

TRABAJOS ORIGINALES

El Trolox reduce el efecto del etanol sobre las contracciones inducidas a la acetilcolina y el estrés oxidativo en duodeno aislado de conejo

Diego S. Fagundes, Sergio Gonzalo, Laura Grasa, Marta Castro, M.^a Pilar Arruebo, Miguel Ángel Plaza y M.^a Divina Murillo

Departamento de Farmacología y Fisiología (Fisiología). Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Zaragoza

RESUMEN

El Trolox es un análogo hidrofílico de la vitamina E y un agente que secuestra radicales libres. El etanol disminuye la amplitud de las contracciones espontáneas y las contracciones inducidas a la acetilcolina en el duodeno de conejo. El objetivo de este trabajo era estudiar el efecto del Trolox en las alteraciones inducidas por el etanol sobre la contractilidad y la peroxidación lipídica en el duodeno. Los estudios de contractilidad duodenal *in vitro* se realizaron en un baño de órganos y los niveles de MDA+4-HDA se midieron por espectrofotometría. El Trolox aumentó la reducción inducida por el etanol sobre la amplitud de las contracciones espontáneas en el músculo longitudinal pero no en el músculo circular de duodeno. El Trolox 4 mM redujo los efectos del etanol sobre las contracciones inducidas a la acetilcolina y sobre las concentraciones de MDA+4-HDA. Se concluye que el Trolox podría prevenir el estrés oxidativo inducido por el etanol en el duodeno.

Palabras clave: Trolox. Etanol. Intestino. Motilidad.

ABSTRACT

Trolox is a hydrophilic analogue of vitamin E and a free radical scavenger. Ethanol diminishes the amplitude of spontaneous con-

tractions and acetylcholine (ACh)-induced contractions in rabbit duodenum. The aim of this work was to study the effect of trolox on the alterations induced by ethanol on contractility and lipid peroxidation in the duodenum. The duodenal contractility studies *in vitro* were carried out in an organ bath and the levels of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals (MDA+4-HAD) were measured by spectrophotometry. Trolox increased the reduction induced by ethanol on the amplitude of spontaneous contractions in longitudinal muscle but not in circular muscle. Trolox 4 mM decreased the effects of ethanol on ACh-induced contractions and on MDA+4-HDA concentrations. We conclude that trolox might prevent oxidative stress induced by ethanol in the duodenum.

Key words: Trolox. Ethanol. Contractility. Lipid peroxidation. Duodenum. Rabbit.

Fagundes DS, Gonzalo S, Grasa L, Castro M, Arruebo MA, Plaza MA, Murillo MD. El Trolox reduce el efecto del etanol sobre las contracciones inducidas a la acetilcolina y el estrés oxidativo en duodeno aislado de conejo. *Rev Esp Enferm Dig* 2011; 103: 396-401.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por un proyecto del Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (DGI, AGL2006-04317, y ERF) y el Gobierno de Aragón (B61/2009). Fagundes, D.S. recibió financiación del Grupo de Investigación Consolidado del Gobierno de Aragón (B61/2008), España.

Nota: Este trabajo fue presentado, en parte, al LXVII Congreso Anual de la Sociedad Española de Patología Digestiva (SEPD), Sitges (Barcelona, España), Junio 2008.

Recibido: 10-01-11.
Aceptado: 18-03-11.

Correspondencia: M.^a Divina Murillo. Departamento de Farmacología y Fisiología (Fisiología). Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza.
e-mail: dmurillo@unizar.es

INTRODUCCIÓN

El alcohol es un compuesto con un grupo hidrofílico que puede estar presente en la dieta. La cantidad, el tipo de alcohol consumido y la frecuencia del consumo pueden variar enormemente pudiendo tener efectos divergentes sobre el organismo (1,2). Los efectos nocivos del alcohol, al menos parcialmente, involucran un daño oxidativo producido por el alcohol, que ha sido documentado mediante la cuantificación de radicales oxidantes (3-5). El organismo ha desarrollado un complejo sistema de defensa que está compuesto por moléculas “secuestradoras” de radicales libres como las vitaminas y las enzimas antioxidantes.

El etanol induce inhibición de la contractilidad esofágica, gástrica e intestinal (6-9). La inhibición producida por el etanol es atribuida a una inhibición del influjo de Ca^{2+} en el músculo circular del yeyuno canino y humano, y en esófago de gato (7,8). El alcohol también inhibe la motilidad del esfínter de Oddi *in vitro* (10,11) y del colon (12). En un estudio previo hemos demostrado que los efectos inhibitorios del etanol en las contracciones espontáneas y las contracciones inducidas a la acetilcolina en el duodeno de conejo se reducen por antagonistas de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (13). También, el etanol provoca una inhibición del vaciamiento gástrico y del tránsito del intestino delgado que es mediado por receptores de la CCK tipo A o por vías neurales sensibles a la capsaicina (14-16). Sin embargo, el etanol produce acciones contráctiles en el músculo liso gástrico del cobaya, las cuales requieren calcio extracelular y son bloqueadas por inhibidores de la tirosina quinasa (17).

El Trolox, un antioxidante fenólico, diseñado para la conservación de alimentos, tiene un anillo cromano similar al α -tocoferol o vitamina E (18,19). El Trolox disminuye el daño hepatocelular durante la sepsis (20) y evita el estrés oxidativo que se produce durante el almacenaje en frío del intestino delgado (21).

Aunque los antioxidantes pueden atenuar el daño inducido por el alcohol, no hay un antioxidante solo que proteja a todos los órganos durante todos los modos de exposición (3). Existe muy poca documentación disponible del efecto del Trolox en la motilidad intestinal. Además, el alcohol induce estrés oxidativo y reduce los niveles de vitamina E (22). El objetivo de este trabajo era estudiar el efecto del Trolox sobre las alteraciones duodenales inducidas por el etanol en las contracciones inducidas a la acetilcolina y la peroxidación lipídica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Conejos machos de la raza neozelandesa, de un peso de 2-2,5 kg, eran alimentados con un pienso estándar de conejo y acceso libre al agua de bebida. Los conejos eran humanamente manejados y sacrificados de acuerdo con la Directiva del Consejo Europeo 86/609/EEC.

Productos químicos

La acetilcolina y el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox, un análogo de la vitamina E soluble en agua) fue obtenido de Sigma (Madrid, España). Los demás productos químicos eran de grado analítico. El Trolox era disuelto en solución Krebs. El resto de los productos químicos eran disueltos en agua destilada. Todas las soluciones madre eran almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se realizaban las soluciones necesarias diariamente.

Preparaciones de segmentos duodenales

Después de 24 h de ayuno, los conejos eran sacrificados y los segmentos de duodeno eran montados en el sentido de las fibras musculares lisas longitudinales y circulares (10 mm de longitud y 8 mm de anchura). Los segmentos duodenales completos eran suspendidos verticalmente en un baño de órganos controlado termostáticamente a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, conteniendo solución Krebs (con una concentración mM de NaCl 120, KCl 4,70, CaCl_2 2,40, MgSO_4 1,20, NaHCO_3 24,50, KH_2PO_4 1,00 y glucosa 5,60) a pH 7,4 y continuamente gaseados con 95% O_2 y 5% CO_2 .

Cada segmento se contactó a un transductor de fuerza isométrico (Pioden UF1, Graham Bell House, Canterbury, UK). Los segmentos se sometieron pasivamente a una tensión inicial de 20 mN. La señal de la actividad mecánica era amplificada con un rango de 2 mV (The MacLab Bridge Amp, AD Instruments Inc, Milford MA, EE. UU.) y registrada para su posterior análisis usando un programa de ordenador (MacLab Systems). Antes de comenzar los experimentos, los segmentos se equilibraron en solución Krebs durante 45 min.

Protocolos experimentales

Cada protocolo experimental se realizó en segmentos duodenales, 4 montados en el sentido del músculo liso longitudinal y 4 en el del músculo circular, tomados del mismo conejo y repetidos en 3-4 animales. Los segmentos que no mostraron actividad espontánea se descartaron; así cada preparación sirvió como su propio control. El protocolo de los experimentos fue el siguiente: después del periodo de adaptación de 45 min, se registraban las contracciones espontáneas del duodeno, y las contracciones a la acetilcolina (ACh, 0,1 mM) en solución Krebs y se consideraron como respuestas control. El etanol (a las dosis de 56,2, 114,5 o 170,4 mM que equivalían a 2,58, 5,27 ó 7,85 g/l respectivamente) se añadió al baño de órganos durante 90 min y luego se añadió una segunda dosis de la ACh (0,1 mM) fue evocada. Esta segunda respuesta se comparó con la respuesta control y se expresó como porcentaje.

Para estudiar el efecto del Trolox sobre las alteraciones producidas por el etanol, el Trolox (1,2 y 4 mM) se añadió al baño 15 min antes del etanol (a las dosis de 56,2, 114,5 ó 170,4 mM).

Cuantificación de malondialdehído y 4-hidroxi-alquenos

Las concentraciones de malondialdehído y 4-hidroxi-alquenos (MDA + 4-HDA) en el tejido duodenal se usaron como un índice de la peroxidación lipídica (23). Las muestras del tejido se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en las mismas condiciones de los estudios de baño de órganos y se dividieron en los siguientes grupos experimentales: control (solución Krebs), etanol, Trolox y Trolox más etanol. Después de la incubación, los tejidos

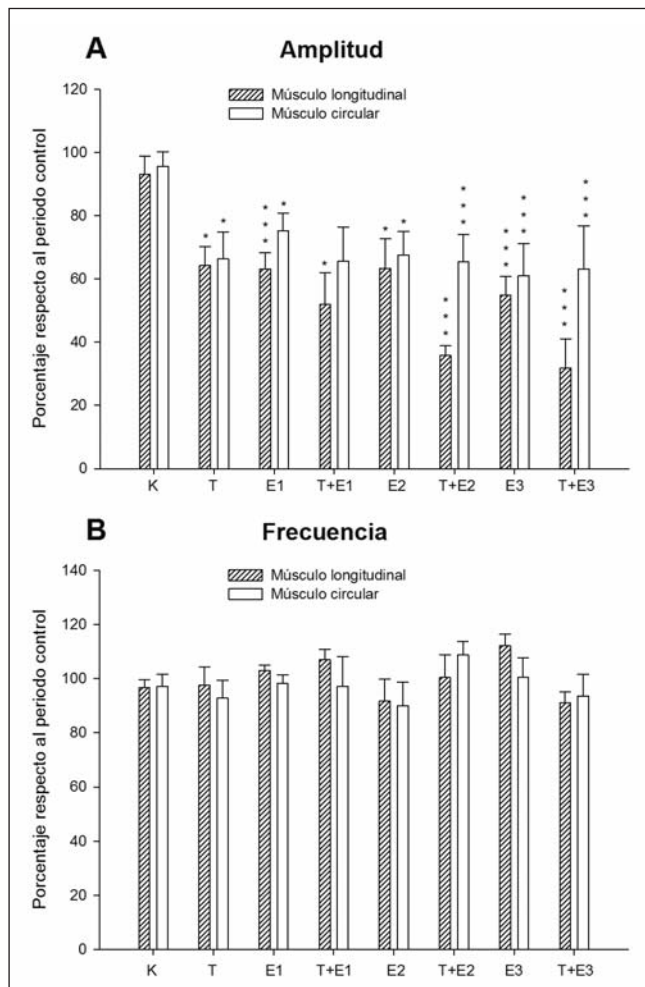


Fig. 1. La amplitud (A) y la frecuencia (B) de las contracciones espontáneas del músculo longitudinal y circular del duodeno de conejo en diferentes condiciones: control (K, Krebs), o etanol 56,2 mM (E1), 114,5 mM (E2) y 170,4 mM (E3) durante 90 min. El Trolox 4 mM se añadió 15 min antes del Krebs (T) o etanol 56,2 mM (T+E1), 114,5 mM (T+E2), y 170,4 mM (T+E3). Los valores son de la media \pm E.S.M de 8 segmentos (% del periodo control). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ con respecto al periodo control.

se congelaron en isopentano para la cuantificación de MDA + 4-HDA. Los tejidos se homogeneizaron en buffer Tris frío (a 50 mM, pH 7.4) y se centrifugaron a 3.000 g a 4 °C durante 10 min. En la técnica, el MDA+4-HDA reacciona con el N-metil-2-fenilindol produciendo un cromóforo estable con una absorbancia máxima a 586 nm; se utilizó 1,1,3,3-tetrametoxipropano como solución estándar. Los resultados se expresaron como nmol MDA+4-HDA mg^{-1} de proteína. La concentración de proteínas se determinó por la técnica de Bradford (24) usando la albúmina sérica bovina como estándar.

Análisis de los datos

La actividad mecánica integrada por segundo (miliNewtons por segundo, mN s^{-1}) se cuantificó como el área inte-

grada por segundo durante los 3 primeros minutos de la respuesta a la ACh, menos el área integrada por segundo de la motilidad espontánea, 3 min antes de la adición de la ACh al baño, y normalizada por milímetro cuadrado de superficie (CSA; mm^2) (13,25). Se analizó la amplitud y frecuencia de las contracciones espontáneas. La amplitud media de las contracciones se calculó como la media de las diferencias de pico a pico en 5 min. La frecuencia de las contracciones se expresó como las contracciones por minuto (cpm) en un periodo de 5 min. La amplitud y la frecuencia de las contracciones espontáneas en presencia de las sustancias se expresaron como un porcentaje de los valores en ausencia de las sustancias (periodo control). Los valores se expresaron como la media \pm E.S.M. Las medias se compararon mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y los valores de p se determinaron usando el test de Scheffé F para los estudios de baño de órganos y un test de Fisher para el MDA + 4-HDA. Las diferencias con valores de $p < 0,05$ eran consideradas estadísticamente significativas.

RESULTADOS

La motilidad espontánea del duodeno de conejo aislado era rítmica y cíclica. La amplitud de las contracciones espontáneas era de $19,3 \pm 2,3$ mN y $2,4 \pm 0,5$ mN ($n=12$) y la frecuencia de las contracciones era de $13,5 \pm 0,4$ cpm y $10,7 \pm 0,5$ cpm ($n = 12$) en el músculo liso longitudinal y circular de duodeno respectivamente, en condiciones control.

El etanol (56,2, 114,5 y 170,4 mM) disminuyó la amplitud de las contracciones espontáneas pero no modificó la frecuencia de las contracciones en el músculo longitudinal y circular de duodeno (Figs. 1A y 1B). Las contracciones inducidas a la ACh (0,1 mM) eran reducidas significativamente por el etanol a las tres concentraciones ensayadas en ambos tipos de músculo liso duodenal (Fig. 2A).

El Trolox, un análogo hidrosoluble de la vitamina E, disminuyó la amplitud de las contracciones espontáneas en el músculo longitudinal (a 4 mM, 36% *versus* control) y circular (a 4 mM, 34% *versus* control) de duodeno (Fig. 1A). En cambio, la frecuencia de las contracciones espontáneas (Fig. 1B) y las contracciones inducidas a la ACh (0,1 mM) no se alteraron (Fig. 2A). Cuando el Trolox se añadió al baño de órganos 15 min antes del etanol, se incrementó la reducción inducida por el etanol sobre la amplitud de las contracciones espontáneas en el músculo longitudinal pero no en el músculo circular (Fig. 1A).

El Trolox (1,2 mM), administrado antes del etanol, revertió el efecto del etanol a la concentración más baja sobre las contracciones inducidas a la ACh en el músculo longitudinal del duodeno ($107,8 \pm 12,5\%$ $n = 8$; $67,3 \pm 12,5\%$ $n = 8$; $75,7 \pm 7,2\%$ $n = 8$; *versus* control 100% a 56,2, 114,5 y 170,4 mM del etanol respectivamente). El Trolox (1,2 mM) no revertió el efecto del etanol en el músculo circular ($90,6 \pm 7,5\%$ $n = 8$; $77,1 \pm 8,2\%$ $n = 8$; $54,0 \pm 17,2\%$ $n =$

8; *versus* control 100% a 56,2, 114,5 y 170,4 mM de etanol respectivamente). Sin embargo, el Trolox (4 mM) antagonizó la inhibición inducida por el etanol sobre las contracciones inducidas a la ACh en el músculo longitudinal y circular del duodeno (Fig. 2A).

El etanol (56,2, 114,5 y 170,4 mM) incrementó, de manera concentración dependiente, los niveles de MDA+4-HDA respecto al Krebs en homogeneizados de duodeno. El Trolox (4 mM) disminuyó los niveles de MDA+4-HDA inducidos por el etanol a las concentraciones de 114,5 y 170,4 mM en el duodeno (Fig. 2B).

DISCUSIÓN

Existen evidencias de que el alcohol puede dañar o alterar la función de diferentes órganos. Los órganos con alto metabolismo, como el hígado, el páncreas o el estómago son más sensibles al daño del alcohol (6,9,26,27). El efecto del alcohol en el tracto digestivo depende de la especie animal utilizada en la investigación; en la misma región puede tener reacciones opuestas. En el músculo liso gástrico produce inhibición de las contracciones en perros y gatos (6,9), pero en el cobaya causa una contracción (17). Nuestros experimentos muestran que el etanol reduce la amplitud de las contracciones espontáneas en el músculo longitudinal y circular de duodeno, pero no modifica su frecuencia. Estos hallazgos concuerdan con observaciones previas *in vitro* en el músculo liso antral e intestinal canino (6,8), e *in vivo* en la actividad contráctil yeyunal humana (28). El Ca^{2+} dispara la contracción en el músculo liso y es un segundo mensajero, traduciendo señales de neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento (29). La amplitud y la frecuencia de las contracciones espontáneas en el duodeno de conejo disminuyen en medios sin Ca^{2+} (30) y resultados similares han sido descritos en el duodeno de oveja (31). En un estudio que utiliza registros intracelulares, el alcohol actúa a través de mecanismos que involucran hiperpolarización de la membrana y dichos autores sugieren que el alcohol ejerce directamente sus efectos en la contractilidad del músculo liso yeyunal (8). La inhibición inducida por el etanol sobre la amplitud de las contracciones espontáneas en el duodeno de conejo es atribuida a la apertura de canales de K^+ activados por Ca^{2+} de conductancia intermedia (13).

En el presente trabajo, el etanol redujo las contracciones inducidas a la ACh en el duodeno de conejo y esto está de acuerdo con otros estudios en los cuales se ha mostrado que el etanol reduce las contracciones inducidas a la ACh en el ileon aislado de rata (32), en músculo liso circular de yeyuno de perro (8) y en duodeno de conejo (13). Además, el etanol disminuye el espesor de la bicapa lipídica de la membrana plasmática de vesículas de sinaptosomas (33).

El Trolox es un análogo hidrofílico de la vitamina E, un antioxidante fenólico y tiene una estructura cromano similar al α -tocoferol pero sin la cola hidrofóbica de poliisoprenoide (18,19). Hay poca información acerca del efecto del Trolox o vitamina E en la contractilidad del músculo liso gastroin-

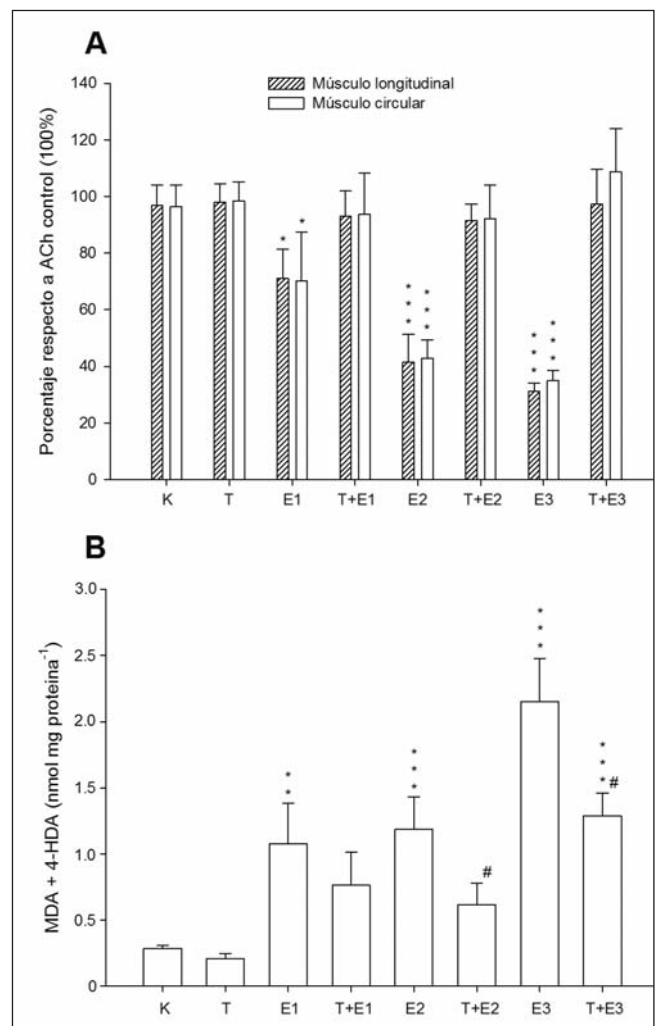


Fig. 2. El efecto del etanol sobre las contracciones inducidas a la ACh (0,1 mM) del músculo longitudinal y circular del duodeno de conejo (A) y sobre los niveles de MDA+4-HDA de homogeneizados de duodeno (B). Efecto del Krebs (K, control) o Trolox 4 mM (T) durante 90 min. El Trolox 4 mM añadido 15 min antes que el etanol 56,2 mM (T+E1), 114,5 mM (T+E2) y 170,4 mM (T+E3). Las columnas representan los valores medios y las barras verticales indican el E.S.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ con respecto al periodo control; # $p < 0,05$ con respecto al etanol (a la misma concentración).

testinal. Previamente, se ha descrito que el Trolox reduce la amplitud de las contracciones espontáneas duodenales pero no altera su frecuencia (34). Además, en normoxia, el α -tocoferol no produce efectos perceptibles sobre la frecuencia de las contracciones espontáneas en colon de cobaya (35). La vitamina E disminuye las contracciones inducidas por el etanol 400 mM en anillos de vasos cerebrales aislados caninos (36). Sin embargo, la vitamina E fracasó en mostrar una acción protectora frente a la isquemia intestinal en hámster (37). Nuestros resultados muestran que el Trolox incrementó la inhibición de la amplitud de las contracciones espontáneas inducidas por el etanol en el músculo longitudinal de duodeno; tiene un efecto aditivo sobre el

músculo longitudinal pero no afecta al músculo circular ni a la frecuencia de los movimientos espontáneos. Los mecanismos de acción de la vitamina E propuestos son la inhibición de la tropomiosina o la inhibición de la proteína cinsasa C o la inhibición de los receptores tipo A secuestrantes (38,39). Quizás el Trolox media las vías de excitación-contracción de las contracciones espontáneas e incrementa los efectos del etanol.

Nuestros hallazgos muestran que el Trolox no altera las respuestas a la ACh en el duodeno. Sin embargo antagonizó el efecto producido por el etanol sobre las contracciones a la ACh en nuestro modelo experimental. La vitamina E no inhibe las contracciones inducidas por el KCl o prostaglandina F_{2α} (36). Sin embargo, la vitamina E protege la vejiga de la orina de los efectos del peróxido de hidrógeno *in vitro* (40). También, la vitamina E atenúa las contracciones producidas por el alcohol en anillos de arteria cerebral canina (36). El Trolox incrementó la reducción inducida por el etanol sobre la amplitud de las contracciones espontáneas pero no revertió la inhibición de las contracciones inducidas a la ACh en el músculo longitudinal. Estos efectos opuestos del Trolox sobre las contracciones espontáneas y sobre las contracciones inducidas a la ACh podrían ser debidas a diferentes mecanismos de activación. Las contracciones espontáneas son producidas por la despolarización de las células intersticiales de Cajal y las contracciones a la ACh por la unión de la acetilcolina a receptores muscarínicos.

Cuando el alcohol es administrado de forma aguda o crónica produce estrés oxidativo en la mayoría de los tejidos (3). El alcohol se metaboliza en el hígado y las vías de metabolización producen radicales libres que afectan al sistema antioxidante (4). Los radicales libres alteran la peroxidación lipídica y los antioxidantes son esenciales en la prevención del daño celular producido (11,41,42). Los cambios bioquímicos provocados por el etanol son también acompañados por un incremento en la peroxidación lipídica, y el MDA es un indicador de la peroxidación lipídica (26). Otro estudio muestra que el etanol induce peroxidación lipídica y reduce los niveles de vitamina E en los cobayas (22). Además, se ha descrito que el estrés oxidativo altera la contractilidad de la vejiga de la orina en el cerdo, afectando a los receptores muscarínicos (43).

En este trabajo, la concentración de MDA+4-HDA se elevó tras la incubación del tejido duodenal con etanol. El Trolox redujo el incremento de los niveles de MDA+4-HDA y antagonizó el efecto del etanol sobre las contracciones inducidas a la ACh. Estos resultados indican que el alcohol indujo peroxidación lipídica, incrementando los niveles de MDA +4-HDA, que es un marcador del estrés oxidativo (23). Nuestros resultados coinciden con los estudios en los cuales el etanol disminuye los niveles de glutatión y decrece la actividad antioxidante así como eleva los niveles de malondialdehído (4). En hepatocitos, el incremento de la peroxidación lipídica inducida por el etanol se revierte por la vitamina E (26). El Trolox aumenta la recuperación cardiaca después de la isquemia/recuperación, tanto cuando se perfunde *in vitro* y tras su administración

oral. La vitamina E también afecta favorablemente a la recuperación cardiaca pero es menos efectiva que el Trolox. La producción de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) es significativamente inhibida por el Trolox, sugiriendo que sus efectos beneficiosos son debidos a sus actividades antioxidantes (44). La combinación de vitamina C, vitamina E y selenio tiene un efecto protector sobre el daño mucosal duodenal inducido por el etanol (45). Una dieta rica en vitamina E protege el músculo liso de la vejiga de la orina de la peroxidación lipídica producida por el peróxido de hidrógeno (40). Además, el Trolox reduce los niveles de MDA en el estrés oxidativo del daño mucosal durante el almacenaje en frío del intestino delgado (21) y en la incubación de los segmentos duodenales con el lipopolisacárido (34).

Se puede concluir que el Trolox reduce los efectos del etanol sobre las contracciones inducidas a la ACh y los niveles de MDA+4-HDA y por tanto el Trolox puede prevenir el estrés oxidativo inducido por el etanol en el duodeno.

BIBLIOGRAFÍA

- Solera Albero J, Tárraga López PJ, Carbayo Herencia JA, López Cara MA, Celada Rodríguez A, Cerdán Oliver M, et al. Influence of diet and lifestyle in colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig* 2007;99(4):190-200.
- Franco A, Sikalidis AK, Solís Herruzo JA. Colorectal cancer: influence of diet and lifestyle factors. *Rev Esp Enferm Dig* 2005;97(6):432-48.
- McDonough KH. Antioxidant nutrients and alcohol. *Toxicology* 2003;189(1-2):89-97.
- Das SK, Vasudevan DM. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci* 2007;81(3):177-87.
- Conde de la Rosa L, Moshage H, Nieto N. Hepatocyte oxidant stress and alcoholic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2008;100(3):156-63.
- Sanders KM, Bauer AJ. Ethyl alcohol interferes with excitation-contraction mechanisms of canine antral muscle. *Am J Physiol* 1982;242(3):G222-30.
- Keshavarzian A, Zorub O, Sayeed M, Urban G, Sweeney C, Winship D, et al. Acute ethanol inhibits calcium influxes into esophageal smooth but not striated muscle: a possible mechanism for ethanol-induced inhibition of esophageal contractility. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270(3):1057-62.
- Lu G, Sarr MG, Szurszewski JH. Effects of ethyl alcohol on canine jejunal circular smooth muscle. *Dig Dis Sci* 1997;42(12):2403-10.
- Sim SS, Choi JC, Min DS, Rhie DJ, Yoon SH, Hahn SJ, et al. Effect of ethanol on spontaneous phasic contractions of cat gastric smooth muscle. *Scand J Gastroenterol* 2002;37(1):23-7.
- Cullen JJ, Ledlow A, Murray JA, Conklin JL. The effect of ethanol on sphincter of Oddi motility in vitro. *J Surg Res* 1997;67(1):58-61.
- Sari R, Palvolgyi A, Rakonczay Z, Jr., Takacs T, Lonovics J, Czako L, et al. Ethanol inhibits the motility of rabbit sphincter of Oddi in vitro. *World J Gastroenterol* 2004;10(23):3470-4.
- Wang SL, Xie DP, Liu KJ, Qin JF, Feng M, Kunze W, et al. Nitric oxide mediates the inhibitory effect of ethanol on the motility of isolated longitudinal muscle of proximal colon in rats. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19(6):515-21.
- Fagundes DS, Grasa L, Arruebo MP, Plaza MA, Murillo MD. Ca²⁺-activated K⁺ channels involved in duodenal dysmotility induced by ethanol. *Alcohol Alcohol* 2007;42(4):291-5.
- Izbeki F, Wittmann T, Csati S, Lonovics J. The mechanisms of the inhibitory effect of ethanol on gastric emptying involve type A CCK receptors. *Regul Pept* 2004;117(2):101-5.
- Izbeki F, Wittmann T, Jancso G, Csati S, Lonovics J. Inhibition of gastric emptying and small intestinal transit by ethanol is mediated by capsaicin-sensitive afferent nerves. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2002; 365(1):17-21.

16. Franke A, Teyssen S, Harder H, Singer MV. Effect of ethanol and some alcoholic beverages on gastric emptying in humans. *Scand J Gastroenterol* 2004;39(7):638-44.
17. Zheng XL, Mokashi S, Hollenberg MD. Contractile action of ethanol in guinea pig gastric smooth muscle: inhibition by tyrosine kinase inhibitors and comparison with the contractile action of epidermal growth factor-urogastrone. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282(1):485-95.
18. Bjerneboe A, Bjerneboe GE, Drevon CA. Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J Nutr* 1990;120(3):233-42.
19. Tafazoli S, Wright JS, O'Brien PJ. Prooxidant and antioxidant activity of vitamin E analogues and troglitazone. *Chem Res Toxicol* 2005;18(10):1567-74.
20. Park SW, Lee SM. The beneficial effect of Trolox on sepsis-induced hepatic drug metabolizing dysfunction. *Arch Pharm Res* 2004;27(2):232-8.
21. Salehi P, Walker J, Madsen K, Churchill TA. Control of oxidative stress in small bowel: relevance to organ preservation. *Surgery* 2006;139(3):317-23.
22. Suresh MV, Sreeranjit Kumar CV, Lal JJ, Indira M. Impact of massive ascorbic acid supplementation on alcohol induced oxidative stress in guinea pigs. *Toxicol Lett* 1999;104(3):221-9.
23. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-21.
24. 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.
25. Rebollar E, Arruebo MP, Plaza MA, Murillo MD. Effect of lipopolysaccharide on rabbit small intestine muscle contractility in vitro: role of prostaglandins. *Neurogastroenterol Motil* 2002;14(6):633-42.
26. Gyamfi MA, Wan YJ. The effect of ethanol, ethanol metabolizing enzyme inhibitors, and Vitamin E on regulating glutathione, glutathione S-transferase, and S-adenosylmethionine in mouse primary hepatocyte. *Hepato Res* 2006;35(1):53-61.
27. Gonzalez A, Pariente JA, Salido GM. Ethanol impairs calcium homeostasis following CCK-8 stimulation in mouse pancreatic acinar cells. *Alcohol* 2008;42(7):565-73.
28. Robles EA, Mezey E, Halsted CH, Schuster MM. Effect of ethanol on motility of the small intestine. *Johns Hopkins Med J* 1974;135(1):17-24.
29. Farrugia G. Ionic conductances in gastrointestinal smooth muscles and interstitial cells of Cajal. *Annu Rev Physiol* 1999;61:45-84.
30. Grasa L, Rebollar E, Arruebo MP, Plaza MA, Murillo MD. The role of Ca²⁺ in the contractility of rabbit small intestine in vitro. *J Physiol Pharmacol* 2004;55(3):639-50.
31. Murillo MD, Plaza MA, de Pedro MJ, Arruebo MP. The effect of Ca²⁺ antagonists on spontaneous motility from sheep duodenum. *J Pharm Pharmacol* 1994;46(2):138-40.
32. Wali FA, Suer AH, Hayter A, Tugwell AC. The effect of ethanol on spontaneous contractions and on the contraction produced by periarterial nerve stimulation and by acetylcholine in the rat isolated ileum. *Gen Pharmacol* 1987;18(6):631-5.
33. Park JS, Choi EJ, Jeong DS, Yang HJ, Kim KP, Son KK, et al. Effects of dimyristoylphosphatidylethanol and ethanol on thickness of neuronal membrane lipid bilayers. *Arch Pharm Res* 2009;32(10):1469-73.
34. Fagundes DS, Gonzalo S, Arruebo MP, Plaza MA, Murillo MD. Melatonin and Trolox ameliorate duodenal LPS-induced disturbances and oxidative stress. *Dig Liver Dis* 2010;42(1):40-4.
35. Kelly MJ, Mathie AZ, Vallance C. A pharmacological action of vitamin E unrelated to its antioxidant capacity. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006;28(8):499-505.
36. Li W, Zheng T, Altura BT, Altura BM. Antioxidants prevent ethanol-induced contractions of canine cerebral vascular smooth muscle: relation to alcohol-induced brain injury. *Neurosci Lett* 2001;301(2):91-4.
37. Boyd AJ, Sherman IA, Saibil FG, Mamelak M. The protective effect of gamma-hydroxybutyrate in regional intestinal ischemia in the hamster. *Gastroenterology* 1990;99(3):860-2.
38. Aratri E, Spycher SE, Breyer I, Azzi A. Modulation of alpha-tropomyosin expression by alpha-tocopherol in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1999;447(1):91-4.
39. Ozer NK, Sirikci O, Taha S, San T, Moser U, Azzi A. Effect of vitamin E and probucol on dietary cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. *Free Radic Biol Med* 1998;24(2):226-33.
40. Matsumoto S, Leggett RE, Levin RM. The effect of vitamin E on the response of rabbit bladder smooth muscle to hydrogen peroxide. *Mol Cell Biochem* 2003;254(1-2):347-51.
41. Calvino Fernandez M, Parra Cid T. H. pylori and mitochondrial changes in epithelial cells. The role of oxidative stress. *Rev Esp Enferm Dig* 2010;102(1):41-50.
42. Solís Herruzo JA, Solís Muñoz P. Melatonin and oxidative stress. *Rev Esp Enferm Dig* 2009;101(7):453-9.
43. de Jongh R, Haenen GR, van Koeveeringe GA, Dambros M, De Mey JG, van Kerrebroeck PE. Oxidative stress reduces the muscarinic receptor function in the urinary bladder. *Neurourol Urodyn* 2007;26(2):302-8.
44. Sagach VF, Scrosati M, Fielding J, Rossoni G, Galli C, Visioli F. The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage in vitro and ex vivo. A comparison with vitamin E. *Pharmacol Res* 2002;45(6):435-9.
45. Koyuturk M, Bolkent S, Ozdil S, Arbak S, Yanardag R. The protective effect of vitamin C, vitamin E and selenium combination therapy on ethanol-induced duodenal mucosal injury. *Hum Exp Toxicol* 2004;23(8):391-8.