasma em concentrações aproximadas de $15\mu\text{M}$ estando ligado à albumina. Em tecidos, estão preferencialmente ligados às metalotioneínas (MTs). Dentre os tecidos, o cérebro apresenta a maior quantidade de zinco (100 - $150\mu\text{M}$) (MATHIE et al., 2006). Altas concentrações de zinco inibem a atividade da GPx em ratos causando um processo de estresse oxidativo (ISZARD et

al., 1995). Por outro lado, a sua deficiência causa um aumento na atividade da enzima glutationa-S-transferase (GST) e na peroxidação lipídica em soro, fígado e cérebro de ratos (YOUSEF et al., 2002). Esses dois processos levam a um estado de estresse oxidativo com comprometimento das funções celulares.

A homeostase do zinco é realizada por meio de proteínas sensoras e transportadoras de membranas, as quais regulam o influxo e o efluxo de zinco celular e vesicular, e por outras proteínas como tioneínas e metalotioneínas (MT). Essa última está envolvida na regulação da transferência do zinco entre organelas e na manutenção da concentração do elemento disponível dentro de uma faixa de variação específica (ROFE et al., 2000; MARET, 2005).

O zinco induz a síntese de proteínas ligantes de metal e MT (PEDERSEN et al., 1998). Entre os metais, é classificado como o melhor indutor de MT (BRACKEN & KLAASSEN, 1987). Há um considerável número de publicações relatando os efeitos benéficos do zinco em relação às várias alterações indesejáveis provocadas por alguns agentes como o álcool (ZHOU et al., 2005), mercúrio (ZALUPS & CHERIAN, 1992; PEIXOTO et al., 2003; PEIXOTO & PEREIRA, 2007; FRANCISCATO et al., 2009; FRANCISCATO et al., 2011), cádmio (BRZOSKA & MONIUSZKO-JAKONIUK, 2001), cobre (BREWER et al., 1998), organofosforados (GOEL et al., 2006), e por algumas patologias, como o diabetes (QURAIISHI et al., 2005), aterosclerose (REN et al., 2006), gastrite (TRAN et al., 2005) e a cirrose (BIANCHI et al., 2000). Tran et al. (2005) demonstraram que o zinco apresenta uma grande importância no tratamento contra a gastrite em camundongos, relacionando o papel protetor das MTs.

As MTs são consideradas agentes antioxidantes porque os complexos (clusters) zinco-enxofre são sensíveis às alterações no estado redox celular e os sítios oxidados induzem a transferência do zinco, que está ligado à MT, para locais de menor afinidade de outras proteínas. Com isso, as MTs podem ser importantes ao fornecerem zinco para os mecanismos de reparação gástrica (MARET & VALLEE, 1998).

Trabalhos recentes demonstram que o zinco é considerado um agente protetor contra a toxicidade do mercúrio. Ao ser utilizado preventivamente, protege a diminuição no ganho de peso corporal, evita a inibição da enzima δ -ALA-D renal e

hepática (PEIXOTO et al., 2003), bem como evita a insuficiência renal causada pela exposição ao mercúrio (PEIXOTO & PEREIRA, 2007).

A homeostase do zinco é um fator importante para a integridade da mucosa gástrica uma vez que o zinco evita a progressão de lesões gastrointestinais mediante a detoxificação de radicais livres e pela interrupção do processo inflamatório, agindo, portanto como um agente antioxidante e anti-inflamatório. Uma redução do conteúdo de zinco na mucosa gástrica pode ser observada em pacientes afetados por colite ulcerativa o qual está associado a um aumento de intermediários reativos de oxigênio (FAA et al., 2008). Estudos têm mostrado que o zinco na forma complexada apresenta atividade antiúlcera (SHARMA et al., 2003) e em associação a carnosina é um fármaco comumente usado no tratamento de lesões gástricas no Japão com atividade antiúlcera (ODASHIMA et al., 2006).

Considerando que os hábitos de vida da população como, por exemplo, o alto consumo de etanol associados com a formação exacerbada de EROs sendo essas intimamente relacionadas com a possível formação de lesões gástricas, estudamos os efeitos de dois elementos, selênio e zinco representados por $(\text{PhSe})_2$ e ZnCl_2 respectivamente, no modelo experimental de lesões gastrointestinais induzidas oralmente por etanol 70% em ratos, uma vez que selênio e zinco são elementos que apresentam potente ação antioxidante e que auxiliam na manutenção do bom funcionamento celular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral estudar os possíveis efeitos dos compostos de selênio e de zinco, representados respectivamente por $(\text{PhSe})_2$ e ZnCl_2 , no modelo de lesões gastrointestinais induzidas pela administração oral de etanol 70% em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

Este trabalho tem por objetivos específicos investigar:

Os efeitos do pré- e pós-tratamento com selênio nas alterações gástricas induzidas por etanol através da análise macroscópica, histopatológica e pelo índice de lesão;

Os efeitos do pré- e pós-tratamento com zinco nas alterações gastrointestinais induzidas por etanol através da análise macroscópica e pelo índice de lesão;

Os níveis de peroxidação lipídica e EROs bem como de grupos tióis e ácido ascórbico em estômago e intestino de ratos expostos às lesões gástricas induzidas por etanol e pré- ou pós-tratados com selênio ou zinco;

As atividades de enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT de ratos expostos a indução da lesão e pré- ou pós-tratados com selênio ou zinco.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 Artigo

3.1.1 Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress

Ineu, R.P., Pereira, M.E., Aschner, M., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T.

Artigo publicado no periódico *Food and Chemical Toxicology*



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress

R.P. Ineu^a, M.E. Pereira^a, M. Aschner^b, C.W. Nogueira^a, G. Zeni^a, J.B.T. Rocha^{a,*}^a Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocelulose, Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria 97105-900, RS, Brazil^b Department of Pediatrics, B-3307 Medical Center North, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN 37232-2495, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 31 January 2007
Accepted 3 June 2008

Keywords:
Selenium
Antioxidant
Gastric lesion
Ethanol
Oxidative stress

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate if diphenyl diselenide administered by oral route was effective in restoring gastric lesions induced by ethanol. The possible involvement of oxidative stress in diphenyl diselenide antiulcer effect was also evaluated. Different doses of diphenyl diselenide (dissolved in soya bean oil, 1 mL/kg) were administered orally 1 h before (pre-treatment study) or 1 h after ethanol (70%, v/v, 2 mL/kg, post-treatment study). Ulcer lesions were quantified 1 h after ethanol administration (pre-treatment protocol) or 1 h after diphenyl diselenide study (post-treatment protocol). Diphenyl diselenide (0.1–10 mg/kg or 0.32–32 μmol/kg), when administered previously or posteriorly prevented and reversed respectively, the development of gastric lesions induced by ethanol in rats. A number of markers of oxidative stress were examined in rat stomach including thiobarbituric acid reactive species (TBARS), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), non-protein thiol groups (NPSH) and ascorbic acid. In addition to attenuating the gastric lesions, low doses of diphenyl diselenide prevented (pre-treatment) or reversed (post-treatment) the ethanol-induced changes in TBARS, SOD activity and ascorbic acid content. In conclusion, the present data reveal that diphenyl diselenide, administered by oral route, possesses an antiulcer effect by modulating antioxidant mechanisms.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Gastric and duodenal ulcers affect a considerable number of people in the world and some authors consider gastric ulcer as the new “plague” of the 21st century (O'Malley, 2003). Infection with *Helicobacter pylori* plays an important role in the development of gastric ulcers (Correa and Houghton, 2007) and its association with other factors such as ethanol, stress, smoking, nutritional deficiencies and frequent ingestion of nonsteroidal-antiinflammatory drugs (NSAIDs) have contributed to the increase in the gastric ulcer incidence (Belaiche et al., 2002).

The mechanisms which trigger gastric lesions have been studied in various experimental models (Matsuda et al., 1998; Rodríguez et al., 2005; Sánchez et al., 2006). Ethanol has been shown to produce gastric damage by impairing gastric defensive factors, such as mucus and mucosa circulation (Szabo et al., 1992). Moreover, oxygen radicals and lipid peroxidation are

thought to be involved in the ethanol-induced gastric damage. As a consequence of their extreme chemical reactivity, reactive oxygen species (ROS) can cause severe changes at the cellular level which can culminate in cell death. At the molecular level, they attack essential cell constituents, such as proteins, lipids and nucleic acids, which can cause the loss of their biological function and formation of toxic compounds (Kaharaman et al., 2003).

The maintenance and repair of gastric mucosa are dynamic processes associated with proliferation and migration of epithelial cells and connective tissue to maintain/regain mucosal architecture (Johnson, 1994). It involves a complex host of mechanisms which work in tandem (1) to protect the gastric mucosa from damage and (2) to trigger repair mechanisms of the underlying mucosal defects by proliferating and migrating epithelial cells and connective tissue, resulting in reconstruction of the mucosal architecture (Holzer, 2001).

Cimetidine is one of the most potent histaminic H₂-receptor antagonists for inhibiting excessive histamine-induced acid secretion and is currently used worldwide to treat peptic ulcers. Lambat and colleagues reported that cimetidine reduces the generation of superoxide anion formed in the nitroblue-tetrazolium assay. In addition, cimetidine (1 mM) was able to reduce the iron-induced rise in lipid peroxidation in rat brain homogenates, proving that cimetidine has antioxidant properties (Lambat et al., 2002).

Abbreviations: CAT, catalase; CuSO₄, copper sulfate; NPSH, non-protein thiol groups; NSAIDs, nonsteroidal-antiinflammatory drugs; ROS, reactive oxygen species; H₂SO₄, sulphuric acid; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid reactive species.

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8140; fax: +55 55 3220 8978.
E-mail address: jtrocha@yahoo.com.br (J.B.T. Rocha).

Reports have shown that selenium-containing organic molecules are generally more potent antioxidants than “classical” antioxidants, and this fact serves as an impetus for an increased interest in the rational design of synthetic organoselenium compounds (Parnham and Graf, 1991; Nogueira et al., 2004). The prototype of this class of compounds is ebselen, an antioxidant agent with thiol-peroxidase and thioredoxin reductase-like activity that has been used with relative success in the treatment of acute human brain pathologies such as ischemia and stroke (Saito et al., 1998; Kondoh et al., 1999; Imai et al., 2003).

Diphenyl diselenide is an organoselenium compound that shares with ebselen a thiol peroxidase-like activity and other antioxidant properties (Wilson et al., 1989; Chaudiere et al., 1992; Rossato et al., 2002a; Meotti et al., 2004; Santos et al., 2005a,b; Barbosa et al., 2006). At antiinflammatory and antinociceptive doses, this compound has no overt toxicity in different tissues in mice, rats or rabbits (Nogueira et al., 2001; Zasso et al., 2005; de Bem et al., 2006, 2007). Furthermore, diphenyl diselenide has a protective role in a variety of experimental models associated with the overproduction of free radicals (Rossato et al., 2002b; Ghislène et al., 2003; Borges et al., 2005a; Barbosa et al., 2006). Our group has also demonstrated that diphenyl diselenide, when injected intraperitoneally, protects against ethanol and indomethacin-induced gastric lesions in rats. One of the mechanisms related to diphenyl diselenide protective effect is its antisecretory activity (Savegnago et al., 2006), which can be related to its ability of inhibiting different types of transport ATPases (Borges et al., 2005b; Kade et al., 2007).

The aim of the present study was to evaluate if diphenyl diselenide, administered by the oral route, could reverse gastric lesions induced by ethanol. The main hypothesis tested here was whether diphenyl diselenide might be efficient in attenuating ethanol-induced gastric lesions, and whether its effect might be associated with its ability to reduce oxidative stress.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male adult Wistar rats (215 ± 20 g) from our own breeding colony were used. Each cage contained two animals, on a 12-h light: 12-h dark cycle, at a room temperature of 22–24 °C, and with free access to food and water. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, the Federal University of Santa Maria RS, Brazil.

2.2. Materials

Diphenyl diselenide was prepared by the method previously described by Paulmier (1986). Analysis of the ¹H NMR and ¹³C NMR spectra showed that the compound possessed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of diphenyl diselenide (99.9%) was determined by GC/HPLC. The organoselenium compound was dissolved in soy oil. All other reagents were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.3. Ex vivo and in vivo experiments

2.3.1. Ethanol-induced gastric lesions

The gastric lesions were induced with ethanol according to the method described by Robert (1979), because it is more aggressive method to cause gastric mucosal lesions than indometacin. The lesions were induced in 36 h fasted rats. For this purpose the rats were kept in a cage equipped with a gate apparatus that hindered the animals feeding. The non-treated group received just the vehicle (soya bean oil, 1 mL/kg, p.o.) and did not receive ethanol. Diphenyl diselenide was administered orally at different doses (0.01–10.0 mg/kg, 1 mL/kg) 1 h before (pre-treatment protocol) or after (post-treatment protocol) oral administration of 70% ethanol (v/v, 2 mL/kg, p.o.) (treated groups). Data referring to group treated only with diphenyl diselenide are omitted because this compound did not induce gastric lesions. Still, since there was no difference between the ethanol (data not shown) and ethanol + soya bean oil groups, data derived from the ethanol group are also not shown in the results section. The diphenyl diselenide + ethanol group was compared to vehicle (oil) and to ethanol + vehicle (oil) groups because the organocompound was dissolved in soya bean oil (vehicle; control group). Cimetidine was used

as a positive control for ulcer healing and was administered 1 h after ethanol. This drug is a classical anti-histaminic H₂-receptor antagonist acting reducing gastric acid production.

In the pre-treatment protocol, 1 h after the administration of ethanol rats were sacrificed by decapitation. In the post-treatment protocol, animals were sacrificed 1 h after diphenyl diselenide administration. The stomachs were then immediately removed to determine the gastric lesion index and biochemical parameters.

2.3.2. The gastric lesion index

The stomachs were removed, opened along the greater curvature and fixed to determine the gastric lesion index. The ulcerative lesion index of each animal was calculated according to Gamberini et al. (1991) and using scored as follows: loss of mucosal folding, mucosal discoloration, edema or hemorrhage (score 1 each); ulcers/cm² less than 1 mm (score = number of ulcer X 2); ulcers more than 1 mm/cm² (score = number X 3); perforated ulcers (score = number X 4). The observer of gastric lesions was blinded to the treatments.

2.4. Histopathology

The stomachs were fixed in 10% formalin. For light microscopy examination, tissues were embedded in paraffin sections (5 μm) and stained with hematoxylin and eosin.

2.5. Oxidative stress

The role of oxidative stress in gastric lesions and the efficacy of diphenyl diselenide in attenuating both ROS generation and the extent of the lesions were evaluated. For this end, only animals from the 1 mg/kg diphenyl diselenide (pre- or post-treated) + ethanol groups and their respective control groups were used.

2.5.1. Lipid peroxidation

The extent of gastric lipid peroxidation was determined using the method described by Ohkawa et al. (1979).

2.5.2. Superoxide dismutase

Superoxide dismutase activity was assayed spectrophotometrically as previously described by Misra and Fridovich (1973). This method is based on the capacity of SOD to inhibit the autoxidation of epinephrine to adrenochrome. The color reaction was measured at 480 nm (Spectrophotometer U-2001 Hitachi – Japan). One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50% at 26 °C.

2.5.3. Ascorbic acid determination

Ascorbic acid determination was performed as previously described by Jacques-Silva et al. (2001). Stomach protein content was precipitated in 10 volumes of cold 4% trichloroacetic acid solution. An aliquot of the sample in a final volume of 1 mL of the solution was incubated for 3 h at 38 °C, and subsequently 1 mL H₂SO₄ 65% (v/v) was added to the medium. The reaction product was determined using a color reagent containing 4.5 mg/mL dinitrophenyl hydrazine and CuSO₄ (0.075 mg/mL) at 520 nm (Spectrophotometer U-2001 Hitachi – Japan).

2.5.4. Catalase activity

The stomach was homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (1/10, w/v) and centrifuged at 2400g for 15 min. The supernatant was assayed spectrophotometrically (Spectrophotometer U-2001 Hitachi – Japan) by the method of Aebi et al. (1995), which involves monitoring the disappearance of H₂O₂ in the presence of cell homogenate at 240 nm.

2.5.5. Non-protein thiol groups

Stomach NPSH was determined as previously described by Ellman (1959). The protein fraction was precipitated with 200 μL of 10% trichloroacetic acid followed by centrifugation. The colorimetric assay was carried out in 1 M phosphate buffer, pH 7.4. A standard curve using glutathione was constructed in order to calculate the NPSH in the tissue samples (Spectrophotometer U-2001 Hitachi – Japan).

2.6. Protein

Protein was measured by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as the standard protein source.

2.7. Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by LSD tests when appropriate. Differences between groups were considered to be significant at least when *p* < 0.05 (Statistica for Windows, Version 4.5 StatSoft, Inc.).

3. Results

3.1. Effect of diphenyl diselenide on ethanol-induced gastric lesions

Oral administration of 70% ethanol consistently induced damage in the rat glandular stomach (Fig. 1B), when compared to non-treated group (Fig. 1A). Post-treatment of rats with a single dose of diphenyl diselenide (0.01 mg/kg) did not reduce gastric lesions (Table 1). However, pre-treatment with diphenyl diselenide at doses equal (Table 1) or above to 0.01 mg/kg prevented against the development of gastric lesions when compared ethanol treated group (Table 1, Figs. 1 and 2). It is of note that when diphenyl diselenide was given before the ethanol, the dose of 0.01 mg/kg caused a protection that was numerically lower than that of 0.1 mg/kg, but this value was not statistically significant different from 0.1 mg/kg, indicating a possible sharp dose-response curve in the range between 0.01 and 0.1 mg. In ethanol administered rats, post-treatment with diphenyl diselenide at doses greater than 0.01 mg/kg reversed gastric lesions when compared to the ethanol group. Diphenyl diselenide administered orally at 1.0, 5.0 and 10.0 mg/kg reversed about of 80% the development of gastric lesions induced by 70% ethanol in rats (Table 1, Figs. 1D and 2D). Here the lack of a dose-response can be also a consequence of the sharpness of the response (in this case, between 0.1 and 1 mg/kg of (PhSe)₂).

3.2. Histopathology

Histopathological examination of stomachs from the ethanol treated rats revealed a severe swelling in the cell structure and a disorganizing cell process (architecture, shape, thickness) (1), as well as confluent necrosis on margin zone (2) (Fig. 2B), when compared with non-treated rats (Fig. 2A). Degenerative changes were not observed in the diphenyl diselenide (pre-treatment) + ethanol treated rats (Fig. 2C), diphenyl diselenide (post-treatment) + ethanol treated rats (Fig. 2D) or the cimetidine + ethanol treated rats (Fig. 2E).

3.3. Lipid peroxidation

TBARS content in stomach from rats exposed to ethanol was about 3.5-times higher than that from non-treated rats (vehicle, soya bean oil). Diphenyl diselenide or cimetidine significantly ($p < 0.05$) attenuated the ethanol-induced increases in TBARS (Fig. 3).

3.4. Ascorbic acid

Ethanol significantly ($p < 0.05$) reduced (75%) ascorbic acid levels. In a similar way to the results observed with pre-treatment

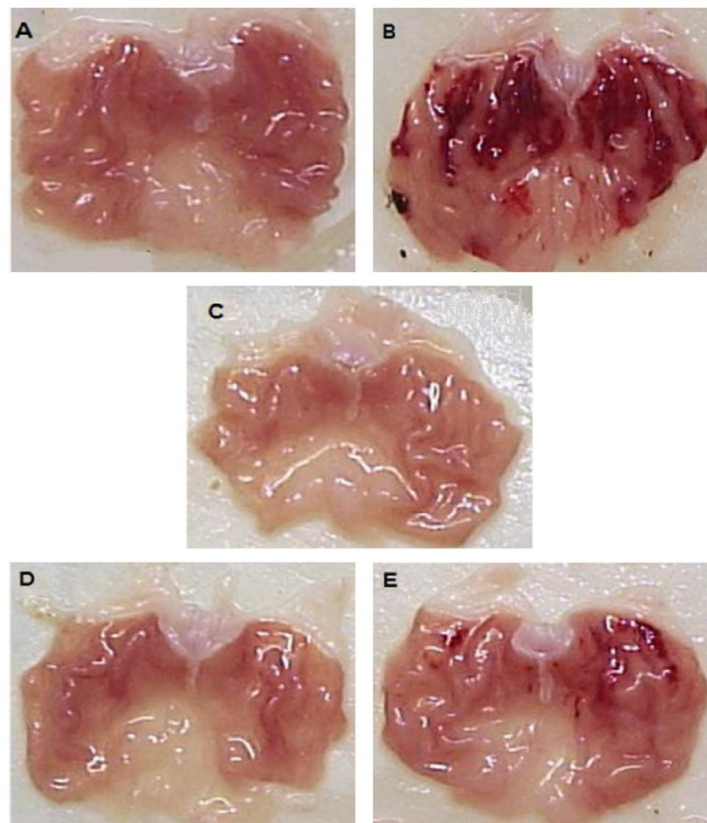


Fig. 1. Gross appearances of stomach from non-treated (A), ethanol + soya bean oil (B), ethanol + pre-treated (C) or + post-treated (D) with 1 mg/kg diphenyl diselenide, or + 50 mg/kg cimetidine (E).

Table 1
Effect of diphenyl diselenide on ethanol-induced gastric lesions

Groups (mg/kg)	Ulcer index	n	Inhibition%
Non-treated	1.71 ± 0.2 [*]	7	–
Etoh	17.20 ± 1.4	7	–
Etoh + cimetidine 50	4.80 ± 0.9 [*]	5	72.09
Se 0.01 + etoh	6.30 ± 1.0 [*]	5	63.37
Se 0.1 + etoh	4.80 ± 1.1 [*]	5	72.09
Se 1.0 + etoh	2.00 ± 0.0 [*]	5	88.37
Se 5.0 + etoh	3.10 ± 0.5 [*]	5	81.97
Se 10 + etoh	3.20 ± 0.6 [*]	5	81.39
Etoh + se 0.01	16.30 ± 1.8	5	5.23
Etoh + se 0.1	14.80 ± 2.0	5	13.95
Etoh + se 1.0	2.40 ± 0.5 [*]	5	86.04
Etoh + se 5.0	2.80 ± 0.6 [*]	5	83.72
Etoh + se 10	2.20 ± 0.4 [*]	5	87.20

Data are reported as means ± SEM of five to seven animals per group. One-Way/ANOVA LSD test and ^{*}p < 0.05 as compared with all groups without asterisks.

with diphenyl diselenide, where the organocompound prevented the reduction in ascorbic acid, post-treatment with diselenide or cimetidine reversed ascorbic acid levels to values found in non-treated rats (Fig. 4).

3.5. Superoxide dismutase

Treatment with ethanol significantly ($p < 0.05$) reduced SOD (57%) activity. In a similar way to the results observed with diphenyl diselenide pre-treatment, where the organocompound prevented the reduction in SOD activity, post-treatment with diselenide or cimetidine reversed SOD activity to normal values found in non-treated rats. Diphenyl diselenide and cimetidine

were associated with a 2.3-fold increased in SOD activity in relation to ethanol group (Fig. 5).

3.6. Catalase activity and non-protein thiol groups

Catalase activity decreased and NPSH was not altered by ethanol administration (data not shown). Diphenyl diselenide did not alter catalase activity or NPSH levels, and did not modify the catalase activity inhibition induced by ethanol (data not shown).

4. Discussion

The results of the present study reveal that oral administration of diphenyl diselenide effectively reverse gastric lesions induced by orally-administered ethanol. Here we were not able to obtain a dose-response curve for the protective effect of diphenyl diselenide, which may be related to an abrupt change in response with minimal variation in diselenide doses. In fact, when diselenide was given prior to ethanol an almost maximal response was obtained at a dose of 0.01 mg/kg and when it was administered after ethanol maximal protective effect was obtained with 1 mg/kg. Diphenyl diselenide also reverse the glandular cellular structure formation as well as the alterations in TBARS levels, SOD activity and ascorbic acid content. An obvious advantage of the oral route of diphenyl diselenide administration is in its greater patient convenience, compliance, and comfort.

Our results demonstrate that gastric injuries induced by ethanol are in the form of hemorrhagic mucosal lesions, which are not only confined to the rugae of the glandular segment. There was also evidence of intraluminal bleeding in animals from the ethanol group. Diphenyl diselenide, at low doses, caused a marked reduction in

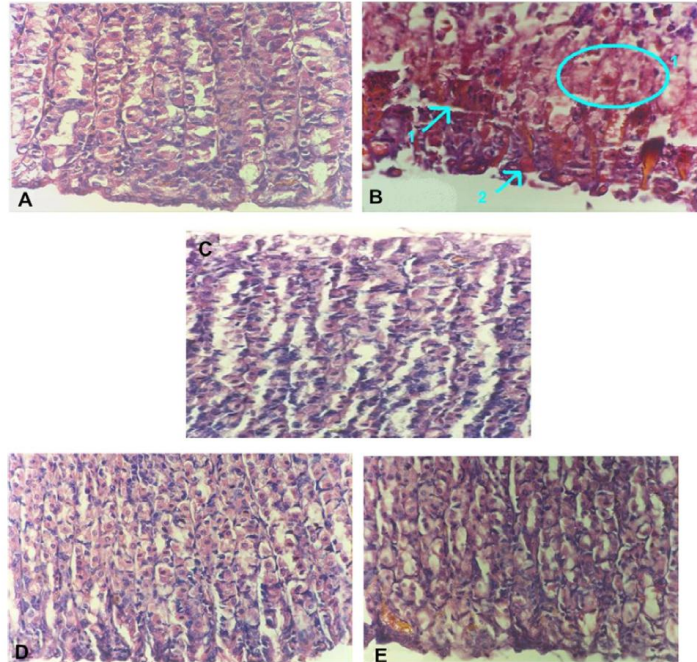


Fig. 2. Histological evaluation (40X) of stomach from non-treated (A), ethanol + soya bean oil (B), ethanol + pre-treated (C) or + post-treated (D) with 1 mg/kg diphenyl diselenide, or + 50 mg/kg cimetidine (E). The ethanol group presents a swelling and a disorganizing cell process (1), confluent necrosis on margin zone (2) caused by ethanol.

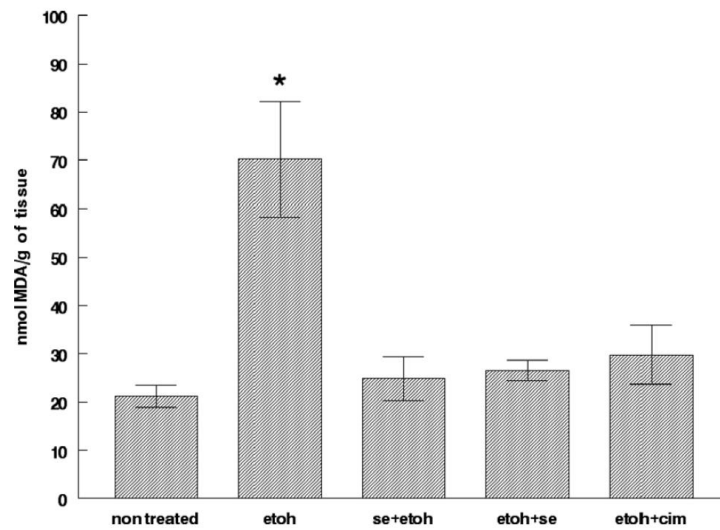


Fig. 3. Effect of diphenyl diselenide on TBARS levels in stomach of rats. Data are reported as means \pm SEM of five animals per group. One-Way/ANOVA LSD test and $^*p < 0.05$ as compared with all groups.

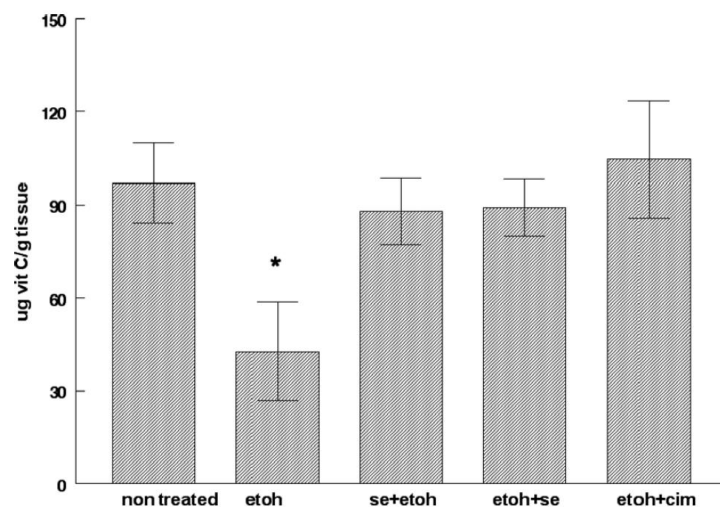


Fig. 4. Effects of diphenyl diselenide on ascorbic acid content in stomach of rats. Data are reported as means \pm SEM of five animals per group. One-Way/ANOVA LSD test and $^*p < 0.05$ as compared with all groups.

ulcer score and in intraluminal bleeding, indicating its therapeutic efficacy in preventing and reversing the ethanol-induced ulcerative effects (compare Fig. 1C–D to B and Fig. 2C–D to B). It is important to point out that diphenyl diselenide antiulcer effects are similar to those inherent to cimetidine (compare Fig. 1C–D to E and Fig. 2C–D to E), a drug used in promoting the healing of active stomach and duodenal ulcers, and in reducing ulcer pain.

Re-epithelialization is crucial in the recovery of the gastric mucosa upon ulceration. Ulcer healing is a complex and tightly regulated process of filling the mucosal defect with proliferating and migrating epithelial and connective tissue cells (Tarnawski et al., 2001). Growth factors, such as epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, and other cytokines produced locally by regenerating cells, control re-

epithelialization and the reconstruction of glandular structures (Tarnawski et al., 2001).

Ethanol produces gastric lesions by direct action on the mucosa (Szabo et al., 1987), impairment of gastric defensive factors and enhancement of lipid peroxidation products (Soll et al., 1990). Corroborating these observations, our data are consistent with the fact that exposure to ethanol causes a marked increase in gastric TBARS levels and a persistent state of oxidative stress. Diphenyl diselenide significantly diminishes the gastric increase of TBARS production caused by ethanol. In contrast, Savegnago et al. (2006) did not find involvement of lipid peroxidation in diphenyl diselenide antiulcer effect, when the chalcogen was administered intraperitoneally 1 h before the induction of gastric lesion with ethanol. These results emphasize the importance of the administration route, likely

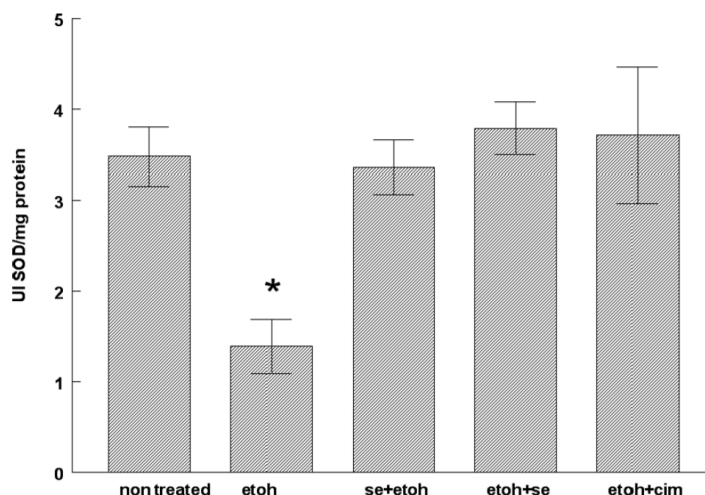


Fig. 5. Effects of diphenyl diselenide on superoxide dismutase activity in stomach of rats. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine auto oxidation by 50% at 26 °C. Data are reported as means \pm SEM of five animals per group. One-Way/ANOVA LSD test and $p < 0.05$ as compared with all groups.

establish that the antioxidant effect of diphenyl diselenide is related to a higher local concentration in stomach when administered orally.

Vitamin C is considered a marker of oxidative stress and reduced levels of it are consistent with enhanced oxidative stress (de Bem et al., 2006). We report here that ascorbic acid content are reduced by ethanol administration and normalized by diphenyl diselenide to levels indistinguishable from controls. These results are consistent with diphenyl diselenide's ability to reduced oxidative stress by ameliorating ascorbic acid content (Barbosa et al., 2006). Although the mechanism via which diselenide prevented and reversed the ethanol-induced decrease in ascorbic acid is unknown, it is possible to consider that this effect is related to the antioxidant activity of the chalcogen. Thus, we suppose that diphenyl diselenide spare part of the antioxidant defenses and indirectly spare ascorbic acid levels.

Another interesting finding of the present study is that ethanol-induced inhibition SOD activity was fully reverted by oral administration of diphenyl diselenide, reinforcing the antioxidant effect of this organoselenium compound. In fact, SOD, an enzymatic antioxidant defense, converts superoxide to hydrogen peroxide. Indeed, we have previously demonstrated that antioxidant defenses, such as SOD activity and ascorbic acid levels, which were significantly decreased in streptozotocin-treated rats, were reversed to normal levels after treatment with diphenyl diselenide (Barbosa et al., 2006).

Taken together, these results indicate that diphenyl diselenide, administered orally, can both prevent and reverse gastric lesions by decreasing lipid peroxidation levels, increasing ascorbic acid content and SOD activity all of which were altered by oral ethanol treatment. Diphenyl diselenide did not prevent or reverse the ethanol-induced inhibition of catalase activity, refuting the involvement of this antioxidant enzyme in the mechanisms of diphenyl diselenide's antiulcerative effects. Our findings also demonstrated that diphenyl diselenide, which at high concentrations can cause oxidation of thiols (Meotti et al., 2004), does not alter mucosa non-protein sulfhydryl groups. This result indicates that the reactivity with cellular thiols is not in and of itself the mediator of diphenyl diselenide protection.

In conclusion, the present data reveal that diphenyl diselenide, administered by oral route, possesses an antiulcer effect acting by

antioxidant mechanisms. Part of the antioxidant effect of diphenyl diselenide can be linked to a weak peroxidase activity and it is possible that other diselenides and the selenocystamine might do the same. Since diphenyl diselenide has been reported as a promising drug in view of its pharmacological properties, this study contributes in our understanding about its antiulcer activity.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

Financial support-provided by CNPq, CAPES and FAPERGS is gratefully acknowledged. J.B.T.R., C.W.N. and G.Z. are the recipients of CNPq fellowships.

References

- Aebi, U., Chiu, W., Milligan, R., 1995. Role of catalase on antioxidative defenses. *Journal of Structural Biology* 2, 117–118.
- Barbosa, N.B.V., Rocha, J.B.T., Wondracek, D.C., Perottoni, J., Zeni, G., Nogueira, C.W., 2006. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions* 163, 230–238.
- Belaiche, J., Burette, A., De Vos, M., Louis, E., Huybrechts, M., Deltenre, M., 2002. Observational survey of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. *Acta Gastroenterology* 65, 65–73.
- Borges, L.P., Borges, V.C., Moro, A.V., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., Zeni, G., 2005a. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. *Toxicology* 210, 1–8.
- Borges, V.C., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005b. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats. *Toxicology* 215, 191–197.
- Chaudiere, J., Courtin, O., Leclaire, J., 1992. Glutathione oxidase activity of selenocystamine: a mechanistic study. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 296 (1), 328–336.
- Correa, P., Houghton, J., 2007. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 133, 659–672.
- de Bem, A.F., Portella, R.L., Perottoni, J., Becker, E., Bohrer, B., Paixão, M.W., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2006. Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods. *Chemico-Biological Interactions* 162, 1–10.
- de Bem, A.F., de Lima, R.P., Farina, M., Perottoni, J., Paixão, M.W., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2007. Low toxicity of diphenyl diselenide in rabbits: a long-term study. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 101, 47–55.

- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70.
- Gamberini, M.T., Skorupa, L.A., Souccar, C., Lapa, A.J., 1991. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis-Tripteris*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86, 137–139.
- Ghislene, G., Porciúncula, L.O., Cimarosti, H., Rocha, J.B.T., Salbego, C.G., Souza, D.O., 2003. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocentent. *Brain Research* 986, 196–199.
- Holzer, P., 2001. Gastrointestinal mucosal defense: coordination by a network of messengers and mediators. *Current Opinion in Gastroenterology* 17, 489–496.
- Imai, H., Graham, D.I., Masayasu, H., Macrae, I.M., 2003. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. *Free Radical Biology and Medicine* 34, 56–63.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacology and Toxicology* 3, 119–127.
- Johnson, L.R., 1994. Regulation of gastrointestinal growth. In: Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York, pp. 611–641.
- Kade, I.J., Paixão, M.W., Rodrigues, O.E., Barbosa, N.B., Braga, A.L., Avila, D.S., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2007. Comparative studies on dicholesteroyl diselenide and diphenyl diselenide as antioxidant agents and their effect on the activities of Na⁺/K⁺ ATPase and δ -aminolevulinic acid dehydratase in the rat brain. *Neurochemical Research* 2007. 0364–3190 (Print) 1573–6903 (Online).
- Kaharaman, A., Erkasap, N., Koken, T., Serteser, M., Aktepe, F., Erkasap, S., 2003. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology* 183, 133–142.
- Kondoh, S., Nagasawa, S., Kawanishi, M., Yamaguchi, K., Kajimoto, S., Ohta, T., 1999. Effects of ebselen on cerebral ischemia and reperfusion evaluated by microdialysis. *Neurological Research* 21, 682–686.
- Lambat, Z., Limson, J.L., Daya, S., 2002. Cimetidine: antioxidant and metal-binding properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 54, 1681–1686.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randell, R.J., 1951. Protein measurement with folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Matsuda, H., Li, Y., Murakami, T., Yamahara, J., Yoshikawa, M., 1998. Protective effects of oleanolic acid oligoglycosides on ethanol- or indometacin-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sciences* 63 (17), 245–250.
- Meotti, F.C., Stangerlin, E.C., Zeni, G., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environmental Research* 94, 276–282.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1973. A peroxide-dependent reduction of cytochrome-c by NADH. *Biochemical Biophysical Acta* 3, 815–824.
- Nogueira, C.W., Rotta, L.N., Perry, M.L., Perry, M.L., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Research* 906, 157–163.
- Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chemical Review* 104, 6255–6285.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351–358.
- O'Malley, P., 2003. Gastric ulcers and GERD: the new "plagues" of the 21st century update for the clinical nurse specialist. *Clinical Nurse Specialist* 17, 286–289.
- Parnham, M.J., Graf, E., 1991. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Progress in Drug Research* 36, 9–47.
- Paulmier, C., 1986. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier, C. (Ed.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*. Pergamon Press, Oxford, pp. 25–51.
- Robert, A., 1979. Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 77, 761–767.
- Rodríguez, J.A., Theoduloz, C., Yáñez, T., Becerra, J., Schmeda-Hirschmann, G., 2005. Gastroprotective and ulcer healing effect of ferruginol in mice and rats: assessment of its mechanism of action using in vitro models. *Life Sciences* 78, 2503–2509.
- Rossato, J.I., Zeni, G., Mello, C.F., Rubin, M.A., Rocha, J.B.T., 2002a. Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. *Neuroscience Letters* 318, 137–140.
- Rossato, J.I., Ketzler, L.A., Centuriao, F.B., Silva, S.J.N., Ludtke, D.S., Zeni, G., Braga, A.L., Rubin, M.A., Rocha, J.B.T., 2002b. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochemical Research* 27, 297–303.
- Saito, I., Asano, T., Sano, K., Takakura, K., Abe, H., Yoshimoto, T., Kikuchi, H., Ohta, T., Ishibashi, S., 1998. Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 42, 269–277.
- Sánchez, M., Theoduloz, C., Schmeda-Hirschmann, G., Razmilic, I., Yáñez, T., Rodríguez, J.A., 2006. Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: in vitro–in vivo relationships. *Life Sciences* 79, 1349–1356.
- Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Weis, S.N., Fachineto, J.M., Favero, A.M., Nogueira, C.W., 2005a. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chemical Biological Interactions* 151, 159–165.
- Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nascimento, P.C.D., Marques, M.S., Nogueira, C.W., 2005b. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. *Food and Chemical Toxicology* 43, 1723–1730.
- Savegnago, L., Trevisan, M., Alves, D., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2006. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21, 86–92.
- Soll, A.H., Goyal, R., Kahn, C.R., 1990. Pathogenesis of peptic-ulcer and implications for therapy. *New England Journal of Medicine* 322, 909–916.
- Szabo, S., Trier, J.S., Allan, C.H., 1987. Ethanol induced damage to mucosal capillaries of rat stomach. Ultrastructural features and effects of prostaglandin E₂ and cysteamine. *Gastroenterology* 92, 13–22.
- Szabo, S., Nagy, L., Plebani, M., 1992. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric-mucosal injury and protection. *Clinica Chimica Acta* 206, 95–105.
- Tarnawski, A., Szabo, I.L., Husain, S.S., Soreghan, B., 2001. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. *Journal Physiology—Paris* 95, 337–344.
- Wilson, S.R., Zucker, P.A., Huang, R.R.C., Spector, A., 1989. Development of synthetic compound with glutathione peroxidase activity. *Journal American Chemical Society* 111, 5936–5939.
- Zasso, F.B., Gonçalves, C.E.P., Jung, E.A.C., Araldi, D., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. *Environmental Toxicology Pharmacology* 19, 283–289.

3.2 Manuscrito

3.2.1 Antioxidant effect of zinc chloride against ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats

Rafael Porto Ineu, Cláudia Sirlene Oliveira, Vitor Antunes Oliveira, Lucélia Moraes-Silva, Maria Ester Pereira.

Manuscrito submetido ao periódico *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Trace Elements in Medicine and Biology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Antioxidant effect of ZnCl₂ against ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats

Article Type: Original Paper

Section/Category: Biochemistry

Keywords: stomach, intestine, lipid peroxidation, oxidative stress, ulcer index

Corresponding Author: Dr. Maria Ester Pereira, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Maria

First Author: Rafael P Ineu, PhD

Order of Authors: Rafael P Ineu, PhD; Claudia S Oliveira, Graduated; Vitor A Oliveira, Master; Lucelia Moraes-Silva, Master; Maria Ester Pereira, Ph.D.

Abstract: The aim of the present study was to evaluate the gastrointestinal lesions caused by oral administration of ethanol 70% in rats and the possible effects of zinc chloride against the injuries. Rats were divided into five groups as: saline, ethanol, zn, zn+ethanol and ethanol+zn. Ethanol 70% (2 mL/kg) was administrated by gavage in 36 hours fasted rats. Zinc chloride (27 mg/kg, ~13 mg/kg of zinc) was given by gavage 1h before or 1 hour after the administration of ethanol 70%. Oral administration of ethanol consistently induced damage in the rat glandular stomach and intestine. Zinc did not demonstrate effect per se and significantly reduced gastrointestinal lesions when administered either before or after lesions induction. Ethanol induced enhancement of thiobarbituric acid reactive substance and reactive species levels, diminished the ascorbic acid and total protein SH content and catalase activity in stomach and intestine of rats. Zinc treatment prevented and reversed these alterations induced by ethanol. Non protein SH content was not altered by any treatment. The results suggest that the gastrointestinal protective effect of zinc in this experimental model could be due to its antioxidant effect.

Antioxidant effect of ZnCl₂ against ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats

Rafael Porto Ineu^a, Cláudia Sirlene Oliveira^a, Vitor Antunes Oliveira^a, Lucélia Moraes-Silva^a, Maria Ester Pereira^{a,b} *.

^a*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, 97105-900, RS, Brazil.*

^b*Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, 97105-900, RS, Brazil.*

* Corresponding author:

Dr^a. Maria Ester Pereira

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM - 97105-900 Santa Maria - RS – Brazil.

Tel: +55-55-3220-8799

Fax: +55-55-3220-8978

e-mail: pereirame@yahoo.com.br (Pereira, M. E.)

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the gastrointestinal lesions caused by oral administration of ethanol 70% in rats and the possible effects of zinc chloride against the injuries. Rats were divided into five groups as: saline, ethanol, zn, zn+ethanol and ethanol+zn. Ethanol 70% (2 mL/kg) was administered by gavage in 36 hours fasted rats. Zinc chloride (27 mg/kg, ~13 mg/kg of zinc) was given by gavage 1h before or 1 hour after the administration of ethanol 70%. Oral administration of ethanol consistently induced damage in the rat glandular stomach and intestine. Zinc did not demonstrate effect *per se* and significantly reduced gastrointestinal lesions when administered either before or after lesions induction. Ethanol induced enhancement of thiobarbituric acid reactive substance and reactive species levels, diminished the ascorbic acid and total protein SH content and catalase activity in stomach and intestine of rats. Zinc treatment prevented and reversed these alterations induced by ethanol. Non protein SH content was not altered by any treatment. The results suggest that the gastrointestinal protective effect of zinc in this experimental model could be due to its antioxidant effect.

Keywords: stomach, intestine, lipid peroxidation, oxidative stress, ulcer index

Introduction

The etiology of gastric damage caused by ethanol is still not fully understood but it has been shown to produce gastric damage by impairing gastric defensive factors such as mucus and mucosa circulation [1]. In addition, the gastric damage caused by ethanol may be due to increase of oxygen radicals and lipid peroxidation [2]. Reactive oxygen species (ROS) provoke severe changes at the cellular level leading to cell death because of their extreme reactivity. They attack essential cell constituents, leading to the formation of toxic compounds [3]. Both superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) and hydroxyl radical ($^{\circ}OH$) are involved in tissue damage through initiation of lipid peroxidation and disruption of the interstitial matrix [4]. Actually, many studies with wide types of compounds are tested to avoid the effects of ROS into the cells [5, 6, 7].

Zinc homeostasis is important for the integrity of gastric mucosal cells and is a key factor for the preservation of structural integrity of the intestinal barrier [8]. A reduction in zinc content of the mucosa is observed in patients affected by ulcerative colitis, which is associated with an increase in reactive oxygen intermediates [9]. Several key enzymes in the epithelial cells of the intestinal mucosa, such as carbonic anhydrase are metalloenzymes and require zinc for their action [10]. Also, zinc complexes have been shown to have antiulcer activity. Zinc–carnosine is an antiulcer drug commonly used in the treatment of gastric ulcers in Japan [11]. The zinc–indomethacin and zinc–naproxen complex more significantly reduce the ulcerogenic effects compared with the parent drug, without affecting its therapeutic action [12, 13]. Studies have revealed that a significant fraction of ingested alcohol is oxidized in gastric mucosa cells by a zinc-dependent enzyme, alcohol dehydrogenase [2]. This metabolic step is known as the first-pass metabolism of ethanol and is considered a gastrointestinal barrier against the systemic toxicity of ethanol [14].

The aim of the present study was to evaluate the gastrointestinal protective effects of zinc chloride ($ZnCl_2$) against the lesions caused by oral administration of ethanol in rats and the possible antioxidant effects of $ZnCl_2$ against damage induced by ethanol in stomach and intestine of rats. In line with all these previous results about zinc, this is a first time that the gastrointestinal benefits effects of $ZnCl_2$ against lesions caused by ethanol in rats is checked.

Materials and Methods

Animals

A total of 42 male adult Wistar rats (225 ± 10 g) from our own breeding colony were used (6 animals per group). Each cage contained four animals, on a 12-h light: 12-h dark cycle, at a room temperature of 22–24 °C, and with free access to food and water. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, the Federal University of Santa Maria RS, Brazil (096/2011).

Materials

Reagents used were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and standard commercial suppliers. The commercial kit for biochemical dosages was obtained from Labtest Diagnostica S.A., Brazil.

In vivo and ex vivo experiments

Ethanol-induced gastric lesions and zinc treatment

The gastric lesions were induced with ethanol according to the method described by Robert (1979) [15]. The lesions were induced in 36 hours fasted rats. For this purpose the rats were kept in a cage equipped with a gate apparatus that hindered the animals feeding, allowing only water. Ethanol (etOH) 70% was diluted in distilled water and administrated by gavage (v/v, 2 mL/kg, p.o.). The ZnCl₂ at dose of 27 mg/kg (1mL/kg) (~13 mg/kg of Zn²⁺) [16] was dissolved in saline 150 mM and administered (p.o.) 1 h before or 1 h after etOH administration. The animal groups were following:

- Group 1 – saline + saline
- Group 2 – etOH + saline
- Group 3 – zinc + saline
- Group 4 - zinc + etOH
- Group 5 – etOH + zinc

In the zinc pre-treatment protocol, 1 h after the administration of ethanol, rats were sacrificed by decapitation. In the zinc post-treatment protocol, animals were sacrificed also by decapitation 1 h after Zn administration. The tissues were

immediately removed to measure the biochemical parameters and stomachs were used to determine the gastric lesion index.

The gastric lesion index

The stomachs were removed, opened along the greater curvature and fixed to determine the gastric lesion index. The ulcerative lesion index of each animal was calculated according to Gamberini et al. (1991) [17] and using scored as follows: loss of mucosal folding, mucosal discoloration, edema or hemorrhage (score 1 each); ulcers/cm² less than 1 mm (score = number of ulcer X 2); ulcers more than 1 mm/cm² (score = number X 3); perforated ulcers (score = number X 4). The observer of gastric lesions was blinded to the treatment.

Tissue preparation

After 1 h of the last exposure, rats were euthanized by decapitation for blood and tissues collection. Serum was obtained by centrifugation at 2,000xg for 10 min (hemolyzed serum was discarded). Stomach, kidney and intestine (three portions of beginning, medium and end of intestine) were quickly removed, cleaned and homogenized in 10 volumes of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 2,000xg at 4°C for 10 minutes and a low-speed supernatant fraction (S1) was used for ex vivo assays.

Renal and Hepatic Metabolic parameters

Serum enzymes AST (aspartate aminotransferase) and ALT (alanine amino transferase) were used as the biochemical markers for the early acute hepatic damage and determined by the colorimetric method of Reitman and Frankel (1957) [18]. Renal function was analyzed by determining serum urea (Mackay and Mackay, 1927) [19] and creatinine levels (Jaffe, 1986) [20] (LABTEST, Diagnostic S.A., Minas Gerais, Brazil) by colorimetric method (Spectrophotometer U-2001 Hitachi).

Lipid peroxidation

The low supernatant fraction (S1) of stomach, intestine and kidney were used for thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) assay according to Ohkawa et al. (1979) [21]. Samples were incubated with 500 µL thiobarbituric acid (0.8%), 200 µL

SDS (8.1%) and 500 μ L acetic acid for 2 h at 95°C. The amount of TBARS produced was measured at 532 nm (Spectrophotometer U-2001 Hitachi), using MDA as an external standard.

Reactive Species measurement

Formation of reactive species (RS) was estimated according to a previous report by Ali et al. (1992) [22] and adapted for stomach, intestine and kidney homogenates. An aliquot of S1 was incubated with 10 μ L of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; 10 μ M). The RS levels were determined by a spectrofluorimetric method. The oxidation of DCFH-DA to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) is measured for the detection of intracellular RS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 525 and 488 nm of excitation 60 minutes after the addition of DCFH-DA to the medium.

Ascorbic acid determination

Ascorbic acid determination was performed as previously described by Carr et al. (1983) [23] and Jacques-Silva et al. (2001) [24] with some modifications. Tissue (stomach, intestine and kidney) S1 protein content was precipitated in 10 volumes of cold 4% trichloroacetic acid solution and centrifuged. An aliquot of 300 μ L of precipitated S1 in a final volume of 1 mL of the solution was incubated for 3 h at 38 °C, and subsequently 1 mL H₂SO₄ 65% (v/v) was added to the medium. The reaction product was determined using a color reagent containing 4.5 mg/mL dinitrophenyl hydrazine (DNPH) and CuSO₄ (0.075 mg/mL) at 520 nm and calculated using a standard curve (1.5–4.5 μ mol/L ascorbic acid freshly prepared in sulfuric acid) (Spectrophotometer U-2001 Hitachi – Japan).

Catalase activity

The supernatant (S1) (stomach, intestine and kidney) were assayed (Spectrophotometer U-2001 Hitachi – Japan) by the method of Aebi et al. (1995) [25], which involves monitoring the disappearance of H₂O₂ in the presence of cell homogenate at 240 nm. Samples of S1 were added to a cuvette and the reaction was started by the addition of 100 μ L of freshly prepared 300 mM H₂O₂ in phosphate buffer (50 mM, pH 7.0; total volume of incubation: 1 ml).

Thiol groups

Thiol group from stomach, intestine and kidney were determined as previously described by Ellman (1959) [26]. To determination of the total thiol groups the S1 was used and to determine non-protein thiol (NPSH) the protein fraction of S1 was precipitated with 200 μ L of 10% trichloroacetic acid followed by centrifugation. The colorimetric assay was carried out in 1 M phosphate buffer, pH 7.4. A standard curve using glutathione was constructed in order to calculate the SH in the tissue samples (Spectrophotometer U-2001 Hitachi - Japan).

Protein determination

Protein was measured by the method of Bradford (1976) [27] using bovine serum albumin as the standard protein source.

Statistical analysis

All values are expressed as media \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by posthoc Tukey's tests when appropriate. Differences between groups were considered to be significant at least when $p < 0.05$.

Results

Effect of zinc on ethanol-induced gastric lesions

Macroscopic appearance of hemorrhagic ulcers induced by gastric administration of ethanol is shown in figure 1. Figure 1A shows the normal glandular stomach of control group; figure 2B shows that oral administration of ethanol 70% consistently induced damage in this structure. Figure 1C demonstrated no zinc toxicity in the gastric mucosal. Both pre- and post-treatment of rats with a single dose of $ZnCl_2$ reduced gastric lesions induced by ethanol (Figure 1D and 1E); however zinc pre-exposure was more effective. These results are shown in Table 1 as ulcer index; the one-way ANOVA revealed a significant ($p < 0.05$) zinc protection (89%) and reversion (79%) of gastric lesions induced by ethanol.

Renal and Hepatic Metabolic parameters

Table 1 shows that renal (urea and creatinine) and hepatic (AST and ALT) markers parameters were not significantly altered by ethanol and/or ZnCl₂ treatment.

<Insert figure 1 and table 1 here>

Lipid peroxidation

Figure 2 shows the TBARS content in stomach, intestine and kidney from rats exposed to ethanol and pre- or post-treated with zinc. One-way ANOVA revealed that ethanol caused a significant increase in TBARS production in stomach [F(4,29)=19.26 (p<0.001)] and intestine [F(4,29)=23.47 (p<0.001)], but not in kidney. Zinc pre-exposure prevented significantly this effect in both tissues and post-treatment with zinc was completely efficient only in stomach (Figure 2A and 2B), showing a partial effect in intestine.

<Insert figure 2 here>

RS measurement

As can be observed in figure 3, zinc was efficient to decrease the production of spontaneously RS formation in stomach (figure 3A) [F(4,29)= 155.05 p<0.0001] and intestine (figure 3B) [F(4,29)= 81.05 p<0.0001] after 60 minutes of addition the DCFH-DA. Interestingly, pre-treatment with zinc showed a complete blockage against ethanol induction. On the other hand, zinc was partially efficient into reverted the effects of ethanol in stomach and intestine.

<Insert figure 3 here>

Ascorbic acid determination

One-way ANOVA revealed that ethanol significantly reduced the stomach [F(4,29)= 26.01 p<0.001] and intestine [F(4,29)= 43.75 p<0.001] ascorbic acid levels (Figure 4). Here, only the pre-treatment with zinc was significant able to protect this alteration (Figure 4A and 4B). One more time, this parameter was not changed in kidney (Figure 4C).

<Insert figure 4 here>

Catalase activity

Figure 5 shows that CAT activity decreased significantly in the ethanol group when compared to the control group in stomach [F(4,29)= 8.78 p<0.01], intestine [F(4,29)= 14.35 p<0.001] and kidney [F(4,29)= 3,94 p<0.05]. Zinc treatment increased significantly CAT activity in pre- and post-treatment animals in comparison to ethanol in stomach, intestine and kidney.

<Insert figure 5 here>

Thiol content

There was not a statistical difference in NPSH for all groups in the three tissues tested (data not shown). Adding, kidney total protein SH content did not change (Figure 6C). Otherwise, one-way ANOVA demonstrated that ethanol caused a significant decrease in the total protein SH content in stomach [F(4,29)= 34.69 p<0.001] and intestine [F(4,29)= 24,74 p<0.001]. Total protein SH content increased significantly in pre- and post-treatment of zinc in stomach and intestine (Figure 6A and 6B).

<Insert figure 6 here>

Discussion

Various factors, such as the impairment of the balance between aggressive (increased acid secretions) and protective factors, stress, trauma, sepsis, hemorrhagic shock, burns, pulmonary and liver diseases, *Helicobacter pylori*, use of cigarettes and alcohol, and steroidal and non-steroidal drugs have been shown to play a role in gastric ulcerogenesis [28]. This study clearly shows the ability of ZnCl₂ to reduce ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats. The mechanism of gastrointestinal protective effect of zinc is far from clear. However, Tran et al. (2005) [29] already demonstrated that short-term zinc supplementation attenuates *Helicobacter felis*-induced gastritis in the mouse.

The macroscopic results showed marked gastric mucosal damage in rats 1 h after oral ethanol administration (Figure 1). This led to elongated hemorrhagic lesions, confined to the glandular portion with highest subjective ulcer-scoring. Both pre- and post-treatment with zinc showed impressive mucosal healing demonstrated that pre- being more potent than post-treatment (Table 1). It is been known that high dose of some metals (mercury, lead, cadmium, aluminum, arsenic) are toxic to various tissues, otherwise, in this study neither renal (urea and creatinine) nor

hepatic (AST and ALT) markers parameters were altered by treatments (Table 1), indicating that kidney and liver are not organs target in this model of intoxication with ethanol or zinc. It is very important because in ideal model, only gastric system should be altered. The main proposal of this study was to verify the zinc effect in gastrointestinal parameters, indeed concomitantly to this, it is already known that oral zinc renal toxicity in rats is around 550 mg/kg [30] so, we verified that zinc had not renal toxic effects in this dose tested (13 mg/kg).

Amongst various factors, oxidative stress has been implicated for the induction and pathogenesis of the ethanol-mediated gastroduodenal injury [1, 2]. Extensive research has proved that antioxidants might be effective not only in protecting against gastric mucosal injury, but also inhibiting progression of gastric ulcer [5]. Our results showed an increase of TBARS and RS productions along with a decrease of total SH content, a depletion of ascorbic acid content and an inhibition of catalase activity in gastrointestinal tissues, after oral ethanol administration. Previous study [5] from our group demonstrated that the increase of stomach TBARS production induced by ethanol is avoided by treatment with an organoselenium derivative compound. In line with this, the present study shows that the pre- and post-treatment with zinc chloride was able to prevent and revert the TBARS and RS formation in stomach and intestine of rats with gastrointestinal lesions induced by ethanol (Figure 2 and Figure 3).

Some authors consider that ascorbic acid is a marker of oxidative stress and reduced levels of it are in accordance with enhanced oxidative stress [31]. In this study we verified that stomach and intestine ascorbic acid content were reduced by oral ethanol administration and only the pre-treatment with zinc was able to normalize to control levels (Figure 4). So, these results are in accordance with our previous study [5] that demonstrated diphenyl diselenide also enhanced the stomach ascorbic acid content in comparison with ethanol groups. Although the mechanism involved in the zinc prevention on the ethanol-induced decreases in ascorbic acid in stomach and intestine tissues is unknown, it is possible to consider that this effect is related to the antioxidant activity of zinc.

The exact mechanism of gastric mucosa pathogenesis caused by ethanol is not well understood. Recent studies have demonstrated that active oxygen species might be involved in gastric mucosal damage. To confirm the role of free radicals in the process of ulceration, various experiments have been conducted using enzymatic

antioxidants such as SOD and catalase [32]. Our results showed that oral administration of ethanol 70% caused a significant inhibition of gastrointestinal and renal catalase activity and the pre- and post-treatment with zinc was able to avoid the damage effect (Figure 5).

The induced lipid peroxidation might cause increased glutathione consumption. The sulfhydryl compounds help in recycling endogenous antioxidant vitamins, thereby, preventing lipid peroxidation. More importantly, they also protect mucus by preventing rupture of the disulfide bridges that join the mucus subunits and maintain its structural integrity. The decrease in endogenous thiol in ethanol-induced gastric injury and its role in mucosal protection have been demonstrated earlier [33]. Both pre- and post-treatment with zinc provided nearly similar and significant suppression of the oxidative damages to the biomacromolecules (Figure 6). This might decrease the ulcer progression and promotes healing of gastric lesions induced by acute intake of ethanol.

We believe that zinc decreases the gastrointestinal TBARS and RS production due to its ability to restore the ascorbic acid content and total thiols groups, leading to an increase of stomach and intestine catalase activity of rats induced by oral administration of ethanol. Based in these all results together, we can conclude that zinc chloride prevents the ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats showing great antioxidant properties.

Conflicts of interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

Financial support-provided by CNPq, CAPES and FAPERGS is gratefully acknowledged. M.E.P. is the recipient of CNPq fellowship (503867/2011-0), and R.P.I., C.S.O., V.A.O. and L.M-S. are the recipients of CAPES fellowships.

References

- [1] Szabo S, Nagy L, Plebani M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. *Clin Chim Acta* 1992;206:95-105.
- [2] Mutoh H, Hiraishi H, Ota S, Ivey KJ, Terano A, et al. Role of oxygen radicals in ethanol-induced damage to cultured gastric mucosal cells. *Am J Physiol* 1990;258:G603-9.
- [3] Kahraman A, Erkasap N, Koken T, Serteser M, Aktepe F, et al. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology* 2003;183:133-42.
- [4] Hogg N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J* 1992;281 (Pt 2):419-24.
- [5] Ineu RP, Pereira ME, Aschner M, Nogueira CW, Zeni G, et al. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 2008;46:3023-9.
- [6] Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004;104:6255-85.
- [7] Savegnago L, Trevisan M, Alves D, Rocha JBT, Nogueira CW, et al. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environ Toxicol Phar* 2006;21:86-92.
- [8] Lambert JC, Zhou ZX, Wang LP, Song ZY, McClain CJ, et al. Preservation of intestinal structural integrity by zinc is independent of metallothionein in alcohol-intoxicated mice. *Am J Pathol* 2004;164:1959-66.
- [9] Faa G, Nurchi VM, Ravarino A, Fanni D, Nemolato S, et al. Zinc in gastrointestinal and liver disease. *Coordin Chem Rev* 2008;252:1257-69.
- [10] Kiefer LL, Fierke CA. Functional-Characterization of Human Carbonic-Anhydrase-Ii Variants with Altered Zinc-Binding Sites. *Biochemistry* 1994;33:15233-40.

- [11] Odashima M, Otaka M, Jin M, Wada I, Horikawa Y, et al. Zinc L-carnosine protects colonic mucosal injury through induction of heat shock protein 72 and suppression of NF-kappa B activation. *Life Sci* 2006;79:2245-50.
- [12] Singla AK, Wadhwa H. Zinc-Indomethacin Complex - Synthesis, Physicochemical and Biological Evaluation in the Rat. *Int J Pharm* 1995;120:145-55.
- [13] Sharma J, Singla AK, Dhawan S. Zinc-naproxen complex: synthesis, physicochemical and biological evaluation. *Int J Pharm* 2003;260:217-27.
- [14] Julkunen RJK, Dipadova C, Lieber CS. 1st Pass Metabolism of Ethanol - a Gastrointestinal Barrier against the Systemic Toxicity of Ethanol. *Life Sci* 1985;37:567-73.
- [15] Robert A. Cytoprotection by Prostaglandins. *Gastroenterology* 1979;77:761-7.
- [16] Peixoto NC, Roza T, Flores EM, Pereira ME. Effects of zinc and cadmium on HgCl₂-delta-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. *Toxicol Lett* 2003;146:17-25.
- [17] Gamberini MT, Skorupa LA, Souccar C, Lapa AJ. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1991;86 Suppl 2:137-9.
- [18] Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 1957;28:56-63.
- [19] Mackay EM, Mackay LL. The Concentration of Urea in the Blood of Normal Individuals. *J Clin Invest* 1927;4:295-306.
- [20] Jaffe MZ. Methods determining creatinine. *Physiol Chem* 1986;10:39-40.
- [21] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal-Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.

- [22] Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1992;13:637-48.
- [23] Carr RS, Bally MB, Thomas P, Neff JM. Comparison of methods for determination of ascorbic acid in animal tissues. *Anal Chem* 1983;55:1229-32.
- [24] Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EM, Rocha JB. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 2001;88:119-25.
- [25] Aebi H, Chiu WC, Milligan R. Role of catalase on antioxidative defenses. *J Struct Biol* 1995;2:117-8.
- [26] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics* 1959;82:70-7.
- [27] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- [28] Hooderwerf WA, Pasricha PJ. Pharmacotherapy of gastric acidity, peptic ulcers, and gastroesophageal reflux disease. In: L. B, (Ed.). *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. New-York: Mc Graw-Hill, 2006. p. 967–81.
- [29] Tran CD, Campbell MA, Kolev Y, Chamberlain S, Huynh HQ, et al. Short-term zinc supplementation attenuates *Helicobacter felis*-induced gastritis in the mouse. *J Infect* 2005;50:417-24.
- [30] Maita K, Hirano M, Mitsumori K, Takahashi K, Shirasu Y. Sub-Acute Toxicity Studies with Zinc-Sulfate in Mice and Rats. *J Pestic Sci* 1981;6:327-36.
- [31] de Bem AF, de Lima Portella R, Perottoni J, Becker E, Bohrer D, et al. Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods. *Chem Biol Interact* 2006;162:1-10.
- [32] Pihan G, Regillo C, Szabo S. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol- or aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 1987;32:1395-401.

- [33] Bertrand V, Guessous F, Le Roy AL, Viossat B, Fessi H, et al. Copper-indomethacinate associated with zwitterionic phospholipids prevents enteropathy in rats: effect on inducible NO synthase. *Dig Dis Sci* 1999;44:991-9.

Legends for figures

Figure 1 - Gross appearances of stomach from groups: (A) saline, (B) ethanol, (C) zinc, (D) zinc + ethanol, (E) ethanol + zinc.

Figure 2 – Lipid peroxidation (TBARS) of tissues from rats exposed to induction of lesions by etOH and pre or post-treated with zinc (27 mg/kg). **A)** stomach; **B)** intestine; **C)** kidney. Data are reported as means \pm S.E.M. *One-Way/ANOVA Tukey's test; different letters represent significant statistical difference among groups ($p < 0.05$), $n = 6$.*

Figure 3 – Reactive species (RS) of tissues from rats exposed to induction of lesions by etOH and pre or post-treated with zinc (27 mg/kg). **A)** stomach; **B)** intestine; **C)** kidney. Data are reported as means \pm S.E.M. *One-Way/ANOVA Tukey's test; different letters represent significant statistical difference among groups ($p < 0.05$), $n = 6$.*

Figure 4 – Vitamin C content of tissues from rats exposed to induction of lesions by etOH and pre or post-treated with zinc (27 mg/kg). **A)** stomach; **B)** intestine; **C)** kidney. Data are reported as means \pm S.E.M. *One-Way/ANOVA Tukey's test; different letters represent significant statistical difference among groups ($p < 0.05$), $n = 6$.*

Figure 5 – Catalase activity of tissues from rats exposed to induction of lesions by etOH and pre or post-treated with zinc (27 mg/kg). **A)** stomach; **B)** intestine; **C)** kidney. Data are reported as means \pm S.E.M. *One-Way/ANOVA Tukey's test; different letters represent significant statistical difference among groups ($p < 0.05$), $n = 6$.*

Figure 6 – Total thiol content of tissues from rats exposed to induction of lesions by etOH and pre or post-treated with zinc (27 mg/kg). **A)** stomach; **B)** intestine; **C)** kidney. Data are reported as means \pm S.E.M. *One-Way/ANOVA Tukey's test; different letters represent significant statistical difference among groups ($p < 0.05$), $n = 6$.*

Table 1 – Quantification of gastric lesions and serum biochemical parameters of rats exposure to ethanol-induced gastric lesions and treated with zinc (27 mg/kg).

Groups	Ulcer index	Inhibition %	AST (U/mL)	ALT (U/mL)	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Saline	0.0 ^a	100	81±5.1 ^a	18±3.4 ^a	34±1.7 ^a	0.81±0.10 ^a
EtOH	14.0±0.4 ^b	-	84±4.8 ^a	21±4.9 ^a	35±3.2 ^a	0.79±0.09 ^a
Zn	0.5±0.2 ^a	96	80±6.1 ^a	16±1.5 ^a	36±5.5 ^a	0.89±0.08 ^a
Zn+EtOH	1.5±0.2 ^a	89	86±1.5 ^a	28±5.2 ^a	37±1.4 ^a	0.68±0.12 ^a
EtOH+Zn	3.0±0.3 ^c	78	83±2.1 ^a	23±3.2 ^a	39±2.3 ^a	0.78±0.13 ^a

Data are reported as means ± S.E.M. *One-Way/ANOVA Tukey's test; different letters represent significant statistical difference among groups (p<0.05).*

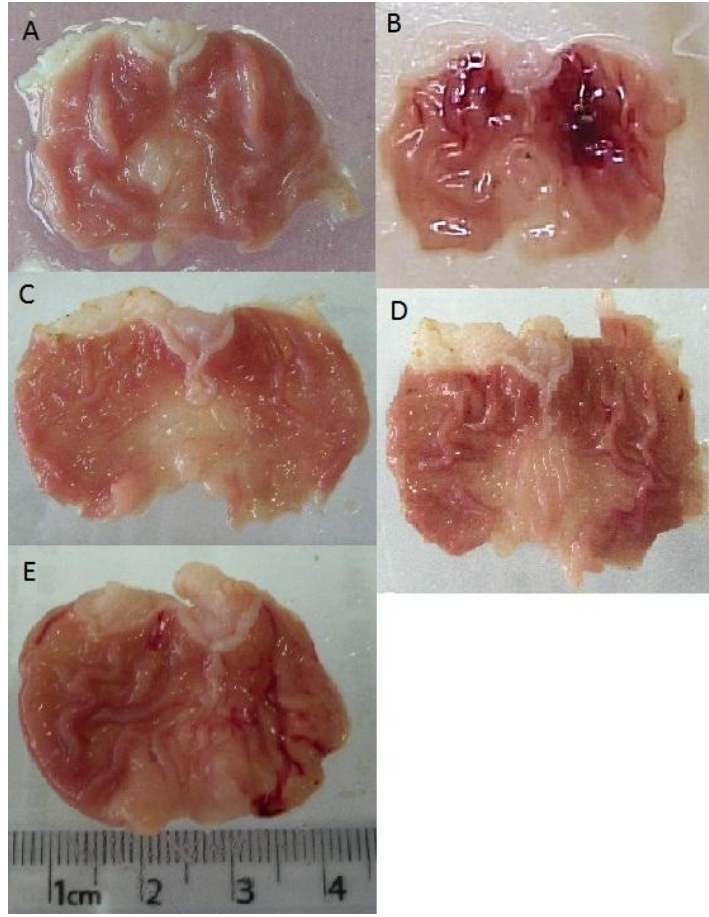


Figure 1

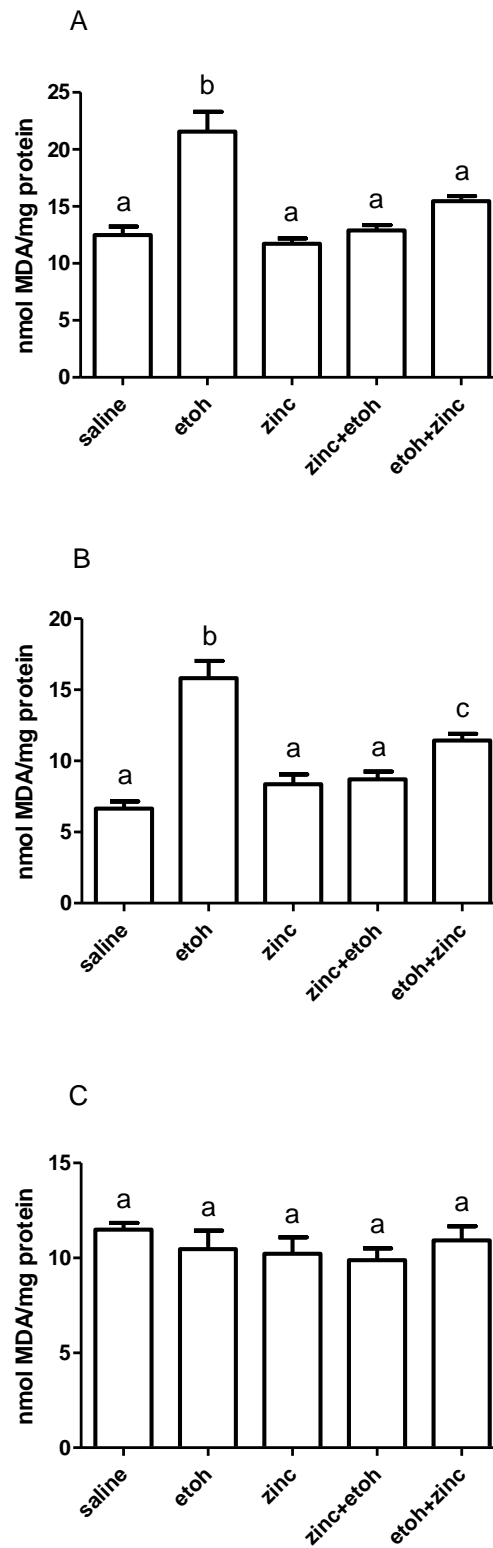


Figure 2

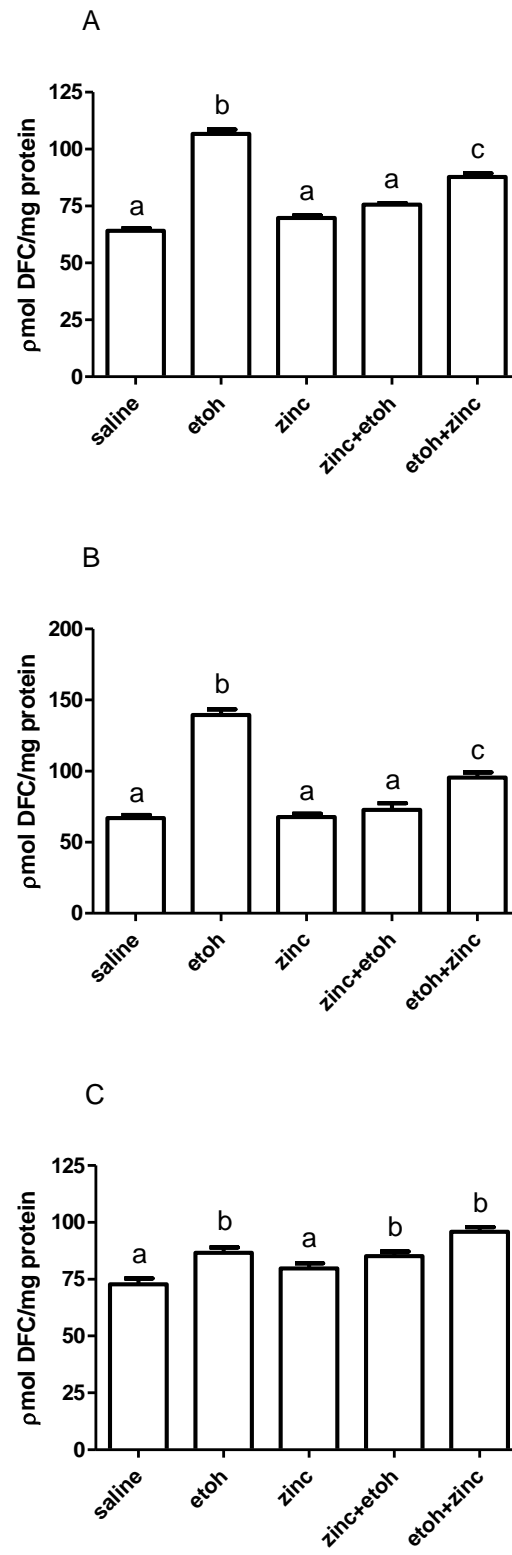


Figure 3

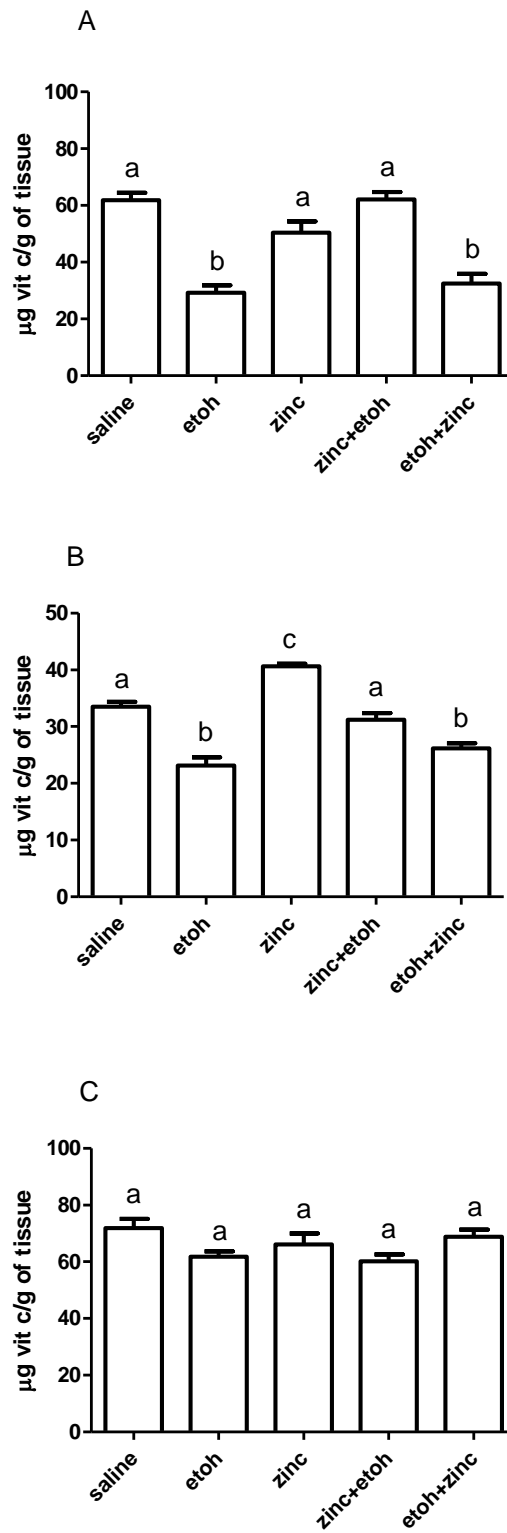


Figure 4

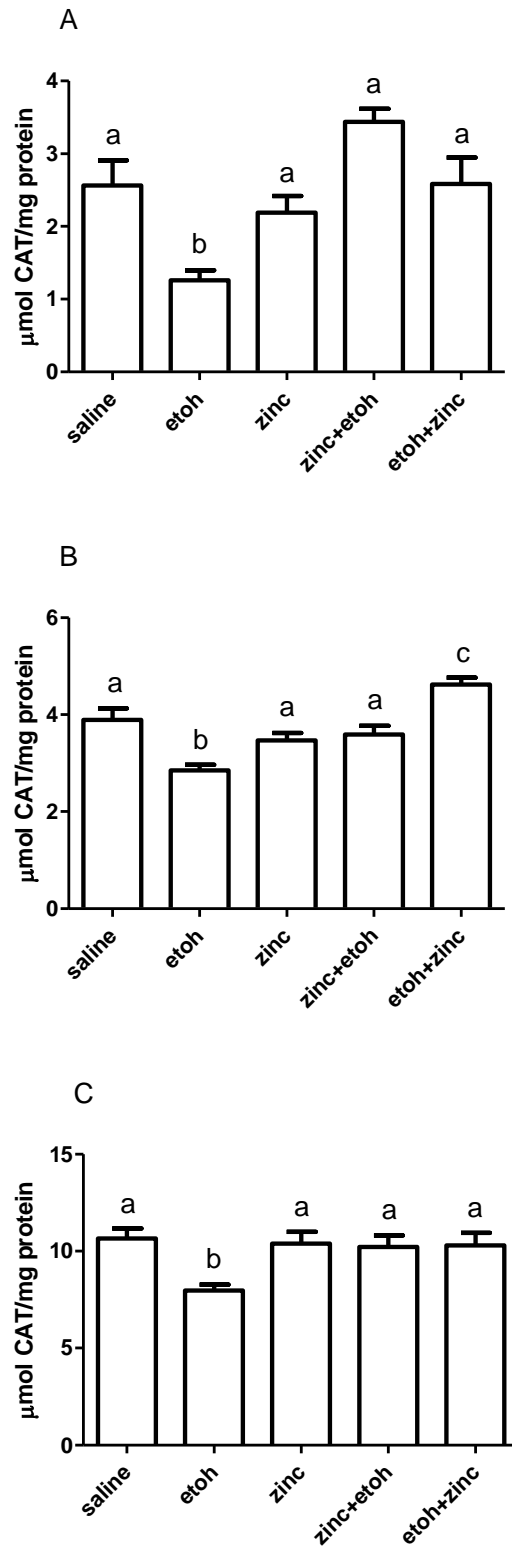


Figure 5

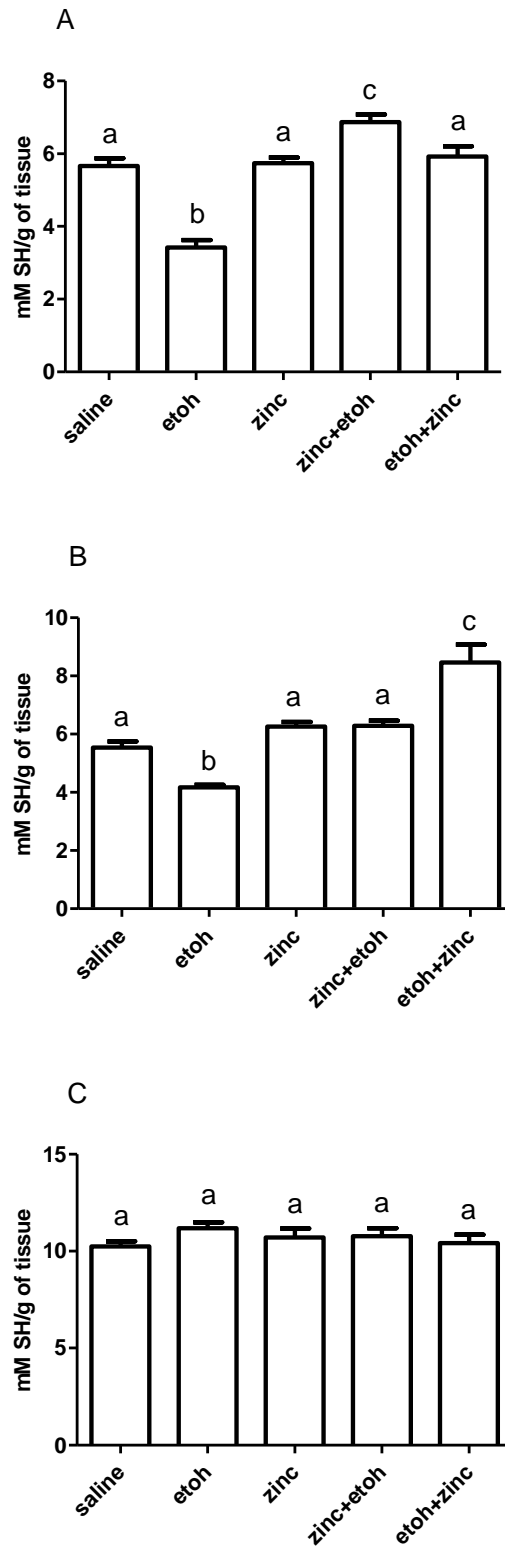


Figure 6

4 DISCUSSÃO

Atualmente a hiper atividade gástrica e a úlcera são muito comuns e atingem um grande número de pessoas mundialmente (RAO et al., 2000). A patogênese das ulcerações está amplamente aceita, mas seu mecanismo ainda não está muito bem entendido. O aumento da secreção gástrica, da ação da pepsina, das contrações na musculatura da parede gástrica, o desequilíbrio nas defesas endógenas e a redução do muco, da secreção do bicarbonato e da irrigação sanguínea representam alguns fatores da ulceração gástrica (GALUNSKA et al., 2002).

Muitos fatores como o uso de álcool etílico (MIZUI et al., 1987), AINEs como a indometacina e o ácido acetilsalicílico (TAKEUCHI et al., 1991; VAANANEN et al., 1991; NAITO et al., 1998), a isquemia-reperfusão, o estresse (YOSHIKAWA et al., 1987) e a infestação pela bactéria *Helicobacter pylori* (DAVIES et al., 1994) provocam o acúmulo de H₂O₂ e causam o surgimento de EROs. Essas agredem o tecido gástrico com a destruição das membranas celulares e causam lesões gástricas (YOSHIKAWA et al., 1987). Os mecanismos que induzem as lesões gástricas têm sido estudados em vários modelos experimentais de úlcera como: o etanol (SZABO et al., 1992), o ácido acetilsalicílico e o diclofenaco (LEYCK & PARNHAM, 1990) e estresse (TABUCHI et al., 1995). O dano gástrico induzido pelo etanol está relacionado a um prejuízo nas defesas gástricas, por alteração na produção de muco e na circulação da mucosa, bem como a produção de EROs (SZABO et al., 1992).

Tem sido observado que o consumo de álcool pode gerar erosão gástrica hemorrágica aguda em humanos, sendo que o uso crônico pode resultar em gastrite, caracterizada por edema da mucosa, hemorragia subepitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (MATSUHASHI et al., 2007). Por ser um agente necrotizante de ação direta na mucosa gástrica, o etanol induz lesões gástricas através do rompimento da barreira muco-bicarbonato, danos no endotélio vascular, desordem da microcirculação e isquemia, com conseqüente produção de radicais livres, acarretando no aparecimento de lesões gástricas hemorrágicas. Além disso, o etanol também induz liberação de endotelinas, degranulação de mastócitos e inibição da síntese de prostaglandinas, resultando na redução da produção de muco

(PAN et al., 2008). Também se encontra na literatura estudos que associam a administração de etanol e o aumento de espécies reativas de oxigênio como íons superóxido e radicais hidroxila (REPETTO & LLESUY, 2002).

O modelo de lesão gastrointestinal induzido oralmente por etanol 70% em ratos tem sido utilizado como ferramenta para estudar efeitos gastroprotetores de diferentes compostos, bem como dos mecanismos envolvidos na patologia da úlcera gástrica aguda. Apesar deste modelo não representar integralmente a patologia humana, considerando que as lesões gástricas em roedores são superficiais, múltiplas e induzidas por diferentes mecanismos, este modelo continua sendo de grande relevância e amplamente utilizado em estudos experimentais.

No presente estudo foi observado que o tratamento oral tanto com o $(\text{PhSe})_2$ quanto com o ZnCl_2 foram capazes de proteger e reverter os danos na mucosa gástrica de ratos contra as lesões induzidas pelo etanol, sugerindo uma ação citoprotetora exercida por esses compostos. Entretanto, não obtivemos um efeito dose resposta para o $(\text{PhSe})_2$ na proteção da lesão uma vez que houve uma mudança abrupta na resposta com uma variação pequena na dose do composto. Esse organocalcogênio, ao ser administrado 1h antes à indução da lesão, apresentou uma resposta máxima na dose de 0,01 mg/kg, já quando administrado 1 h após o etanol, teve um efeito máximo na dose de 1,0 mg/kg (Tabela 1 do Artigo). O mecanismo envolvido no efeito protetor do zinco em lesões gástricas não está totalmente elucidado; entretanto, quando o ZnCl_2 foi administrado por via oral, observamos proteção e reversão das lesões gastrointestinais causadas pelo etanol (Tabela 1 do Manuscrito). Esses resultados estão de acordo com Tran et al (2005) que demonstraram que a suplementação com zinco por um curto período de tempo atenua gastrites induzidas por *Helicobacter felis* em camundongos.

A cicatrização da úlcera é um processo complexo que envolve migração e proliferação celular, re-epitelização, angiogênese e deposição da matriz celular, sendo controlados por fatores de crescimento, fatores de transcrição e citocinas (WALLACE, 2001; TARNAWSKI, 2005). Os maiores fatores que estimulam a proliferação, divisão e migração celular, bem como a re-epitelização são os fatores de crescimento. Inicialmente esses fatores são produzidos localmente devido à própria ulceração, ou seja, linhagens de células da mucosa começam a expressar

genes que produzem fatores de crescimento endotelial, de fibroblastos básicos e endotelial vascular, entre outros. Tais fatores, uma vez produzidos no local, ativarão a migração e proliferação de células epiteliais através de ações autócrinas e/ou parácrinas (TARNAWSKI, 2005). No presente trabalho, em um primeiro momento, observamos que tanto o $(\text{PhSe})_2$ quanto o ZnCl_2 apresentaram, na análise macroscópica, proteção e reversão ou re-epitelização da mucosa gástrica (Figura 1 do Artigo e do Manuscrito). Em ambos os casos observamos que o pré-tratamento foi mais eficiente do que o tratamento após 1 h da indução. Já em uma análise mais detalhada mediante análise microscópica, o etanol agrediu fortemente a mucosa gástrica levando a formação de edemas e sangramentos na região intraluminal com perdas estruturais. Mais uma vez o $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de prevenir e reverter ou re-epitalizar a mucosa agredida por etanol (Figura 2 do Artigo). Acreditamos que esses efeitos benéficos ocorreram devido ao estímulo dos elementos no mecanismo de reparo tecidual mediante fatores de crescimento celular.

Dentre vários fatores, o estresse oxidativo está associado à indução e a patogênese de danos gastrointestinais causados pelo etanol. Alguns trabalhos demonstram que antioxidantes não só protegem contra danos na mucosa gástrica, mas também são capazes de inibir a progressão de ulcerações (ROBERT, 1979). No presente estudo, a exposição ao etanol causou um significativo aumento na produção de TBARS e RS da mucosa gástrica levando a uma peroxidação lipídica e iniciando um estado de estresse oxidativo celular. Savegnago et al (2006) demonstraram que o $(\text{PhSe})_2$ não apresentou efeito antioxidante contra a peroxidação lipídica gástrica quando administrado pela via intraperitoneal 1 h após a indução da lesão por etanol. Entretanto, no presente trabalho, observamos uma diminuição significativa da peroxidação lipídica gástrica pelo $(\text{PhSe})_2$, quando administrado por via oral, enfatizando a importância da via de administração do fármaco (Figura 3 do Artigo). De mesma maneira, nossos resultados mostram que tanto o pré- quanto o pós-tratamento com ZnCl_2 foram capazes de diminuir significativamente os níveis de TBARS e RS em estômago e intestino de ratos que receberam etanol (Figuras 2 e 3 do Manuscrito).

A fim de averiguar o mecanismo pelo qual os elementos selênio e zinco agem na proteção e reversão do dano na mucosa gastrointestinal, investigamos os efeitos nas alterações do estado oxidativo no estômago e/ou intestino de ratos tratados com

selênio ou zinco e submetidos a lesões gastrointestinais induzidas por etanol. Como um dos parâmetros de oxidação lipídica, dosamos os níveis de ácido ascórbico o qual estando em quantidades diminuídas favorece o estado de estresse oxidativo (DE BEM et al., 2006). No presente trabalho, verificamos que o etanol causa uma redução significativa nos níveis de ácido ascórbico gastrointestinais e que tanto a pré- quanto a pós-administração de $(\text{PhSe})_2$ normalizaram aos níveis basais (Figura 4 do Artigo). Esses resultados estão de acordo com estudos prévios de Barbosa et al (2006) que demonstraram os efeitos antioxidantes do $(\text{PhSe})_2$. Entretanto, somente o pré-tratamento com ZnCl_2 , e não o pós-tratamento, manteve os níveis de ácido ascórbico iguais aos do controle (Figura 4 do Manuscrito).

Estudos recentes têm investigado o papel de EROs e de enzimas antioxidantes em distúrbios microvasculares relacionados à lesão da mucosa gástrica em diferentes modelos experimentais, incluindo lesão gástrica induzida por AINEs, ácido acético e pela ingestão de álcool (ODABASOGLU et al., 2006; DEVI et al., 2007; FERREIRA et al., 2008; MOTAWI et al., 2008). A fim de confirmar o papel dos radicais livres no processo de ulceração, alguns experimentos têm sido conduzidos utilizando enzimas antioxidantes dentre elas a SOD e a CAT. Confirmando os dados já demonstrados na literatura, nessa tese observamos diminuição da atividade das enzimas SOD e CAT em estômagos submetidos à lesão gástrica induzida por etanol, bem como uma diminuição nos níveis de grupos SH. Entretanto, no presente estudo (artigo) verificamos que a administração de $(\text{PhSe})_2$ aumentou a atividade da SOD frente a indução, reforçando mais uma vez o efeito antioxidante do composto (Figura 5 do Artigo).

A SOD é uma metaloproteína que dismuta o $\text{O}_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2) (FRIDOVICH, 1986; MCCORD & FRIDOVICH, 1988). O H_2O_2 não é um radical livre, porém participa do processo de formação da $\bullet\text{OH}$, que é extremamente reativo e responsável por gerar lesão em alguns sistemas orgânicos (NORDBERG & ARNER, 2001). O H_2O_2 formado é convertido em água e O_2 pela atividade da CAT e também pela atividade de outra enzima antioxidante, a glutathione peroxidase (GPx), cujo substrato é a GSH (KIRKMAN et al., 1999). Interessantemente, nossos resultados demonstram que o etanol reduz a atividade da SOD e da CAT. Entretanto, o $(\text{PhSe})_2$ não foi eficiente em prevenir ou reverter a diminuição na atividade da CAT em estômago de ratos expostos ao etanol (Artigo).

Por esse resultado implica que o $(\text{PhSe})_2$ não apresenta um efeito antioxidante através da atividade dessa enzima. Já para o tratamento com zinco houve um aumento na atividade da CAT de estômago e de intestino de animais expostos ao etanol (Figura 5 do Manuscrito), demonstrando a participação desse elemento na atividade da enzima.

Os grupos sulfidrílicos auxiliam na recuperação de vitaminas antioxidantes endógenas prevenindo com isso a peroxidação lipídica. Eles também evitam a ruptura das pontes dissulfeto que unem as subunidades no muco, mantendo a integridade estrutural. A indução da peroxidação lipídica causa um aumento do consumo de glutathione e sob condições de estresse oxidativo, como no modelo de úlcera induzida por etanol, as EROs são reduzidas pelo GSH com a concomitante formação de glutathione oxidada (GSSG). Além da sua ação como um antioxidante químico, o GSH também atua na primeira linha de defesa antioxidante como um cofator da GPx na redução de peróxidos, que também resulta na formação de GSSG (CNUBBEN et al., 2001). Meotti et al (2004) demonstraram que o $(\text{PhSe})_2$ em altas concentrações pode oxidar grupos sulfidrílicos. Entretanto, no presente estudo, o $(\text{PhSe})_2$ não alterou os SH disponíveis, indicando esse não ser um caminho de detoxificação desse composto por essa via de administração e nas doses testadas. Nos animais tratados com o etanol verificamos uma diminuição nos níveis de tióis totais protéicos de estômago e intestino, mas tanto a pré quanto a pós-exposição ao zinco aumentaram esses parâmetros (Figura 6 do Manuscrito).

Baseado nos resultados apresentados nesse trabalho podemos afirmar que o $(\text{PhSe})_2$, administrado por via oral, pode prevenir e reverter as lesões gástricas induzidas pelo etanol através da diminuição da peroxidação lipídica (TBARS) mediante o aumento do conteúdo de ácido ascórbico e da atividade da SOD em estômago de ratos. Adicionamos a isso os efeitos benéficos do ZnCl_2 frente aos danos gastrointestinais causados pela exposição ao etanol, uma vez que esse composto preveniu e reverteu, através de sua ação antioxidante, os danos gastrointestinais causados pelo etanol. Porém, mais estudos com elementos selênio e zinco bem como outros modelos de indução de lesões gastrointestinais devem ser feitos para melhor elucidar o mecanismo envolvido nos processos de proteção e reversão dos danos gastrointestinais.

5 CONCLUSÃO

O etanol quando administrado por via oral na concentração de 70% induziu danos na mucosa gastrointestinal de ratos previamente em jejum;

O $(\text{PhSe})_2$ e o ZnCl_2 apresentaram atividade gastroprotetora nesse modelo de lesão gástrica aguda induzida por etanol;

O $(\text{PhSe})_2$ promoveu significativa regeneração e recuperação histopatológica do epitélio da mucosa gástrica;

O ZnCl_2 apresentou efeitos preventivos e curativos frente às alterações macroscópicas gastrointestinais;

Tanto o $(\text{PhSe})_2$ quanto o ZnCl_2 apresentaram capacidade em sequestrar radicais livres, demonstrando potencial efeito antioxidante;

Tanto o $(\text{PhSe})_2$ quanto o ZnCl_2 promoveram o restabelecimento de sistemas enzimáticos antioxidantes (SOD, CAT) que se apresentavam alterados após a indução das lesões;

Por fim concluímos que o selênio e o zinco, representados pelos compostos $(\text{PhSe})_2$ e ZnCl_2 , apresentam uma grande capacidade de prevenir e reverter lesões gastrointestinais através de potentes efeitos antioxidantes apresentados pelos mesmos.

6 PERSPECTIVAS

Baseado nos resultados apresentados nessa tese acreditamos que há um grande campo a ser pesquisado em relação a busca por mecanismos de proteção contra lesões gastrointestinais. Após o término desse longo período de estudo, pretendo me estabilizar em uma instituição de ensino e dar continuidade a essa linha de pesquisa formando recursos humanos capacitados a desenvolverem mais pesquisas nessa área. Alguns itens a serem pesquisados:

- Avaliar a atividade das diferentes isoformas de enzima SOD no tecido gastrointestinal;
- Medir a ação das metalotioneínas no tecido gastrointestinal de ratos submetido ao modelo de indução de lesão por etanol e tratados com compostos de selênio e zinco;
- Verificar um possível efeito de outros compostos derivados e substituídos de selênio e zinco frente a esse modelo utilizado;
- Realizar medidas de expressão gênica de proteínas envolvidas na proteção das lesões gastrointestinais e correlacioná-las com as proteínas de animais tratados com selênio e zinco.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCÓN, M. N.; MARTÍNEZ, M. C. L. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **The Sci Total Environm**, v. 249, p. 347-371, 2000.

ALY, A.; SHULKES, A.; BALDWIN, G. S. Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1704, p. 1-10, 2004.

AOI, M. et al. Participation of prostaglandin E receptor EP4 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 287, p. G96-103, 2004.

ARTEEL, G. E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 10, p. 153-158, 2001.

BANHEGYI, G. et al. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. **Free Radic Biol Med**, v. 23, p. 793-803, 1997.

BARBOSA, N. B. et al. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 149, p. 243-253, 1998.

BEALES, I. L. Gastrin and interleukin-1beta stimulate growth factor secretion from cultured rabbit gastric parietal cells. **Life Sci**, v. 75, p. 2983-2995, 2004.

BEIL, W.; STAAR, U.; SEWING, K. F. Interaction of the anti-inflammatory seleno-organic compound ebselen with acid secretion in isolated parietal cells and gastric H⁺/K⁺-ATPase. **Biochem Pharmacol**, v. 40, p. 1997-2003, 1990.

BIANCHI, G. P. et al. Nutritional effects of oral zinc supplementation in cirrhosis. **Nutrition Research**, v. 20, p. 1079-1089, 2000.

BORGES, L. P. et al. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology**, v. 210, p. 1-8, 2005.

BORGES, V. C. et al. Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets. **Neurochemical Research**, v. 29, p. 1505-1509, 2004.

BRACKEN, W. M.; KLAASSEN, C. D. Induction of metallothionein in rat primary hepatocyte cultures: evidence for direct and indirect induction. **J Toxicol Environ Health**, v. 22, p. 163-174, 1987.

BRAGA, A. L. et al. Synthesis of selenocetals from enol ethers. **J Chem Res**, v. p. 206-207, 1996.

BREWER, G. J. et al. Treatment of Wilson's disease with zinc: XV long-term follow-up studies. **J Lab Clin Med**, v. 132, p. 264-278, 1998.

BRZOSKA, M. M.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J. Interactions between cadmium and zinc in the organism. **Food Chem Toxicol**, v. 39, p. 967-980, 2001.

BURK, R. F. Selenium and cancer: meaning of serum selenium levels. **J Nutr**, v. 116, p. 1584-1586, 1986.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. **Lipids**, v. 36, p. 1007-1024, 2001.

CALVERT, C. C.; NESHEIM, M. C.; SCOTT, M. L. Effectiveness of selenium in the prevention of nutritional muscular dystrophy in the chick. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 109, p. 16-18, 1962.

CANTOR, A. H.; MOORHEAD, P. D.; MUSSER, M. A. Biological availability of selenium in selenium compounds and feed ingredients. **Selenium in biology and medicine**. Westport.: AVI Publishing, 1982. p. 192-202.

CARVALHO, A. S. T. Úlcera péptica. **Jornal de Pediatria**, v. 76, p. 127, 2000.

CHAKRABORTY, D. et al. Studies on L-ascorbic acid metabolism in rats under chronic toxicity due to organophosphorus insecticides: effects of supplementation of L-ascorbic acid in high doses. **J Nutr**, v. 108, p. 973-980, 1978.

CHAN, H. M. et al. Impacts of mercury on freshwater fish-eating wildlife and humans. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 9, p. 867-883, 2003.

CHANDRASEKHARAN, N. V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CNUBBEN, N. H. et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 10, p. 141-152, 2001.

COMASSETO, J. V. Vinylic selenides. **J Organomet Chem**, v. 253, p. 131-181, 1983.

COMBS, G. F., JR.; GRAY, W. P. Chemopreventive agents: selenium. **Pharmacol Ther**, v. 79, p. 179-192, 1998.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. São Paulo: Editora Atheneu; 2007, p.

DAVIES, G. R. et al. Helicobacter pylori stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo. **Gut**, v. 35, p. 179-185, 1994.

DE BEM, A. F. et al. Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods. **Chem Biol Interact**, v. 162, p. 1-10, 2006.

DEVI, R. S. et al. Gastroprotective effect of Terminalia arjuna bark on diclofenac sodium induced gastric ulcer. **Chem Biol Interact**, v. 167, p. 71-83, 2007.

DIAZ, A. J. P. et al. Determination of selenium in fresh fish from southeastern Spain for calculation of daily dietary intake. **J Agric Food Chem**, v. 42, p. 334-337, 1994.

EGGERT, R. G. et al. The role of vitamin E and selenium in the nutrition of the pig. **Journal of Animal Science**, v. 16, p. 1037, 1957.

EKHOLM, P. et al. Transport of feed selenium to different tissues of bulls. **Br J Nutr**, v. 66, p. 49-55, 1991.

EVANS, P. J. et al. Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine: a proposed addition to organ storage fluids. **Free Radic Biol Med**, v. 23, p. 1002-1008, 1997.

FAA, G. et al. Zinc in gastrointestinal and liver disease. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, p. 1257-1269, 2008.

FACHINETTO, R. et al. Effects of ethanol and diphenyl diselenide exposure on the activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase from mouse liver and brain. **Food Chem Toxicol**, v. 44, p. 588-594, 2006.

FAVERO, A. M. et al. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. **Reprod Toxicol**, v. 20, p. 561-568, 2005.

FERREIRA, M. P. et al. Gastroprotective effect of Cissus sicyoides (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology, Ethnopharmacological Communication**, v. p. 2008.

FLOHE, L.; GUNZLER, W. A.; SCHOCK, H. H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. **FEBS Lett**, v. 32, p. 132-134, 1973.

FOSTER, L. H.; SUMAR, S. Selenium in health and disease: a review. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 37, p. 211-228, 1997.

FOX, M. R. Protective effects of ascorbic acid against toxicity of heavy metals. **Ann N Y Acad Sci**, v. 258, p. 144-150, 1975.

FRANCISCATO, C. et al. ZnCl₂ exposure protects against behavioral and acetylcholinesterase changes induced by HgCl₂. **Int J Dev Neurosci**, v. 27, p. 459-468, 2009.

FRANCISCATO, C. et al. Delayed biochemical changes induced by mercury intoxication are prevented by zinc pre-exposure. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 74, p. 480-486, 2011.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Arch Biochem Biophys**, v. 247, p. 1-11, 1986.

GALUNSKA, B. et al. Effects of paracetamol and propacetamol on gastric mucosal damage and gastric lipid peroxidation caused by acetylsalicylic acid (ASA) in rats. **Pharmacological Research**, v. 46, p. 141-147, 2002.

GERSHON, M. D.; KIRCHGESSNER, A. L.; WADE, P. R. Functional anatomy of the enteric nervous system. In: JOHNSON L. R. **Physiology of the gastrointestinal tract**. New York 1994. p. 381.

GLAVIN, G. B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB J**, v. 6, p. 825-831, 1992.

GOEL, A.; DANI, V.; DHAWAN, D. K. Chlorpyrifos-induced alterations in the activities of carbohydrate metabolizing enzymes in rat liver: the role of zinc. **Toxicology Letters**, v. 163, p. 235-241, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997, 715 p.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Biochem Pharmacol**, v. 49, p. 1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? **Trends Biochem Sci**, v. 24, p. 255-259, 1999.

HARTLEY, W. J.; GRANT, A. B. A review of selenium responsive diseases of New Zealand livestock. **Fed Proc**, v. 20, p. 679-688, 1961.

HASSAN, S. et al. Utilization of dietary sodium selenite, barley, oats and meat meal selenium by the chick. **Zentralbl Veterinarmed A**, v. 37, p. 270-277, 1990.

HOLZER, P. Neural emergency system in the stomach. **Gastroenterology**, v. 114, p. 823-839, 1998.

INEU, R. P. et al. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3023-3029, 2008.

ISZARD, M. B.; LIU, J.; KLAASSEN, C. D. Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats. **Toxicology**, v. 104, p. 25-33, 1995.

JACQUES-SILVA, M. C. et al. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacol Toxicol**, v. 88, p. 119-125, 2001.

JAHOVIC, N. et al. Gastric protection by alpha-melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: involvement of somatostatin. **Life Sci**, v. 80, p. 1040-1045, 2007.

JAIN, K. S. et al. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorg Med Chem**, v. 15, p. 1181-1205, 2007.

JANSSEN, A. M. et al. Superoxide dismutases in relation to the overall survival of colorectal cancer patients. **Br J Cancer**, v. 78, p. 1051-1057, 1998.

JOURD'HEUIL, D. et al. Effect of nitric oxide on hemoprotein-catalyzed oxidative reactions. **Nitric Oxide**, v. 2, p. 37-44, 1998.

KAGAWA, S. et al. Stimulation by capsaicin of duodenal HCO₃⁽⁻⁾ secretion via afferent neurons and vanilloid receptors in rats: comparison with acid-induced HCO₃⁽⁻⁾ response. **Dig Dis Sci**, v. 48, p. 1850-1856, 2003.

KANDA, T. et al. Novel Water-Soluble Diorganyl Tellurides with Thiol Peroxidase and Antioxidant Activity. **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, p. 8161-8169, 1999.

KIRKMAN, H. N. et al. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. **J Biol Chem**, v. 274, p. 13908-13914, 1999.

KLAYMAN, D. L.; GÜNTHER, W. H. **Organic selenium compounds: their chemistry and biology**. New York: John Wiley and sons; 1973, p.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; OCHMANSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H⁺ and duodenal HCO₃⁻ secretion: the role of brain-gut axis. **Eur J Pharmacol**, v. 499, p. 15-27, 2004.

KRISHNA, M. C. et al. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O₂⁻. or as SOD mimics? **J Biol Chem**, v. 271, p. 26026-26031, 1996.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, p. 41-60, 2008.

LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10 Suppl 2, p. S4, 2008.

LANE, H. W. et al. Effect of chemical form of selenium on tissue glutathione peroxidase activity in developing rats. **J Nutr**, v. 121, p. 80-86, 1991.

LEVANDER, O. A. Considerations in the design of selenium bioavailability studies. **Fed Proc**, v. 42, p. 1721-1725, 1983.

LEVANDER, O. A.; BURK, R. F. Selenium. **Modern nutrition in health and disease**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1994. p. 242-252.

LEYCK, S.; PARNHAM, M. J. Acute antiinflammatory and gastric effects of the seleno-organic compound ebselen. **Agents Actions**, v. 30, p. 426-431, 1990.

LLEDIAS, F.; RANGEL, P.; HANSBERG, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. **J Biol Chem**, v. 273, p. 10630-10637, 1998.

MACIEL, E. N. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 14, p. 310-319, 2000.

MACIEL, E. N. et al. Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 70, p. 470-476, 2003.

MARET, W. Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions. **J Trace Elem Med Biol**, v. 19, p. 7-12, 2005.

MARET, W.; SANDSTEAD, H. H. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. **J Trace Elem Med Biol**, v. 20, p. 3-18, 2006.

MARET, W.; VALLEE, B. L. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, p. 3478-3482, 1998.

MATES, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.

MATHIE, A. et al. Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. **Pharmacol Ther**, v. 111, p. 567-583, 2006.

MATSUHASHI, T. et al. Protective effect of a novel rice extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. **Dig Dis Sci**, v. 52, p. 434-441, 2007.

MAY, J. M. et al. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. **J Biol Chem**, v. 273, p. 23039-23045, 1998.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). **Free Radic Biol Med**, v. 5, p. 363-369, 1988.

MCKENZIE, R. C.; RAFFERTY, T. S.; BECKETT, G. J. Selenium: an essential element for immune function. **Immunol Today**, v. 19, p. 342-345, 1998.

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

MEOTTI, F. C. et al. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 9-16, 2003.

MEOTTI, F. C. et al. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environmental Research**, v. 94, p. 276-282, 2004.

MERCHANT, J. L. Tales from the crypts: regulatory peptides and cytokines in gastrointestinal homeostasis and disease. **J Clin Invest**, v. 117, p. 6-12, 2007.

MIZUI, T. et al. Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. **Life Sci**, v. 41, p. 755-763, 1987.

MOTAWI, T. K.; ABD ELGAWAD, H. M.; SHAHIN, N. N. Gastroprotective effect of leptin in indomethacin-induced gastric injury. **J Biomed Sci**, v. 15, p. 405-412, 2008.

MUTH, O. H. et al. Effects of selenium and vitamin E on white muscle disease. **Science**, v. 128, p. 1090, 1958.

NAITO, Y. et al. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. **Dig Dis Sci**, v. 43, p. 30S-34S, 1998.

NAKASHIMA, M. et al. No role for prostacyclin IP receptors in duodenal HCO₃-secretion induced by mucosal acidification in mice--comparison with capsaicin-induced response. **Digestion**, v. 70, p. 16-25, 2004.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 29, p. 273-300, 1990.

NARUMIYA, S. Prostanoid receptors. Structure, function, and distribution. **Ann N Y Acad Sci**, v. 744, p. 126-138, 1994.

NAVARRO-ALARCON, M.; LOPEZ-MARTINEZ, M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Sci Total Environ**, v. 249, p. 347-371, 2000.

NEVE, J. Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. **J Cardiovasc Risk**, v. 3, p. 42-47, 1996.

NOGUEIRA, C. W. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflamm Res**, v. 52, p. 56-63, 2003.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Arch Toxicol**, v. 85, p. 1313-1359, 2011.

NOGUEIRA, C. W. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. **Brain Research**, v. 906, p. 157-163, 2001.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 6255-6285, 2004.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

ODABASOGLU, F. et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 103, p. 59-65, 2006.

ODASHIMA, M. et al. Zinc L-carnosine protects colonic mucosal injury through induction of heat shock protein 72 and suppression of NF-kappa B activation. **Life Sciences**, v. 79, p. 2245-2250, 2006.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal-Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

ORTUÑO, J. et al. Selenium bioavailability and methods of evaluation. **Food Sci Technol Intern**, v. 2, p. 135-150, 1996.

PAINTER, E. P. The chemistry and toxicity of selenium compounds which special reference to the selenium problem. **Chemical Reviews**, v. 2, p. 179-213, 1941.

PAN, J. S. et al. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World J Gastroenterol**, v. 14, p. 5857-5867, 2008.

PARNHAM, M. J.; GRAF, E. Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. **Biochem Pharmacol**, v. 36, p. 3095-3102, 1987.

PASRICHA, J. P. Procinéticos, antieméticos e agentes usados na síndrome do intestino irritável. In: HARDMAN J. G.; LIMBIRD L. E.; GILMAN A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Mac Graw Hill, 2006.

PAULMIER, C. Selenium reagents and intermediates. **Organic Synthesis**. Oxford: Pergamon, 1986.

PEDERSEN, S. N. et al. Induction and identification of cadmium-, zinc- and copper-metallothioneins in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 120, p. 251-259, 1998.

PEIXOTO, N. C.; PEREIRA, M. E. Effectiveness of ZnCl₂ in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl₂ in newborn rats. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 66, p. 441-446, 2007.

PEIXOTO, N. C. et al. Effects of zinc and cadmium on HgCl₂-delta-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. **Toxicology Letters**, v. 146, p. 17-25, 2003.

PEROTTONI, J. et al. Ebselen and diphenyl diselenide do not change the inhibitory effect of lead acetate on delta-aminolevulinatase. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 19, p. 239-248, 2005.

PIHAN, G.; REGILLO, C.; SZABO, S. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol- or aspirin-induced gastric mucosal injury. **Dig Dis Sci**, v. 32, p. 1395-1401, 1987.

PRUIJN, F. B.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Interplay between vitamin E, glutathione and dihidrolipoic acid in protection against lipid peroxidation. **Fat Sci Technol**, v. 93, p. 216-219, 1991.

QURAIISHI, I. et al. Role of zinc and zinc transporters in the molecular pathogenesis of diabetes mellitus. **Med Hypotheses**, v. 65, p. 887-892, 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004, p.

RAO, C. V.; SAIRAM, K.; GOEL, R. K. Experimental evaluation of *Bocopa monniera* on rat gastric ulceration and secretion. **Indian J Physiol Pharmacol**, v. 44, p. 435-441, 2000.

REN, M. et al. Zinc supplementation decreases the development of atherosclerosis in rabbits. **Free Radic Biol Med**, v. 41, p. 222-225, 2006.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 523-534, 2002.

ROBERT, A. Cytoprotection by Prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 77, p. 761-767, 1979.

ROFE, A. M.; PHILCOX, J. C.; COYLE, P. Activation of glycolysis by zinc is diminished in hepatocytes from metallothionein-null mice. **Biol Trace Elem Res**, v. 75, p. 87-97, 2000.

ROTRUCK, J. T. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v. 179, p. 588-590, 1973.

ROULEAU, A. et al. Cloning and expression of the mouse histamine H3 receptor: evidence for multiple isoforms. **J Neurochem**, v. 90, p. 1331-1338, 2004.

SANTOS, F. W. et al. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. **Chem Biol Interact**, v. 151, p. 159-165, 2005.

SAVEGNAGO, L. et al. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 21, p. 86-92, 2006.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 21, p. 643, 2005.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842-1860, 2008.

SCHWARZ, K. A possible site of action for vitamin E in intermediary metabolism. **Am J Clin Nutr**, v. 9(4)Pt 2, p. 71-75, 1961.

SEKO, Y. et al. Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro. In: Wendel. **Selenium in Biology and Medicine**. New York: Springer, Berlin Heidelberg, 1989.

SHARMA, J.; SINGLA, A. K.; DHAWAN, S. Zinc-naproxen complex: synthesis, physicochemical and biological evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, p. 217-227, 2003.

SHI, B.; SPALLHOLZ, J. E. Bioavailability of selenium from raw and cooked ground beef assessed in selenium-deficient Fischer rats. **J Am Coll Nutr**, v. 13, p. 95-101, 1994.

SIES, H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. **Free Radic Biol Med**, v. 14, p. 313-323, 1993.

SIES, H. et al. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. **J Biol Chem**, v. 272, p. 27812-27817, 1997.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. **Adv Immunol**, v. 62, p. 167-215, 1996.

SPALLHOLZ, J. E. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. **Free Radic Biol Med**, v. 17, p. 45-64, 1994.

STADTMAN, T. C. Selenium-dependent enzymes. **Annu Rev Biochem**, v. 49, p. 93-110, 1980.

SUGAMOTO, S. et al. Role of endogenous nitric oxide and prostaglandin in duodenal bicarbonate response induced by mucosal acidification in rats. **Dig Dis Sci**, v. 46, p. 1208-1216, 2001.

SZABO, S.; NAGY, L.; PLEBANI, M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. **Clin Chim Acta**, v. 206, p. 95-105, 1992.

TABUCHI, Y. et al. Ebselen, a seleno-organic compound, protects against ethanol-induced murine gastric mucosal injury in both in vivo and in vitro systems. **Eur J Pharmacol**, v. 272, p. 195-201, 1995.

TAKEDA, A. et al. Zinc homeostasis in the hippocampus of zinc-deficient young adult rats. **Neurochem Int**, v. 46, p. 221-225, 2005.

TAKEUCHI, K. et al. Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats. Relation to gastric hypermotility. **Digestion**, v. 49, p. 175-184, 1991.

TAKEUCHI, K. et al. Prostaglandin E receptor subtypes involved in stimulation of gastroduodenal bicarbonate secretion in rats and mice. **J Physiol Pharmacol**, v. 50, p. 155-167, 1999.

TANI, S. et al. Gastric mucin secretion from cultured rat epithelial cells. **Biol Pharm Bull**, v. 20, p. 482-485, 1997.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Dig Dis Sci**, v. 50 Suppl 1, p. S24-33, 2005.

TOH, M.; GUTH, H. Role of oxygen-derived free radicals in haemorrhagic shock-induced gastric lesion in rat. **Gastroenterology**, v. 88, p. 1162, 1985.

TRAN, C. D. et al. Short-term zinc supplementation attenuates *Helicobacter felis*-induced gastritis in the mouse. **J Infect**, v. 50, p. 417-424, 2005.

TSEN, C. C.; COLLIER, H. B. Selenite as a relatively weak inhibitor of some sulphhydryl enzymes. **Nature**, v. 183, p. 1327-1328, 1959.

UNLUCERCI, Y. M. et al. Ebselen as protection against ethanol-induced toxicity in rat stomach. **J Trace Elem Med Biol**, v. 13, p. 170-175, 1999.

URSINI, F. et al. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. **Biochim Biophys Acta**, v. 710, p. 197-211, 1982.

VAANANEN, P. M.; MEDDINGS, J. B.; WALLACE, J. L. Role of oxygen-derived free radicals in indomethacin-induced gastric injury. **Am J Physiol**, v. 261, p. G470-475, 1991.

VALLEE, B. L. The function of metallothionein. **Neurochem Int**, v. 27, p. 23-33, 1995.

VUYYURU, L. et al. Dual inhibitory pathways link antral somatostatin and histamine secretion in human, dog, and rat stomach. **Gastroenterology**, v. 109, p. 1566-1574, 1995.

WALLACE, J. L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **Am J Med**, v. 110, p. 19S-23S, 2001.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiol Rev**, v. 88, p. 1547-1565, 2008.

WALLACE, J. L.; GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB J**, v. 10, p. 731-740, 1996.

WHO. **Environmental Health Criteria 58: Selenium**. World Health Organization; 1987, p.

YAN, L.; SPALLHOLZ, J. E. Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with thiols and mammary tumor cells. **Biochem Pharmacol**, v. 45, p. 429-437, 1993.

YOSHIKAWA, T. et al. Role of lipid-peroxidation in gastric-mucosal lesions induced by burn shock in rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 2, p. 163-170, 1987.

YOUSEF, M. I. et al. Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. **Toxicology**, v. 175, p. 223-234, 2002.

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

ZALUPS, R. K.; CHERIAN, M. G. Renal metallothionein metabolism after a reduction of renal mass. II. Effect of zinc pretreatment on the renal toxicity and intrarenal accumulation of inorganic mercury. **Toxicology**, v. 71, p. 103-117, 1992.

ZATTA, P. et al. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. **Brain Res Bull**, v. 62, p. 15-28, 2003.

ZENI, G.; BRAGA, A. L.; STEFANI, H. A. Palladium-catalyzed coupling of sp²-hybridized tellurides. **Acc Chem Res**, v. 36, p. 731-738, 2003.

ZHOU, Z. et al. Zinc supplementation prevents alcoholic liver injury in mice through attenuation of oxidative stress. **Am J Pathol**, v. 166, p. 1681-1690, 2005.