

17 00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS FACULTAD DE CIENCIAS

EFEECTO DEL LANSOPRAZOLE EN LA RECUPERACION DEL EPITELIO GASTRICO DE RATAS POSTERIOR A UNA GASTRITIS EXPERIMENTAL PRODUCIDA POR LA ADMINISTRACION SUBCRONICA DE ETANOL.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A O.A. MARISELA OLGUIN MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROLANDO E. HERNANDEZ MUÑOZ

MEXICO, D.F.



MARZO, 2002

COORDINACIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 19 de noviembre de 2001, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) de la alumna OLGUIN MARTINEZ MARISELA con número de cuenta 96817308, número de expediente 5962019, con la tesis titulada: "EFECTO DEL LANZOPRAZOLE EN LA RECUPERACION DEL EPITELIO GÁSTRICO DE RATAS POSTERIOR A UNA GASTRITIS EXPERIMENTAL PRODUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN SUBCRÓNICA DE ETANOL", bajo la dirección del DR. ROLANDO E. HERNANDEZ MUÑOZ.

Presidente:	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Secretario:	Dr. Rolando E. Hernández Muñoz
Vocal:	Dra. María Luisa Fanjul Peña
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente:	Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de diciembre de 2001

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c c p Expediente del interesado

Miembros del comité tutorial

Dr. Rolando Hernández Muñoz,

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez,

Dra. Silvia Devars Ramos,

Gracias por darme parte de su tiempo
para la evaluación y el desarrollo de este trabajo.

Agradecimientos

Muy especialmente, con cariño, respeto y admiración,
al ***Dr. Rolando E. Hernández Muñoz***: por ser un maestro excelente,
un guía ejemplar y un gran ser humano.

Por compartir conmigo su gusto por la ciencia,
darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo,
su infinito apoyo para seguir adelante y la confianza de hacer posibles
los sueños y los anhelos.

A mis padres:

Alfredo Olguín García y Yolanda Martínez Sánchez,
por formarme en el camino del estudio

 Todos estamos en escaleras resbalosas,
 pero nuestros pasos pueden ser seguros y estables
 cuando sabemos que el barandal esta hecho de material fuerte

A mi hermana Elizabeth Olguín Martínez: Por la corrección de estilo
y ser mi compañera de toda la vida

A Judith Catalina Navarro Gómez: Por su maravillosa amistad,
sus consejos, su alegría y su complicidad.

A la empresa "Productos Lácteos Tocumbo, S.A de C.V.":

Especialmente a Guillermo Andrade Malfavón y
a José Manuel Anaya Pérez por darme su confianza,
su apoyo y la oportunidad de crecer en el ámbito laboral.

A mis compañeros de laboratorio:

Ileana M. Hernández Rincón, su invaluable ayuda y compañía
en el desarrollo de mi trabajo.

Edgar R. Mendieta Condado, con su juventud me brindó
el apoyo con el uso de la tecnología moderna.

Delia Eurídice Bernal, Juan Antonio Suárez Cuenca
y Ma. De Lourdes Sánchez Sevilla.

A todos ellos por compartir conmigo su espacio y parte de sus vidas.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz: Por su optimismo y su tranquilidad.

ÍNDICE

Pág

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ABREVIATURAS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

CONCEPTOS BÁSICOS

Estómago

Secreción ácida

ATPasa H^+ - K^+

Inhibidores de la bomba de protones

Lansoprazole

Daño gástrico

Etanol

HIPÓTESIS

OBJETIVO

Objetivos particulares

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo animal

Histología

Obtención de muestras

Caracterización lipídica

Actividad de 5'-nucleotidasa

Cuantificación de timidín-cinasa

Lipoperoxidación

Estudio del metabolismo oxidativo

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIÓN

ANEXO

BIBLIOGRAFIA

1

4

4

8

9

12

14

16

18

21

21

21

22

22

22

22

23

23

23

24

24

24

34

42

43

48

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág
Figura número 1: Estómago	4
Figura número 2: Estructura de la glándula gástrica	5
Figura número 3: Activación de la ATPasa H ⁺ -K ⁺ gástrica	10
Figura número 4: Ciclo de transporte de la ATPasa H ⁺ -K ⁺ gástrica	11
Figura número 5: Inhibición de la secreción ácida por lansoprazole	13
Figura número 6: Vía de activación del lansoprazole	14
Tabla número 1: Incidencia de lesión microscópica en estómagos de ratas que recibieron etanol y lansoprazole	25
Tabla número 2: Composición fosfolipídica de las membranas de mucosa de animales con gastritis y tratados con lansoprazole.	26
Tabla número 3: Actividad de la enzima 5'-nucleotidasa	30
Tabla número 4: Metabolismo de glucosa.	33
Gráfica número 1: Fosfolípidos totales	27
Gráfica número 2: Colesterol.	28
Gráfica número 3: Relación colesterol:fosfolípidos.	29
Gráfica número 4: Lipoperoxidación	31
Gráfica número 5: Actividad de timidín-cinasa	32

ABREVIATURAS

5'-NT	5'-nucleotidasa
Asp	Ácido aspártico
dATP	Deoxiadenosintrifosfato
dCTP	Deoxicisteintrifosfato
dGTP	Deoxiguanosindintrifosfato
dTTP	Deoxitimidintrifosfato
ECL	Células enterochromafin like
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FC	Fosfatidilcolina
FE	Fosfatidiletanolamina
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FI	Fosfatidilinositol
FS	Fosfatidilserina
IBP	Inhibidor de la bomba de protones
LP	Lipoperoxidación
PGE2	Prostaglandina E2
PMN	Polimorfonucleares
RF	Factor de retención
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TK	Timidín-cinasa

RESUMEN

La administración subcrónica de etanol en ratas daña a las células epiteliales produciendo un cuadro de gastritis y alteraciones a nivel de membrana plasmática de la mucosa gástrica, como disminución de algunos fosfolípidos, aumento del colesterol y disminución de la actividad de enzimas asociadas a la membrana como la 5'-nucleotidasa. Compuestos como los inhibidores de la bomba de protones gástrica se utilizan clínicamente en casos de gastritis y enfermedad ácido-péptica. El objetivo de este proyecto fue el determinar el efecto de estos compuestos sobre los cambios estructurales y funcionales que se presentan en la mucosa gástrica dañada en un modelo de gastritis experimental inducida con etanol en ratas. Los resultados demostraron que en una gastritis tratada con lansoprazole, durante las primeras 72 horas, se normalizó la relación colesterol:fosfolípidos de la membrana plasmática, y aumentó la actividad de la enzima 5'-nucleotidasa. Se determinó la actividad de la enzima timidín-cinasa, como un indicador de proliferación celular y se observó que la actividad de esta enzima aumenta en tiempos tardíos en la fase de recuperación de la mucosa gástrica, mientras que en animales tratados con lansoprazole, el pico de proliferación fue más temprano. La proliferación compensatoria de la mucosa gástrica, posterior al retiro del etanol, coincidió con un aumento en el patrón lipoperoxidativo de las membranas de la mucosa gástrica. Durante la fase de recuperación la mucosa dañada incrementa el metabolismo oxidativo de la glucosa, incluida la ruta de la vía de las pentosas ([1-¹⁴C] glucosa/[U-¹⁴C] glucosa). El tratamiento con lansoprazole adelantó el aumento en la vía de las pentosas, y normalizó más tempranamente el metabolismo oxidativo de la glucosa por la mucosa gástrica proveniente de animales con gastritis. En conclusión, el lansoprazole, un bloqueador de la bomba de protones gástrica, corrige las alteraciones estructurales generadas durante la instalación de una gastritis alcohólica experimental. Y su efecto puede estar relacionado con un estímulo de la regeneración de la mucosa gástrica.

INTRODUCCIÓN

La mucosa gástrica se encuentra frecuentemente expuesta a agentes agresores endógenos como sales biliares y ácido clorhídrico y a factores exógenos como algunos alimentos, medicamentos y estrés. Para mantener sus funciones digestivas en condiciones óptimas, el estómago cuenta con mecanismos de protección que contrarrestan la acción de los agentes agresores. Dentro de los mecanismos protectores de la mucosa gástrica se encuentra la secreción de mucus, prostaglandinas, bicarbonato, factores de crecimiento, flujo sanguíneo, etc. Sin embargo, los agentes agresores pueden exceder la capacidad protectora de la mucosa gástrica produciendo daños que pueden generar gastritis o úlceras en grados variables de severidad.

En la sociedad humana, es difícil conocer con exactitud cuál es la incidencia de las lesiones gástricas, aunque el número de pacientes que las presentan no es despreciable.

Generalmente el tratamiento para aliviar las lesiones gástricas consiste en la neutralización, la reducción, o la inhibición de la producción de ácido, y así favorecer la regeneración de la mucosa dañada.

Sustancias como los antiácidos, prostaglandinas, bloqueadores de los receptores H_2 de histamina, factores de crecimiento, e inhibidores de la bomba de protones (IBP), presentan propiedades contra el daño a la mucosa gástrica y favorecen la regeneración celular. Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos celulares que generan el daño, y la regeneración epitelial (Hernández-Muñoz y Montiel- Ruiz, 1996).

Se ha reportado que la administración subcrónica de etanol en ratas daña rápidamente las células epiteliales produciendo un cuadro de gastritis, donde se altera la composición de la membrana celular al disminuir algunos fosfolípidos, aumentar el nivel de colesterol y disminuir la actividad de enzimas asociadas a membrana como la 5'-nucleotidasa. En este modelo de gastritis, el

índice de lipoperoxidación también se ve alterado, así como la proliferación celular de la mucosa gástrica.

La suspensión de la administración de etanol produce la restitución de las alteraciones de la membrana y la regeneración epitelial. El tratamiento de esta gastritis con antagonistas de los receptores H₂ de histamina mejora la restitución de la mucosa gástrica, contribuyendo al proceso de curación (Hernández- Muñoz y Montiel- Ruiz, 1996; Hernández-Muñoz, et al., 2000).

Se ha publicado que el tratamiento de lesiones gástricas con IBP muestra una mejora del daño gástrico y una regeneración de la mucosa mayor que el tratamiento con los antagonistas de los receptores H₂ de histamina (Hashimoto, et al., 1995). También se reporta que los IBP reducen el daño inducido con el etanol en el estómago de ratas, pero el mecanismo de este efecto protector es desconocido (Fukunda, et al., 1995).

Dentro de los inhibidores de la bomba de protones se encuentran los siguientes compuestos el lansoprazole, omeprazole, pantoprazole y rabeprazole. Todos ellos se acumulan en el canalículo secretor de la célula parietal y se activan al protonarse con el pH ácido. La estructura protonada se une covalentemente a las cisteínas de las proteínas embebidas en la membrana, impidiendo la secreción del ácido clorhídrico (Hersey y Sach, 1995).

Generalmente los estudios de daño gástrico se han hecho con modelos de tratamientos agudos; en cambio el presente trabajo se basa en un modelo de gastritis alcohólica subcrónica publicado por Hernández-Muñoz y Montiel Ruiz (1996)

En el presente estudio se utilizó el lansoprazole como representante de los inhibidores de la bomba de protones, debido a que se reporta que es uno de los más potentes para inhibir la secreción ácida y de mayor estabilidad, lo que favorecería la recuperación del daño de la mucosa gástrica.

En este trabajo se pretende determinar si el lansoprazole es capaz de revertir las alteraciones producidas por un daño crónico inducido por etanol en la mucosa gástrica de ratas, favoreciendo la recuperación del epitelio gástrico

Para ello se llevaron a cabo evaluaciones histológicas para determinar el grado de daño y de recuperación en la mucosa gástrica. También se hicieron pruebas bioquímicas como la determinación de la composición lipídica de la membrana plasmática y el nivel de colesterol, así como la actividad de la enzima 5'-nucleotidasa como indicadores de cambio en la fluidez de la membrana.

Otro mecanismo propuesto para los efectos de citoprotección incluye la síntesis de DNA, de esta manera, la proliferación celular es un factor importante en la recuperación celular, por este motivo se determinó la actividad de la enzima citosólica timidín-cinasa como marcador proliferativo.

Existe evidencia de que la lipoperoxidación de las membranas plasmáticas puede tener un papel importante en la patogénesis de las lesiones de la mucosa gástrica. Sin embargo, la regeneración del epitelio de la superficie mucosa que ocurre al retirar el etanol, se acompaña de un aumento importante de lipoperoxidación en las membranas plasmáticas de la mucosa gástrica, lo que sugiere una correlación significativa entre lipoperoxidación y proliferación celular. Se ha reportado un modelo de proliferación en regeneración hepática, que presenta un comportamiento similar a éste (Hernández-Muñoz, et al., 2000).

En este estudio se determinó el perfil lipoperoxidativo y la actividad de timidín-cinasa, con el propósito de observar si el tratamiento con lansoprazole también produce un patrón de lipoperoxidación que coincida con la proliferación celular.

Por otro lado, se sabe que en la producción de ácido clorhídrico, interviene la bomba de protones ATPasa H^+-K^+ gástrica. El ATP requerido para el buen funcionamiento de esta bomba se obtiene principalmente del metabolismo oxidativo de la glucosa (Fryklund, et al., 1990) Debido a que el lansoprazole bloquea a la ATPasa H^+-K^+ , se determinó la oxidación de glucosa, con el propósito de observar el efecto del bloqueador de la bomba, durante el metabolismo de glucosa en una gastritis tratada con este compuesto.

CONCEPTOS BÁSICOS

ESTÓMAGO

Las principales funciones del estómago son: proteger al intestino delgado de la invasión de microorganismos ingeridos, a través de la secreción ácida, almacenar los alimentos y favorecer su absorción, iniciar el proceso de digestión de los alimentos por ruptura mecánica y química de sus constituyentes y proporcionar una fuente de señales para la regulación de la ingesta de alimentos como la sensación de saciedad.

El estómago puede dividirse anatómicamente en tres secciones: el fondo que se encuentra en la porción más alta; el cuerpo que se extiende desde la unión gastro-esofágica a la incisura, y el antro, que termina en el píloro que es la porción final del estómago (fig. 1). El fondo y el cuerpo son los responsables

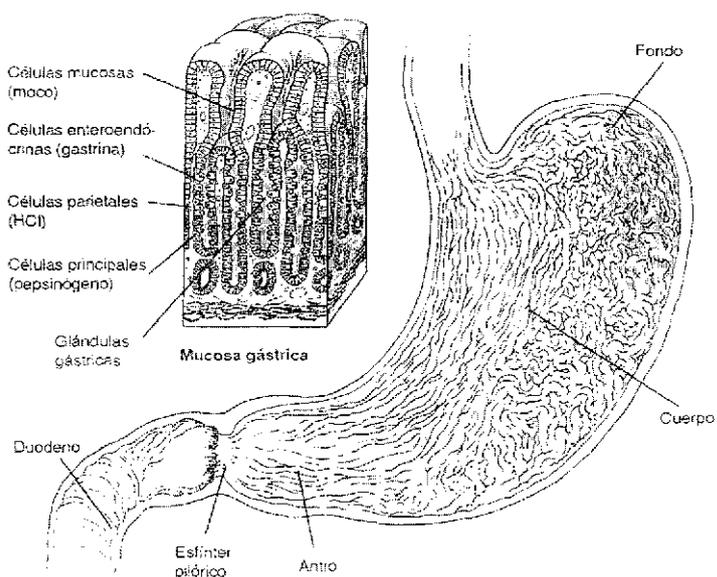


Fig 1. Estructura anatómica y organización histológica del estómago

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de la producción de secreciones, mientras que el antro es responsable de la secreción de gastrina y de la acción de bombeo la cual es importante para mezclar los alimentos con las secreciones digestivas (Mantle, 1989)

La mucosa es la capa más interna de la pared del estómago y se encuentra organizada en pliegues, que forman las glándulas gástricas (fig. 1). Éstas pueden dividirse en cuatro regiones (fig. 2) cripta, que abarca el tercio superior de la glándula, istmo (zona proliferativa del epitelio) y cuello que,

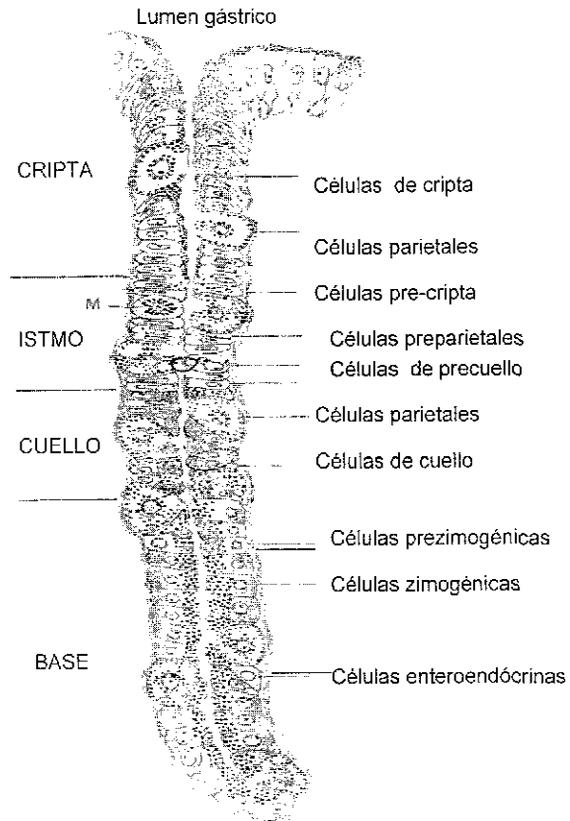


Fig. 2 Estructura de la glándula gástrica

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

corresponden al tercio medio y, finalmente la base que se encuentra en el tercio inferior (Karam, 1993). Cada región está compuesta por diferentes tipos de células. las células de la cripta que producen mucus, las células parietales, las cuales secretan ácido clorhídrico las células del cuello que secretan mucus, células zimogénicas productoras de pepsinógeno y, las células enteroendócrinas que secretan gástrina. La estructura de estas glándulas varía entre el cuerpo y el antro. En las glándulas del antro se encuentra un gran número de células secretoras de mucus y secretoras de gastrina (células G) (Davison, 1989).

Las células de la cripta se encuentran a lo largo de la superficie gástrica, presentan gránulos de mucus en la membrana apical; el 87% de estas células se genera en la región del istmo a partir de células indiferenciadas y migran hacia el lumen gástrico mientras presentan una fase de maduración durante la ascensión por las paredes de la cripta. En esta ascensión, las células completan su diferenciación gradualmente produciendo gránulos secretorios de mayor tamaño y el 13 % se genera a partir de su propia mitosis. En el estómago de rata la migración hacia la superficie se lleva a cabo en tres o cuatro días aproximadamente y, en el de humano de cuatro a seis días. Cuando estas células se degeneran son expulsadas hacia el lumen gástrico o fagocitadas por células vecinas y eventualmente expulsadas al lumen (Karam y Leblond, 1993a)

Las células no diferenciadas del istmo generan células de precuello, estas células van migrando durante una o dos semanas, produciendo gránulos secretores más largos hasta diferenciarse como células de cuello productoras de mucus. El 59% de las células del cuello se originan de esta diferenciación y el 41% se deriva de su propia mitosis (Karam y Leblond, 1993). Las células del cuello no presentan fase de deterioro porque se transforman en células prezimogénicas cuando alcanzan la parte superior de la región de la base. Estas células van a formar a las células zimogénicas que van migrando hacia la parte baja de la base, donde eventualmente se degeneran y mueren. Los remanentes celulares pueden ser lanzados al lumen gástrico o ser fagocitados.

El recambio de las células prezimogénicas es aproximadamente de un mes y, probablemente, de 6 meses para las zimogénicas (Karam y Leblond, 1993).

Las células parietales se esparcen por las cuatro regiones de la glándula. Estas células no se dividen, sino que se generan de células inmaduras del istmo que migran hacia la cripta o hacia el cuello.

Su diferenciación pasa por tres etapas que se llevan a cabo en el istmo preparietales, que son células que presentan una microvellosidad apical y mitocondrias pequeñas. Después se va formando un canaliculo alrededor de la superficie apical y una invaginación dentro del citoplasma, y aparecen pequeñas tubulo-vesículas en el citoplasma. Las mitocondrias aumentan su tamaño y número y, en la tercera etapa, el canaliculo se expande y las mitocondrias y tubulo-vesículas se alargan.

Cuando estas células se degeneran pueden eliminarse hacia el lumen gástrico o ser fagocitadas por células vecinas o macrófagos. El recambio de las células parietales dura en promedio 54 días (Karam, 1993).

Para mantener la barrera celular epitelial en el tracto gastrointestinal hay dos procesos: proliferación y restitución. La proliferación ocurre como resultado de la mitosis y es un proceso prolongado. La división celular mantiene la masa de la mucosa reemplazándola continuamente, las células viejas son exfoliadas de la superficie epitelial hacia el lumen gástrico. En contraste, la restitución o reepitelización es un proceso más rápido que depende de la migración celular a través de la lámina basal. Este proceso debe asegurar que el epitelio sea restablecido rápidamente en áreas desnudas de la superficie que se han producido como resultado de un daño menor.

Después de la mitosis, las células hijas migran fuera de la zona proliferativa y pierden su habilidad para dividirse, sufriendo una diferenciación progresiva y asumiendo funciones de células maduras de la mucosa gástrica. Así, el recambio epitelial involucra proliferación, maduración, migración, diferenciación y finalmente pérdida de las células. En la mucosa gástrica, la proliferación ocurre en el istmo de la glándula y la mayoría de las células nuevas migran hacia la superficie (Allen, et al., 1993).

SECRECIÓN ÁCIDA

El estómago de los mamíferos tiene la capacidad de secretar ácido a través de las células parietales que se localizan en la glándula gástrica; estas células contienen un elevado número de mitocondrias, tubulo-vesículas citoplásmicas, y el canalículo secretor extracelular.

Durante el proceso de secreción intervienen las células D y las células G que se encuentran en el antro gástrico, células *Enterochromafin like* (ECL) que contienen gránulos de histamina, y acetilcolina que se secreta del sistema nervioso entérico. También intervienen los receptores H_2 de histamina, M_3 de acetilcolina y el receptor de gastrina que se encuentran en la membrana basolateral de la célula parietal (Davison, 1989).

La secreción ácido-gástrica se regula por mecanismos complejos a nivel de sistema nervioso. Las fibras nerviosas que inervan a las glándulas gástricas y que se localizan dentro de la pared del estómago se extienden desde el cuerpo y el antro del estómago y, se estimulan por el sabor, la vista, y el olor de los alimentos, así como por el proceso de masticación y deglución. La acetilcolina liberada de estas terminales nerviosas puede unirse al receptor M_3 de las células parietales, y estimular la secreción ácida. La acetilcolina también estimula directamente a las células ECL para liberar histamina, la cual se une al receptor H_2 de la célula parietal (Hersey y Sach, 1995; Davison, 1989).

La acetilcolina también activa a las células G del antro para secretar gastrina, la cual entra al torrente sanguíneo y produce la liberación de histamina de las células ECL. La gastrina puede activar directamente a la célula parietal debido a que ésta tiene en su membrana receptores específicos para gastrina.

La histamina es otro estimulante para secreción de la célula parietal. Ésta se encuentra en las glándulas del cuerpo del estómago, en las células ECL que se encuentran cercanas a las células parietales. La histamina se libera por la acetilcolina y la gastrina y es el mediador final de estos transmisores.

La gastrina, histamina y acetilcolina actúan sobre sus receptores específicos en la célula parietal para estimular la liberación de H^+ . Cada uno de ellos puede potenciar la acción de los otros dos, es decir, que existe un sinergismo entre estos tres secretagogos. El bloqueo del estímulo de uno de ellos reduce la sensibilidad de las glándulas gástricas a la estimulación, pero se mantiene la respuesta a los otros dos (Davison, 1989).

La regulación de la secreción ácida también incluye procesos inhibitorios. La somatostatina es un potente agente antisecretor que se localiza en el fondo y en el cuerpo del estómago; los dos principales sitios de acción de la somatostatina son las células G y la célula parietal. El mecanismo regulatorio debe ser capaz de detectar el pH intragástrico y responder apropiadamente para prevenir una secreción excesiva. Cuando el estómago detecta una disminución de pH menor de 3,0, libera somatostatina a través de las células D y, se inhibe la secreción de gastrina de las células G y de histamina, controlando la secreción ácida por medio de un proceso de retroalimentación. (Hersey y Sach, 1995; Davison, 1989).

ATPASA H^+K^+ .

El mecanismo final de la secreción ácida es la activación de la bomba de protones gástrica (ATPasa H^+K^+), que constituye la etapa final de la secreción. Esta bomba se activa por la concentración luminal de K^+ y transporta H^+ hacia el canalículo a través de las membranas, produciendo un intercambio electroneutro entre estos dos iones, y un pH de 0,8 dentro del canalículo. En la célula también hay un flujo de KCl hacia el lado extracitoplásmico (Hersey y Sach, 1995; Sach, y Shin, 1995).

La secreción ácida es un proceso discontinuo: cuando la célula parietal se encuentra en reposo, las bombas están dentro de vesículas citoplásmicas y permanecen inactivas; cuando la célula es estimulada, hay un incremento en la permeabilidad de la membrana apical al ion potasio extracitosólico, y se produce un cambio en la morfología de la célula. Las vesículas del citoplasma se dirigen hacia el canalículo secretor, se incorporan a la membrana apical, y aumenta el número de bombas en la membrana, las cuales quedan expuestas

en el sitio específico de la secreción ácida (fig.3). De esta manera, se activa la bomba de protones y los iones se difunden hacia dentro de la célula, produciendo un flujo de H^+ y Cl^- dentro del canalículo, donde forman el ácido clorhídrico (Hersey y Sach, 1995)

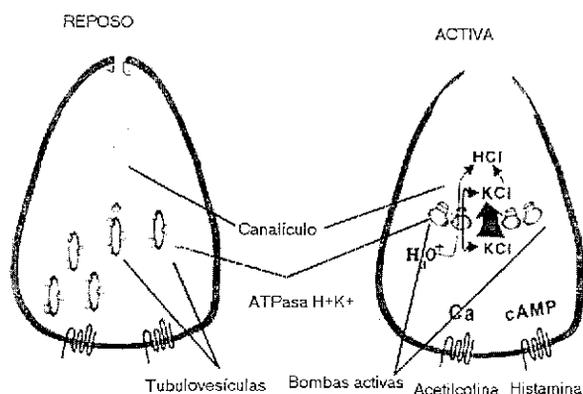


Fig. 3 Activación de la ATPasa H^+K^+ gástrica

La estimulación de las células parietales para la producción de la secreción gástrica es seguida por la activación del metabolismo oxidativo, que proporciona el ATP necesario para el buen funcionamiento de la ATPasa. El mecanismo de activación no se conoce (Hernández y Chacín, 1994)

Cuando se retira el estímulo, el proceso se revierte, y la ATPasa H^+K^+ regresa a las tubulo-vesículas, disminuye la superficie canalicular y el número de bombas expuestas. La permeabilidad del canalículo cambia en estado de reposo, lo que evita que la enzima se mantenga activa dentro de las vesículas (Hersey y Sach, 1995).

La ATPasa H^+K^+ consta de dos subunidades. una grande (100kDa) llamada alfa y una pequeña (34kDa) denominada beta. La subunidad alfa es la unidad catalítica de la enzima, esta compuesta de 10 segmentos transmembranales conectados por 5 asas extracitoplásmicas y contiene el sitio

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de fosforilación del ATP (Asp^{385}) entre los segmentos M4/M5 (Sach y Shin, 1995).

La subunidad beta está constituida por un segmento único que en su mayoría se encuentra del lado extracitosólico y cruza la membrana sólo una vez (Munson, et al 2000). La función exacta de esta subunidad no está bien definida, pero parece ser necesaria para el ensamble y la estabilización de la subunidad alfa. La región de asociación entre estas subunidades es el dominio M7/M8 (Hersey y Sach, 1995).

La ATPasa $\text{H}^+\text{-K}^+$ cataliza la hidrólisis de ATP en presencia de K^+ extracitoplásmico. La subunidad alfa sufre un ciclo de fosforilación-desfosforilación y estas dos etapas de reacción producen cambios conformacionales en la proteína y en el transporte de iones.

Por definición, cuando el sitio de unión al ion está del lado citoplásmico, la conformación se denomina E1 y cuando está del lado extracitoplásmico se denomina configuración E2. Estos dos estados involucran diferentes afinidades por los iones (Hersey y Sach, 1995).

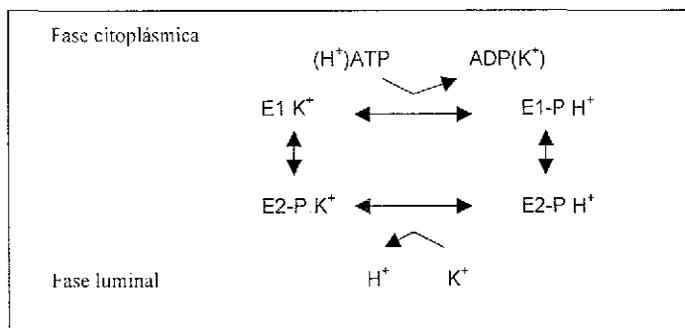


Fig 4 - Ciclo de transporte de la ATPasa H^+K^+

El ciclo se inicia cuando el H^+ se une al lado citoplásmico y existe una alta afinidad de unión al ATP, seguida por la transferencia del grupo fosfato terminal del ATP a un residuo de ácido aspártico en el centro activo de la enzima. Aquí se genera la forma E1-PH^+ (fig. 4). Cuando se libera H^+ en la parte luminal se

produce un cambio conformacional y se genera la forma E2-PH⁺, que presenta alta afinidad por el K⁺ extracitosólico y cambia a la forma E2-PK⁺ que induce la desfosforilación de la ATPasa H⁺-K⁺. La enzima se convierte a la forma E1-K⁺ que trasloca el K⁺ al medio citosólico (Wallmark, et al. 1990)

INHIBIDORES DE LA BOMBA DE PROTONES

Se ha utilizado una gran cantidad de compuestos para el tratamiento de las enfermedades ácido-pépticas. Los antiácidos líquidos fueron los primeros en mostrar que la neutralización del ácido gástrico podía acelerar la cura de estas enfermedades. Sin embargo, la dosis necesaria era muy alta y frecuente.

Los siguientes compuestos, fueron los antagonistas de los receptores H₂ de histamina y los inhibidores de la bomba de protones, cuyo modo de acción consiste en reducir la secreción ácida. Los primeros reducen la secreción ácida aproximadamente en un 50%; en este grupo se encuentran la cimetidina, la ranitidina y la famotidina. Todos son agentes seguros y efectivos para el tratamiento de enfermedades ácido-pépticas; sin embargo, no controlan la patología en todos los pacientes (Feldman, 1995).

La contribución esencial de la ATPasa H⁺-K⁺ para la secreción ácida ha favorecido la síntesis de compuestos que al inhibir selectivamente a la enzima, reducen la secreción de ácido. Estos compuestos se utilizan clínicamente para el tratamiento de enfermedades ácido-pépticas. Una clase de estos compuestos son los benzimidazoles sustituidos, denominados inhibidores de la bomba de protones (IBP) entre los que se encuentran el omeprazole, lansoprazole, rabeprazole y pantoprazole.

Los IBP contienen 2-piridilmetilsulfonilbenzimidazol con varias sustituciones en la piridina o en el benzimidazol. Son bases débiles, permeables a la membrana, que se acumulan en el canalículo secretor de la célula parietal. Ahí se protonan y forman una estructura tetracíclica de sulfonamida, impermeable a la membrana y capaz de reaccionar con el grupo SH de las cisteínas accesibles del lado extracitoplásmico de la subunidad alfa de la ATPasa H⁺-K⁺ gástrica (fig. 5). Estos compuestos inhiben la actividad de

la enzima y la secreción de ácido, debido a que bloquean el transporte de iones y evitan los cambios conformacionales

Los IBP son altamente específicos y sólo son activos en el ambiente ácido generado por la bomba, su sitio de unión está en la parte extracitosólica de la enzima y es diferente para cada compuesto: el omeprazole se une a las cisteínas 813, 822 y 892; el lansoprazole a la 321, 813, 822 y 892; mientras que el pantoprazole forma enlaces con las cisteínas 813 y 822. Estas diferencias sugieren que hay una especificidad estructural entre estos compuestos y la superficie de la enzima (Lambrecht, et al., 2000).

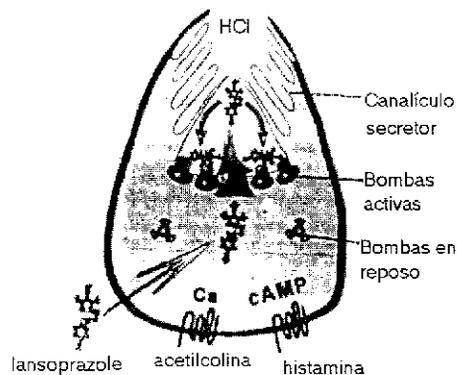


Fig 5 Inhibición de la secreción ácida por lansoprazole

La unión covalente a la cisteína 813 parece ser la responsable de la inhibición de la ATPasa H^+-K^+ ya que ésta es común para los compuestos benzimidazoles (Lambrecht, et al, 2000). Ésta se encuentra en el segmento M5/M6, al igual que la cisteína 822 (Besancon, et al, 1997; Hersey y Sach, 1995).

La vida media de la ATPasa H^+-K^+ en el estómago de rata es de 50 horas, los IBP no cambian este valor probablemente debido a que el recambio de la bomba depende de la endocitosis de las bombas presentes en la membrana canalicular. Al reducir la secreción, hay menos bombas en la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

membrana y el recambio es más lento (Hersey y Sach, 1995; Sach y Shin, 1995)

La reversión de la inhibición por estos compuestos no solo se debe a la síntesis de bombas nuevas, sino también a la inestabilidad del enlace S-S (Hersey y Sach, 1995). Los sustituyentes del anillo benzimidazol presentan diferencias en su estabilidad a pH neutro, el pantoprazole es el más estable luego el omeprazole y después el lansoprazole

Estos compuestos reaccionan únicamente con las bombas presentes en el canalículo secretor. Cuando se tiene la máxima inhibición de bombas activas, otras bombas sintetizadas *de novo* o que se activen no serán inhibidas. durante 3 horas después de la dosis (Sach y Shin, 1995)

LANSOPRAZOLE

El lansoprazole es un benzimidazol sustituido con un grupo trifluorometoxi. Disminuye la secreción ácida a través de la inhibición de la bomba de protones de las células parietales. El lansoprazole disminuye el volumen de secreción de manera dosis-dependiente en el rango de 15 a 60 mg/día

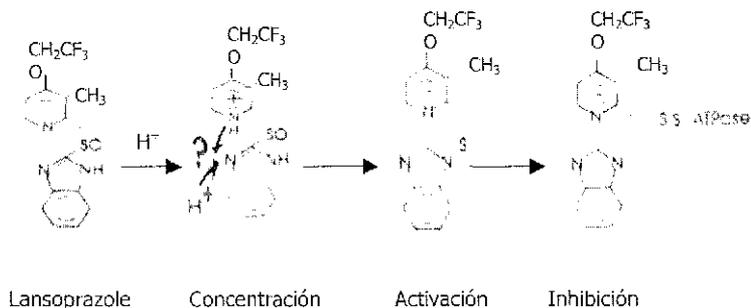


Fig 6 Vía de activación del lansoprazole, se concentra en el espacio Ácido del canalículo secretor, Forma una estructura tetracíclica (sulfona) La sulfona reacciona con las cisteínas de la ATPasa H⁺-K⁺

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El compuesto por sí mismo no inhibe directamente a la ATPasa gástrica, sino que su efecto es vía la formación de metabolitos activos en el ambiente ácido dentro del canalículo intracelular de la célula parietal. Estos metabolitos oxidan los grupos sulfhidrilo de la ATPasa e inactivan a la enzima. El compuesto puede detectarse en el suero 30 minutos después de la administración de una dosis oral de 30 mg, y una concentración máxima se detecta a las 2.2 horas. Después de la administración oral, el lansoprazole también se transfiere a los tejidos fetales y leche materna de ratas.

Los dos principales metabolitos de excreción son lansoprazole sulfona e hidroxilansoprazole.

Se sabe que una inhibición prolongada de la secreción ácido-gástrica produce hipergastrinemia e hipertrofia de la mucosa gástrica. La administración continua de altas dosis de lansoprazole (50 mg/kg/día) durante un año produce cambios morfológicos en la mucosa gástrica de ratas y perros: hipertrofia de las células parietales y glándulas gástricas y, en algunos modelos animales, el desarrollo de hiperplasia de las células ECL y desarrollo de carcinoides.

La concentración de lansoprazole que produce la inhibición del 50% de la enzima a pH fisiológico es de 12.1 $\mu\text{mol/l}$. A un pH de 6.1, 2.1 $\mu\text{mol/l}$; a pH de 6.8, 6.31 $\mu\text{mol/l}$ y, a pH 7.4, 12.11 $\mu\text{mol/l}$. Este incremento probablemente se debe a la disminución de la conversión del compuesto a metabolitos activos en un ambiente menos ácido.

Estudios en animales han demostrado que el lansoprazole proporciona protección contra daños a la mucosa inducidos con agentes como el etanol.

Cerca del 90% de pacientes con úlceras gástricas, han presentado infecciones con *H. pylori*. Parece que la erradicación de este organismo es necesaria para la normalización de la mucosa gástrica y el lansoprazole ha resultado altamente selectivo para este tratamiento.

Los antagonistas de los receptores H_2 de histamina, revolucionaron la terapia de las enfermedades relacionadas con la producción de ácido debido a su habilidad de suprimir la secreción ácido-gástrica y aliviar las úlceras. Sin embargo, algunos pacientes con úlceras o reflujo severo son resistentes a la terapia con antagonistas de los receptores H_2 de histamina, o responden

pobremente a estos compuestos, aún tratados con dosis altas. El lansoprazole proporciona mayor inhibición del ácido y en un tiempo más prolongado, lo que puede favorecer la mejoría de la lesión.

La eficacia terapéutica del lansoprazole se ha investigado en pacientes con úlceras gástricas, con enfermedades ácido-pépticas resistentes a los antagonistas de los receptores H_2 y pacientes con reflujo gastroesofágico y, comparado con otros compuestos como ranitidina y famotidina, el lansoprazole presenta mayor proporción de mejora en tiempos más tempranos. Comparado con el omeprazole, presenta una proporción de mejora similar pero el lansoprazole parece actuar más rápido.

La incidencia de efectos adversos es similar a la reportada con otros compuestos utilizados para el tratamiento de enfermedades ácido-pépticas: problemas gastrointestinales, dolor de cabeza, náusea, y reacciones dermatológicas (Barradell, et al., 1992).

DAÑO GÁSTRICO

La mucosa gástrica se encuentra expuesta a agentes agresores endógenos (ácido clorhídrico, pepsina, etc) por lo que se requiere, un mecanismo de protección de la mucosa para que el estómago mantenga sus funciones digestivas en condiciones óptimas. Este mecanismo protector consiste, en un equilibrio entre los agentes agresores de la mucosa gástrica y los factores citoprotectores, como son: prostaglandinas, bicarbonato, barrera mucosa, una rápida regeneración de células epiteliales y la restitución celular (Allen, et al, 1993). Al romperse este equilibrio hacia los factores agresivos, se producen daños a la mucosa del tipo de úlceras y gastritis, las cuales se presentan con elevada frecuencia y en grados variables de severidad.

La bacteria *Helicobacter pylori* es también reconocida en la actualidad como elemento importante en la génesis de enfermedades gástricas. Este organismo se adquiere por vía oral-fecal y se ha identificado en la mucosa gástrica en 83% de individuos no sintomáticos. Este microorganismo se asocia con lesiones de la mucosa gástrica.

El mecanismo de defensa de la mucosa gástroduodenal comprende una serie de mecanismos que actúan en conjunto para prevenir o limitar el daño celular. Estos mecanismos pueden dividirse en: transporte de iones a través de la membrana, factores de crecimiento y factores vasculares. Las propiedades de la barrera mucosa extracelular son la formación de moco gástrico (mucus) soluble con el jugo gástrico e insoluble como capa de gel sobre la superficie de la mucosa gástrica. Su secreción aumenta por irritación química o mecánica. El mucus es una glucoproteína polimérica que contiene puentes disulfuro. La despolimerización hace que la glucoproteína no pueda formar un gel viscoso.

La capa de mucus puede servir como una barrera de difusión al ácido luminal para retardar el flujo de ácido dentro del tejido. Esta propiedad se atribuye a que el mucus puede atrapar iones bicarbonato secretados por el epitelio y a las propiedades gelificantes, que aumentan a bajos pHs tal vez debido a la polimerización de glicoproteínas.

La habilidad para secretar bicarbonato dentro de la capa de mucus puede ser regulada por un intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ que es estimulado por prostaglandinas (PGE_2). Éstas tienen la habilidad de fortificar la barrera gástroduodenal al estimular la síntesis y secreción de mucus, la secreción de bicarbonato y mantener el flujo sanguíneo de la mucosa.

Los fosfolípidos de la superficie juegan un papel importante en la barrera protectora del epitelio gástrico, ya que contribuyen a formar una barra impermeable al ácido luminal e imparten propiedades de viscosidad y fluidez a la capa de mucus. Los fosfolípidos de las células epiteliales de la superficie, intervienen en la integridad de la membrana plasmática y ésta puede contribuir a la integridad de la barrera protectora (Kauffman, 1985).

La distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática es asimétrica: la capa externa es rica en fosfatidilcolina (FC) y la capa interna contiene fosfatidiletanolamina (FE) y fosfatidilserina (FS) (Voelker, 1991).

El cambio en el perfil de fosfolípidos puede disminuir la resistencia de la mucosa a agentes tóxicos y a la secreción ácida. Agentes agresores como el etanol pueden dañar la barrera de la mucosa gástrica alterando la composición fosfolípida y la hidrofobicidad de la superficie (Nardone, et al., 1994).

ETANOL

El etanol o alcohol etílico, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, es el alcohol que se emplea en las bebidas alcohólicas. Dada su gran utilidad como disolvente, desinfectante y como materia prima para muchas síntesis, el etanol es uno de los alcoholes de más fácil adquisición y de uso más frecuente.

El etanol se prepara industrialmente mediante la hidratación del eteno (obtenido de fuentes de petróleo) en presencia de ácido. El etanol puro puede obtenerse al eliminar el agua del etanol al 95% por destilación o por métodos químicos. Este alcohol no es adecuado para el consumo humano (Wingrove, Caret, 1984).

Para su uso en bebidas, el etanol se produce por la fermentación de los carbohidratos contenidos en los granos, de aquí que también se le denomine alcohol de grano (Burns, 1996).

El etanol se puede absorber en cantidad mínima a través de la mucosa oral. Sin embargo, pasa casi en su totalidad al estómago donde se absorbe de un 20-25% por difusión simple y la mayor cantidad de etanol es absorbido en el intestino delgado, de aquí pasa a la vena porta que lo conduce al hígado donde más del 90% es metabolizado.

En el interior del hepatocito el etanol se oxida por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) para formar acetaldehído y después forma acetato a través de la oxidación por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH).

El resto del etanol se metaboliza por otros tejidos como estómago, riñón, músculo y pulmón principalmente por la acción de ADH.

El metabolismo gástrico del alcohol se ha considerado como una barrera protectora contra los efectos del compuesto, debido a que al ser oxidado por la ADH gástrica, se disminuyen los niveles de etanol en sangre (Morales González, 2001).

El tratamiento agudo con etanol produce lesiones gástricas a través de mecanismos probablemente comunes a otros agentes agresores, sin embargo, hay algunos mecanismos específicos de la acción del etanol. El etanol rápidamente daña a las células del epitelio superficial del estómago glandular.

de ratas, alterando las membranas plasmáticas (Hernández-Muñoz y Montiel-Ruiz, 1996).

A concentraciones mayores del 35%, el etanol produce áreas de marcada hiperemia en la mucosa gástrica, necrosis de las células epiteliales y hemorragia de la mucosa. La administración de soluciones de etanol concentradas produce daño gástrico en la mucosa con una ruptura del 80% de las células epiteliales superficiales, alteración de las membranas plasmáticas e incremento en la permeabilidad de la mucosa.

El mecanismo celular de daño a la mucosa gastrointestinal producido por etanol no es completamente conocido, aunque está reportado que en concentraciones elevadas produce daño vascular, exfoliación epitelial, incremento en la generación de radicales libres, y disminución de la capacidad antioxidante. Sin embargo, el etanol a bajas concentraciones (8-20%) es capaz de incrementar la capacidad antioxidante de la mucosa gástrica y de protegerla contra la formación de lesiones (Moghadasian y Godin, 1996).

Oates y Hakkinen (1988) presentaron un modelo hipotético de la patogénesis del etanol donde el etanol concentrado (100%) causa una rápida *necrosis de las células superficiales de la mucosa, precipitando los constituyentes citoplásmicos y alterando la función de las membranas de las células mucosas, perturba a las células de la superficie al liberar histamina dentro de la mucosa. Se disparan una serie de constricciones en las venas de la mucosa y dilatación de las arterias, lo que produce hiperemia, edema y hemorragia. Si el etanol penetra al tejido produce un estancamiento del flujo sanguíneo, lo que produce pérdida del oxígeno y de nutrimentos, además de que previene la dilución del etanol. La presión y el volumen se elevan lo suficiente para crear una ampolla en el epitelio gástrico, si la concentración de etanol continúa en aumento dentro de las capas superficiales, se genera una hemólisis de las células sanguíneas estancadas y la precipitación de sangre y componentes de tejido dentro y alrededor de los capilares de la mucosa reforzando el estancamiento vascular. Debido a que hay muchas similitudes físicas y farmacológicas entre las lesiones gástricas inducidas con etanol y con otros agentes (como soluciones salinas concentradas), es probable que el*

mecanismo de formación de lesión sea común entre ellos (Oates y Hakkinen, 1988)

Aquí se observa que el etanol produce dos tipos de daño superficial, donde no hay hemorragia significativa pero hay exfoliación celular y, lesiones necróticas, donde la superficie de la mucosa esta dañada, hay un estancamiento vascular, hemorragias y necrosis celular.

Se ha reportado que la superficie mucosa se restituye rápidamente. Después de la exposición al agente agresor, hay una exfoliación del epitelio superficial seguida por una rápida migración celular desde la profundidad de la cripta gástrica a la lámina basal: Primero, las células epiteliales superficiales dañadas se desprenden de la lamina basal y forman una capa que separa el contenido luminal de la lámina basal desnuda. Se rompe la membrana de las células mucosas y sale su contenido mucoide que arrastra a las células de desecho y tejido necrótico. Durante este proceso hay un flujo alcalino continuo dentro del lumen gástrico y un incremento en el grosor de la capa gelatinosa sobre la mucosa.

Estos estudios sugieren que dentro de los factores de protección a la mucosa se encuentran: la formación de la capa gelatinosa que puede formar un microambiente óptimo para el mejoramiento de la mucosa dañada, el fluido alcalino puede difundir el agente nocivo en el lumen disminuyendo su efecto necrótico en la mucosa y, una rápida restitución epitelial que separa el ambiente epitelial del ambiente luminal (Lacy, 1985)

Muchas sustancias como los antiácidos, prostaglandinas, bloqueadores de los receptores H_2 de histamina, factores de crecimiento e inhibidores de la bomba de protones, han presentado propiedades protectoras contra el daño a la mucosa gástrica y favorecen la regeneración celular. Sin embargo, no se conoce el mecanismo celular mediante el cual el etanol promueve el daño a la mucosa gástrica, ni los eventos que permiten la regeneración epitelial.

Se ha publicado un modelo de gastritis experimental inducida por la administración de etanol en ratas, donde se presentan alteraciones a nivel de membrana plasmática como aumento en el nivel de colesterol, cambio en la composición fosfolipídica y, en el patrón lipoperoxidativo, disminución en la

fluidez de membrana plasmática y de la actividad de enzimas asociadas a este organelo. Este modelo también involucra la proliferación celular compensatoria al daño producido por el etanol. Después del daño las alteraciones son revertidas gradualmente al retirar el etanol y este proceso es acelerado por el tratamiento con antagonistas de los receptores H_2 de histamina (Hernández-Muñoz y Montiel-Ruiz, 1996).

HIPÓTESIS

Durante la instalación de una gastritis experimental inducida por la administración subcrónica de etanol, se producen alteraciones en la estructura y función de la mucosa gástrica. Alteraciones que se revierten al retirar el tratamiento con etanol y que se acompañan de una proliferación celular compensatoria.

La administración de lansoprazole, un inhibidor de la bomba de protones, promoverá una mayor efectividad en la recuperación estructural y funcional de la mucosa gástrica dañada con etanol.

OBJETIVO

Determinar el potencial del lansoprazole sobre la reversión de algunas de las alteraciones estructurales, funcionales y metabólicas que se presentan en la mucosa gástrica dañada en un modelo de gastritis experimental inducida por la administración subcrónica de etanol en ratas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Con el propósito de reproducir el modelo de gastritis reportado por Hernández-Muñoz y Montiel Ruíz (1996), y el efecto que tiene el lansoprazole sobre este modelo, se realizaron las siguientes determinaciones:

- Evaluar histológicamente la eficacia curativa del lansoprazole
- Caracterizar la composición lipídica de la membrana plasmática (fosfolípidos y colesterol)
- Cuantificar la lipoperoxidación en membranas plasmáticas como índice de daño y su posible correlación con la proliferación celular
- Determinar la actividad de la enzima 5'-nucleotidasa como marcador de la fluidez de la membrana plasmática

fluidez de membrana plasmática y de la actividad de enzimas asociadas a este organelo. Este modelo también involucra la proliferación celular compensatoria al daño producido por el etanol. Después del daño las alteraciones son revertidas gradualmente al retirar el etanol y este proceso es acelerado por el tratamiento con antagonistas de los receptores H_2 de histamina (Hernández-Muñoz y Montiel-Ruiz, 1996).

HIPÓTESIS

Durante la instalación de una gastritis experimental inducida por la administración subcrónica de etanol, se producen alteraciones en la estructura y función de la mucosa gástrica. Alteraciones que se revierten al retirar el tratamiento con etanol y que se acompañan de una proliferación celular compensatoria.

La administración de lansoprazole, un inhibidor de la bomba de protones, promoverá una mayor efectividad en la recuperación estructural y funcional de la mucosa gástrica dañada con etanol.

OBJETIVO

Determinar el potencial del lansoprazole sobre la reversión de algunas de las alteraciones estructurales, funcionales y metabólicas que se presentan en la mucosa gástrica dañada en un modelo de gastritis experimental inducida por la administración subcrónica de etanol en ratas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Con el propósito de reproducir el modelo de gastritis reportado por Hernández-Muñoz y Montiel Ruíz (1996), y el efecto que tiene el lansoprazole sobre este modelo, se realizaron las siguientes determinaciones:

- Evaluar histológicamente la eficacia curativa del lansoprazole
- Caracterizar la composición lipídica de la membrana plasmática (fosfolípidos y colesterol)
- Cuantificar la lipoperoxidación en membranas plasmáticas como índice de daño y su posible correlación con la proliferación celular
- Determinar la actividad de la enzima 5'-nucleotidasa como marcador de la fluidez de la membrana plasmática

fluidez de membrana plasmática y de la actividad de enzimas asociadas a este organelo. Este modelo también involucra la proliferación celular compensatoria al daño producido por el etanol. Después del daño las alteraciones son revertidas gradualmente al retirar el etanol y este proceso es acelerado por el tratamiento con antagonistas de los receptores H_2 de histamina (Hernández-Muñoz y Montiel-Ruiz, 1996).

HIPÓTESIS

Durante la instalación de una gastritis experimental inducida por la administración subcrónica de etanol, se producen alteraciones en la estructura y función de la mucosa gástrica. Alteraciones que se revierten al retirar el tratamiento con etanol y que se acompañan de una proliferación celular compensatoria.

La administración de lansoprazole, un inhibidor de la bomba de protones, promoverá una mayor efectividad en la recuperación estructural y funcional de la mucosa gástrica dañada con etanol.

OBJETIVO

Determinar el potencial del lansoprazole sobre la reversión de algunas de las alteraciones estructurales, funcionales y metabólicas que se presentan en la mucosa gástrica dañada en un modelo de gastritis experimental inducida por la administración subcrónica de etanol en ratas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Con el propósito de reproducir el modelo de gastritis reportado por Hernández-Muñoz y Montiel Ruíz (1996), y el efecto que tiene el lansoprazole sobre este modelo, se realizaron las siguientes determinaciones:

- Evaluar histológicamente la eficacia curativa del lansoprazole
- Caracterizar la composición lipídica de la membrana plasmática (fosfolípidos y colesterol)
- Cuantificar la lipoperoxidación en membranas plasmáticas como índice de daño y su posible correlación con la proliferación celular
- Determinar la actividad de la enzima 5'-nucleotidasa como marcador de la fluidez de la membrana plasmática

- Cuantificar la actividad de la enzima timidín-cinasa como marcador de proliferación celular
- Determinar el efecto del lansoprazole en el metabolismo oxidativo de la glucosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

MODELO ANIMAL. Se utilizaron ratas Wistar machos con un peso entre 230 y 270 gr las cuales fueron alimentadas con dieta normal y agua. Se sometieron a un ayuno nocturno con libre acceso al agua. Para inducir la gastritis, se administró 1 ml de etanol al 50% intragástricamente. Las ratas tuvieron libre acceso a comida y agua (control) o etanol al 5% (gastritis) durante 5 días.

El grupo de animales con gastritis se dividió en dos: a un subgrupo se le administró lansoprazole (0.3 mg/kg de peso) intragástricamente, una dosis diaria durante uno a 3 días y al otro se le dejó recuperar espontáneamente.

El grupo control, aquellos que no se trataron con etanol, también se dividió en dos, a uno de estos grupos se les administró lansoprazole en el mismo horario y dosis que el grupo de gastritis. El otro subgrupo no recibió ningún tratamiento.

Al final del tratamiento, los animales se sacrificaron por decapitación, bajo anestesia con pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso).

HISTOLOGÍA Los estómagos se removieron, se abrieron a lo largo de la curvatura menor y se lavaron con solución salina. Se cortaron tiras de la pared gástrica a lo largo de la mucosa glandular. Éstas se fijaron en formaldehído al 10% y se evaluaron por microscopía de luz después de una tinción con hematoxilina y eosina (HE).

OBTENCIÓN DE MUESTRAS Se removió el estómago, se extrajo la mucosa y se homogeneizó en un buffer de sacarosa 0.25 M - Tris 10 mM a un pH de 7.5. Las membranas plasmáticas se obtuvieron por centrifugación diferencial por el método descrito por Loten y Redshaw-Loten (1986). El

- Cuantificar la actividad de la enzima timidín-cinasa como marcador de proliferación celular
- Determinar el efecto del lansoprazole en el metabolismo oxidativo de la glucosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

MODELO ANIMAL. Se utilizaron ratas Wistar machos con un peso entre 230 y 270 gr las cuales fueron alimentadas con dieta normal y agua. Se sometieron a un ayuno nocturno con libre acceso al agua. Para inducir la gastritis, se administró 1 ml de etanol al 50% intragástricamente. Las ratas tuvieron libre acceso a comida y agua (control) o etanol al 5% (gastritis) durante 5 días.

El grupo de animales con gastritis se dividió en dos: a un subgrupo se le administró lansoprazole (0.3 mg/kg de peso) intragástricamente, una dosis diaria durante uno a 3 días y al otro se le dejó recuperar espontáneamente.

El grupo control, aquellos que no se trataron con etanol, también se dividió en dos, a uno de estos grupos se les administró lansoprazole en el mismo horario y dosis que el grupo de gastritis. El otro subgrupo no recibió ningún tratamiento.

Al final del tratamiento, los animales se sacrificaron por decapitación, bajo anestesia con pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso).

HISTOLOGÍA Los estómagos se removieron, se abrieron a lo largo de la curvatura menor y se lavaron con solución salina. Se cortaron tiras de la pared gástrica a lo largo de la mucosa glandular. Éstas se fijaron en formaldehído al 10% y se evaluaron por microscopía de luz después de una tinción con hematoxilina y eosina (HE).

OBTENCIÓN DE MUESTRAS Se removió el estómago, se extrajo la mucosa y se homogeneizó en un buffer de sacarosa 0.25 M - Tris 10 mM a un pH de 7.5. Las membranas plasmáticas se obtuvieron por centrifugación diferencial por el método descrito por Loten y Redshaw-Loten (1986). El

homogenado se centrifugó a 1,500 g a 4°C, el precipitado resultante se resuspendió en el mismo buffer y se añadió Percoll y sacarosa 2 M, entonces se centrifugó a 12,500 g durante 25 min., las membranas plasmáticas se recolectaron de la fase intermedia y se centrifugaron otra vez a 15,500 g con cloruro de calcio y Percoll, por 25 min. a 4°C las membranas plasmáticas se recolectaron de la fase intermedia para su caracterización lipídica

El sobrenadante obtenido de la centrifugación a 1,500 g, se centrifugó a 8 500 g durante 15 min. y a 100,000 g durante 60 min para obtener fracción citosólica para determinar la actividad de timidín-cinasa (Hernández-Muñoz y Montiel-Ruiz, 1996).

En otra serie de animales se obtuvo la mucosa gástrica completa y se hicieron trozos finos (2mm) con una rebanadora automática, para estudiar el metabolismo oxidativo de la glucosa.

CARACTERIZACIÓN LIPÍDICA. A partir de las muestras de membrana plasmática se hizo un extracto de lípidos totales con cloroformo/metanol (2:1 v/v), el extracto se filtró a través de papel filtro y, se descartó la fase acuosa. Los lípidos contenidos en la fase clorofórmica se aplicaron a cromatografía de capa fina con sílica y se corrieron en una fase móvil (130 ml de cloroformo, 70 ml de emtanol, 5 ml de hidróxido de amonio, 5 ml agua destilada) para separar los fosfolípidos

Las especies de fosfolípidos se revelaron por exposición a vapores de yodo; cada fosfolípido se identificó por su RF y se cuantificó por su contenido de fósforo a 820 nm de acuerdo al método de García-Sainz y Fain (1980).

En otra alícuota del extracto clorofórmico, se determinó el colesterol total por un método colorimétrico de acuerdo a lo descrito por Hernández-Muñoz y Montiel-Ruiz, (1996)

ACTIVIDAD DE 5'-NUCLEOTIDASA (5'NT, EC 3 1 3 5) Se determinó por medio de un kit de Sigma, el cual mide por espectrofotometría la formación de NAD generado proporcionalmente a la formación de adenosina proveniente de la hidrólisis de AMP por la 5'-nucleotidasa. La 5'-nucleotidasa hidrolisa el AMP

y forma adenosina y fósforo inorgánico, la adenosina se desamina por la adenosin-desaminasa y se produce inosina y amonio, este último reacciona con 2-oxoglutarato en presencia de NADH y forma glutamato y NAD. El NAD producido es proporcional a la actividad de la enzima

CUANTIFICACIÓN DE TIMIDIN-CINASA (EC 2.7.1.21) Se tomaron alícuotas de la fracción citosólica y se colocaron en una mezcla de reacción que contiene 220 μ l de buffer tris 1M pH 8.0, 110 μ l de MgCl₂ 0.2M, 110 μ l de EDTA, 220 μ l de ATP, 5 μ l de timidina y 50 μ l de [³H]-timidina. Se incubaron durante una hora a 37°C. La reacción se detuvo colocando la mezcla de incubación en agua hirviendo durante 2 minutos, se centrifugó y a partir del sobrenadante se cuantificó la timidina fosforilada, colocando 0.020 ml en filtro de DEAE-celulosa, el cual se lavó con formiato de amonio, agua destilada y etanol y, se midió la radioactividad, a partir de este dato se calculó la actividad enzimática (Sauer y Wilmanns, 1985).

LIPOPEROXIDACIÓN. La cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) generadas por la lipoperoxidación se cuantificó por la reacción del ácido tiobarbitúrico (Buege y Aust, 1978), con las modificaciones reportadas por Hernández-Muñoz, et al (1984).

ESTUDIO DEL METABOLISMO OXIDATIVO. Se hizo un seguimiento de la oxidación de glucosa midiendo el ¹⁴CO₂ producido a partir de glucosa uniformemente marcada [U-¹⁴C]-glucosa) y de [1-¹⁴C]-glucosa. Se obtuvieron fragmentos de mucosa gástrica, se colocaron en un medio de incubación (NaCl 133 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, Na₂HPO₄ 1 mM), con glucosa radiactiva, se oxigenó el medio con 95% de O₂ y 5% de CO₂ y se incubó a 36°C durante 90 min. La reacción se detuvo con ácido perclórico al 6% y el CO₂ desprendido se atrapó en un tubo plástico con KOH al 10%, éste, se transfirió a un vial con tritosol para contar la radioactividad (Sernka y Harris, 1972, Hernández y Chacin, 1994).

RESULTADOS

En la evaluación histológica (Tabla 1) se observó que, el daño producido en el epitelio superficial de la mucosa gástrica de animales tratados con etanol se empezó a reducir desde las 24 horas de haber retirado el etanol, y que un marcado infiltrado de leucocitos polimorfonucleares (PMN) se mantuvo durante el tiempo de estudio. La administración de lansoprazole a animales que recibieron etanol redujo de manera considerable el infiltrado de PMN y el daño superficial desde tiempos tempranos

TABLA 1.

INCIDENCIA DE LESIÓN MICROSCÓPICA EN ESTÓMAGOS DE RATAS QUE RECIBIERON ETANOL Y LANSOPRAZOLE

TRATAMIENTO	TIEMPO	DAÑO AL EPITELIO SUPERFICIAL	INFILTRADO DE PMN
Control		-	-
Gastritis	To	+++	+++
	24 hrs	++	+++
	48 hrs	++	+++
	72 hrs	+	+++
Control + Lansoprazole	24 hrs	-	-
	48 hrs	+	-
	72 hrs	-	-
Gastritis + Lansoprazole	24 hrs	+	+
	48 hrs	-	++
	72 hrs	-	+

El grupo control corresponde a animales sanos. El grado de daño se clasifica como (-) ausente, (+) ligero, (++) moderado, (+++) elevado

Las membranas plasmáticas juegan un papel importante en la regulación metabólica y sobrevivencia de las células. Se sabe que el etanol tiene efecto sobre la composición de las membranas, altera la organización fosfolípida de

la superficie y aumenta el nivel de colesterol, lo que puede ocasionar cambios en la fluidez de la membrana.

En la tabla 2 se observa que se presentaron algunos cambios significativos en la composición fosfolipídica de las membranas plasmáticas de la mucosa gástrica de rata: A las 48 horas posteriores al término de la inducción de la gastritis, se presentó una disminución de FC y un aumento de FE, que reflejaron una disminución significativa en la relación FC/FE. A las 72 horas de haber retirado el etanol, se presentó un aumento significativo de FC. Sin embargo, los otros fosfolípidos y la relación FC/FE se encontraron en niveles normales.

TABLA 2.

COMPOSICIÓN FOSFOLIPÍDICA DE LAS MEMBRANAS DE MUCOSA DE ANIMALES CON GASTRITIS Y TRATADOS CON LANSOPRAZOLE

GRUPO	TIEMPO	Fosfolípidos (nmol/mg de proteína)				
		FC	FE	FI	FS	FC/FE
Control		132±16	128±14	155±18	109±14	1.16 ± 0.16
Gastritis	24 hrs.	147±24	136±17	145±27	83±13	1.08 ± 0.18
	48 hrs.	99± 9	197±36	164± 9	117±16	0.52 ± 0.09*
	72 hrs.	209±30*	143± 5	132±13	120±25	1.46 ± 0.20
Control + Lansoprazole	24 hrs.	110± 8	140±14	110±15*	111±11	0.78 ± 0.07
	48 hrs.	121±12	128±15	154±11	104±16	0.94 ± 0.11
	72 hrs.	341±67*	130±22	132± 7	142± 8	2.62 ± 0.51*
Gastritis + Lansoprazole	24 hrs.	140±27	140±23	104±15*	104±20	1.00 ± 0.19
	48 hrs.	99±13	152±12	170±15	119±15	0.65 ± 0.08*
	72 hrs.	234±31*	87±29**	157±30	123±25	2.68 ± 0.52*

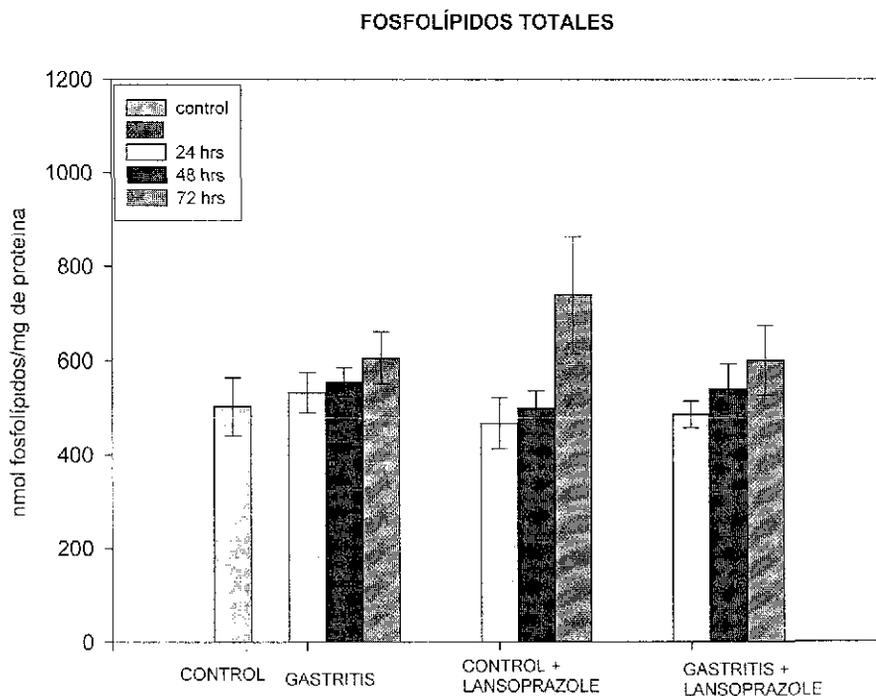
FC-fosfatidilcolina, FE-fosfatidiletanolamina, FI-fosfatidilinositol, FS-fosfatidilserina
Significancia estadística * $P < 0.05$ vs Control, $p < 0.05$ vs gastritis

Los animales que recibieron etanol y lansoprazole presentaron una disminución significativa de FI a las 24 horas; a las 48 horas se presentó una disminución aparente en FC que afectó a la relación FC/FE la cual se vio

disminuida de manera significativa. Sin embargo, a las 72 horas se presentó un aumento significativo de FC y una disminución de FE, por lo que la relación FC/FE aumentó.

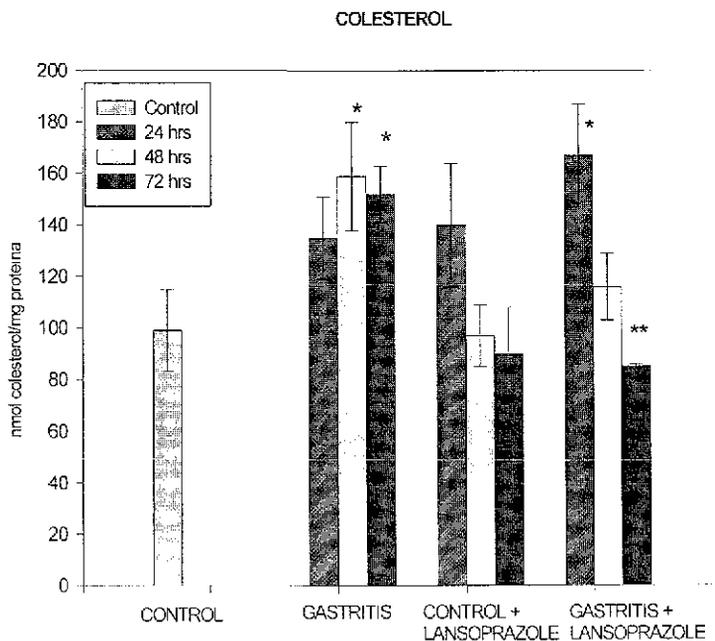
Los animales control que recibieron lansoprazole presentaron una disminución de FI a tiempos tempranos, acompañada de una ligera disminución de FC; estas alteraciones se vieron normalizadas a las 48 horas. Sin embargo, a las 72 horas también se presentó una elevación significativa en el nivel de FC y en la relación FC/FE.

A pesar de los efectos en la distribución de los fosfolípidos de membrana durante los tratamientos, ninguno de ellos modificó de manera significativa la cantidad de fosfolípidos totales de la membrana plasmática (Graf 1)



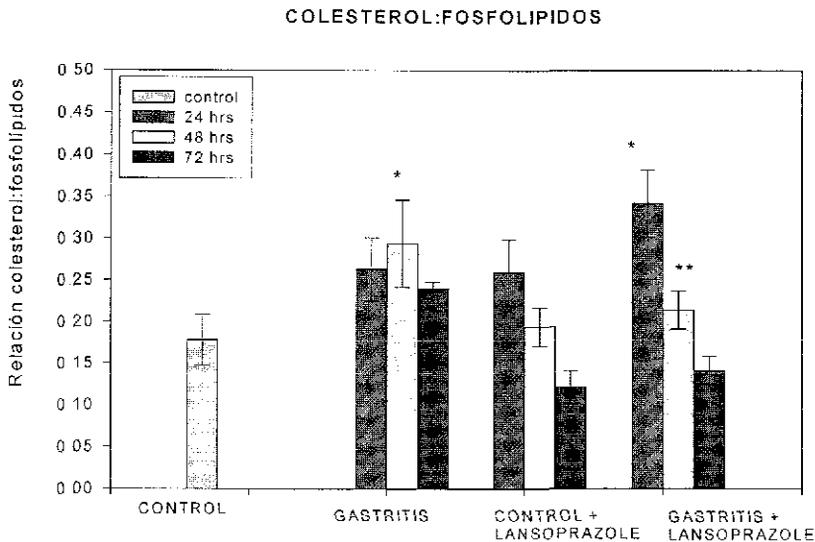
Graf 1 - Fosfolípidos totales de membrana plasmática de mucosa gástrica dañada con etanol y tratada con lansoprazole. Las ratas control muestran un valor de 503 ± 62 . Significancia estadística: * $p < 0.05$

El aumento en los niveles de colesterol se relaciona con la disminución de la fluidez de las membranas plasmáticas. En este estudio se presentaron cambios significativos como respuesta al daño de la mucosa gástrica (Graf. 2). En el grupo con gastritis hubo un incremento temprano en el nivel de colesterol, el cual fue significativo a partir de las 48 horas y se mantuvo durante el tiempo de estudio (72 hrs). El grupo de animales con gastritis tratada con lansoprazole, presentó a tiempos tempranos un aumento significativo de colesterol en la membrana plasmática, el cual se redujo a partir de las 48 horas. La administración de lansoprazole a los animales sanos no produjo cambios significativos en el nivel de colesterol.



Graf. 2 - Niveles de colesterol en membranas plasmáticas de mucosa gástrica de ratas con gastritis y tratadas con lansoprazole. El valor control es de 99 ± 16 . Significancia estadística: * $p < 0.05$ vs control, **vs gastritis.

Como consecuencia de los efectos descritos anteriormente, un parámetro importante de la fluidez de membrana como la relación colesterol fosfolípidos, también presentó alteraciones (Graf. 3). Las membranas plasmáticas de los animales que recibieron etanol, presentaron un incremento en esta relación desde tiempos tempranos, hasta las 72 horas. El tratamiento con lansoprazole mostró un aumento significativo a las 24 hrs. Sin embargo este efecto ya no se observó a las 48 horas de haber administrado el lansoprazole. Los animales sanos que recibieron lansoprazole no presentaron cambios significativos en la relación colesterol.fosfolípidos.



Graf 3 - Relación colesterol/fosfolípidos de membranas plasmáticas de mucosa gástrica de ratas dañada con etanol y tratada con lansoprazole. La relación del control es de 0.178 ± 0.031 . Significancia estadística: * $p < 0.05$ vs control y ** $p < 0.05$ vs gastritis

Los efectos de la administración de etanol y de lansoprazole, también fueron evidentes sobre la actividad de la enzima 5'-nucleotidasa, una enzima que responde a los cambios del microambiente lipídico de la membrana plasmática disminuyendo su actividad conforme la fluidez de la membrana

disminuye. Sin embargo, esta enzima también puede disminuir su actividad cuando la membrana es demasiado flexible. En la tabla 3 puede observarse que esta enzima presentó una reducción significativa de su actividad en animales con gastritis desde las 24 hrs, y se normalizó a las 72 hrs después de haber retirado el etanol. Con el tratamiento con lansoprazole se presentó un pico de actividad a las 48 horas y éste se reduce a valores normales a las 72 hrs. Sin embargo, los animales sanos que recibieron lansoprazole a las 48 hrs de tratamiento, presentaron una reducción significativa de la actividad de la enzima.

Los radicales libres son capaces de producir modificaciones químicas de proteínas y lípidos a través de la lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados; pueden dañar a las células al modificar los componentes o las actividades de algunas enzimas de membrana y alterar su estructura y función, así como los procesos de transporte (Slater, 1984).

TABLA 3

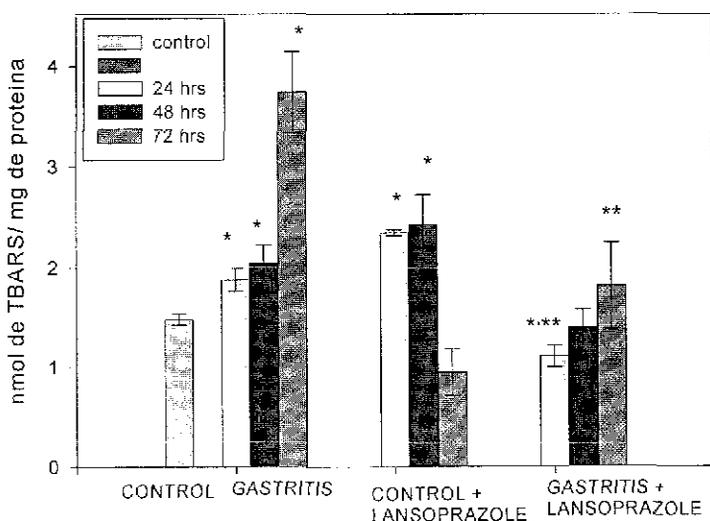
ACTIVIDAD DE LA ENZIMA 5'-NUCLEOTIDASA DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE MUCOSA GÁSTRICA DE RATA		
GRUPO	TIEMPO	(nmol/mg de proteína)
Control		75± 2
Gastritis	24 hrs.	60± 5*
	48 hrs	39± 3*
	72 hrs	77±11
Control + Lansoprazole	24 hrs	60±12
	48 hrs	37± 7*
	72 hrs	71± 4
Gastritis + Lansoprazole	24 hrs	56± 9
	48 hrs	152± 10* **
	72 hrs	71± 8

Significancia estadística. * $P < 0.05$ vs Control y ** $P < 0.05$ vs Gastritis

El nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS) (Graf. 4) se alteró significativamente con la administración de etanol, incrementándose gradualmente desde las 24 horas posteriores al retiro del etanol, alcanzando un pico máximo a las 72 horas. La administración de lansoprazole cambió el perfil de los niveles de TBARS, en una mucosa dañada. El nivel de lipoperoxidación se vio disminuido a las 24 horas, alcanzando valores normales a las 48 horas.

Los animales a los que no se les trató con etanol y que recibieron el lansoprazole, presentaron un aumento en el nivel de lipoperoxidación que se mantuvo durante las primeras 48 horas, y se normalizó a las 72 horas.

LIPOPEROXIDACION



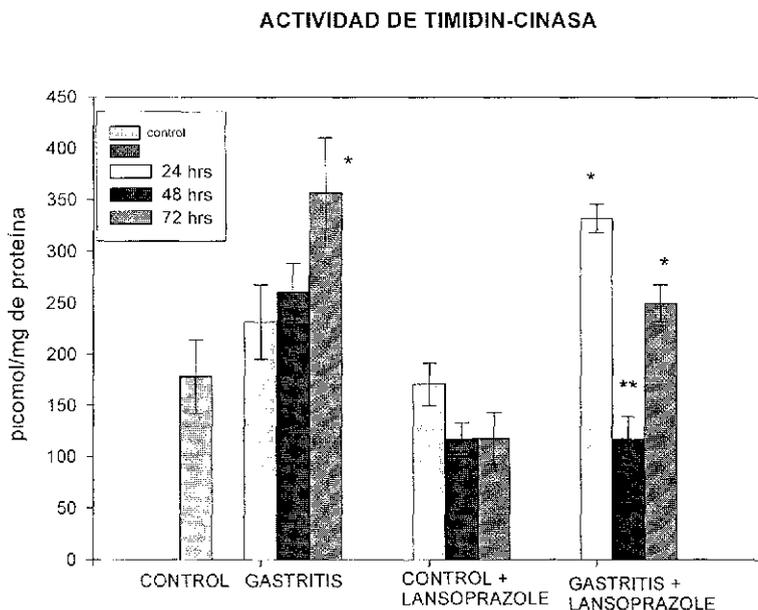
Graf 4.- Proporción de lipoperoxidación en mucosa gástrica de rata, con daño inducido por etanol y tratadas con lansoprazole.

El valor del control es de 1.48 ± 0.055

Significancia estadística $p < 0.05$. *vs control y **vs gastritis

Para estimar el índice proliferativo en la mucosa gástrica dañada, su recuperación, y el efecto del lansoprazole sobre este índice, se midió la actividad de timidín-cinasa (TK) en la fracción citosólica de los grupos

experimentales (Graf. 5) La timidín-cinasa es una enzima citosólica determinante en la síntesis de DNA y considerada como un marcador confiable de proliferación celular



Graf 5 - Actividad de timidín-cinasa en la mucosa gástrica de ratas durante la inducción de daño, periodo de recuperación y tratamiento con lansoprazole. El valor del control es de 178 ± 36 . Significancia estadística * $P < 0.05$ vs control ** $P < 0.05$ vs gastritis

A las 24 horas de discontinuar el etanol, la actividad de TK se incrementó progresivamente en animales con daño a la mucosa gástrica, con un pico máximo a las 72 horas. El tratamiento con lansoprazole modificó la actividad de TK, promoviendo una respuesta de proliferación celular más temprana (24 hrs.) que en los animales de recuperación espontánea. Éste efecto se normalizó a las 48 horas y se presentó un segundo aumento a las 72 horas, aunque de menor magnitud que en los animales sin tratamiento con lansoprazole

El lansoprazole por sí mismo no tuvo efecto significativo sobre la actividad de TK en animales sanos

El aumento en la proporción de lipoperoxidación coincide con la actividad máxima de TK de la mucosa gástrica dañada, este efecto fue modificado con el tratamiento con lansoprazole.

Durante la fase de recuperación, en la mucosa gástrica dañada la oxidación total de glucosa ([U-¹⁴C] glucosa) aumentó significativamente desde las 24 horas de haber retirado el etanol (Tabla 4), aumento que se normalizó a las 72 horas.

TABLA 4.

METABOLISMO DE GLUCOSA				
GRUPO	TIEMPO	GLUCOSA		
		[1- ¹⁴ C]	[U- ¹⁴ C]	[1- ¹⁴ C] / [U- ¹⁴ C]
(nmol de CO ₂ /mg de proteína)				
Control		53 ± 8	55 ± 6	0.96 ± 0.12
Gastritis	24 hrs	73 ± 6*	73 ± 8*	1.00 ± 0.09
	48 hrs	64 ± 7	98 ± 13*	0.65 ± 0.08*
	72 hrs	51 ± 8	45 ± 4	1.13 ± 0.14
Control + Lansoprazole	24 hrs	66 ± 6	108 ± 8*	0.61 ± 0.05*
	48 hrs	63 ± 9	55 ± 6	1.15 ± 0.14
	72 hrs	28 ± 5*	45 ± 6	0.62 ± 0.09*
Gastritis + Lansoprazole	24 hrs	69 ± 8	110 ± 16***	0.63 ± 0.08***
	48 hrs	59 ± 11	56 ± 8**	1.05 ± 0.17
	72 hrs	42 ± 7	22 ± 5***	1.91 ± 0.38***

*Oxidación de glucosa marcada por la mucosa gástrica de animales con daño gástrico
Y tratados con lansoprazole. Significancia estadística: *^aP<0.05 vs control;
**P<0.05 vs. Gastritis*

El tratamiento con lansoprazole presentó un aumento significativo en el metabolismo de [U-¹⁴C] glucosa a las 24 horas, el cual se normalizó más tempranamente que en una mucosa gástrica dañada de recuperación

espontánea y disminuyó de manera importante a las 72 horas de haber retirado el etanol

En animales sanos que recibieron lansoprazole el metabolismo de $[U-^{14}C]$ glucosa se incrementó significativamente a tiempos tempranos, y se normalizó a las 48 horas.

El metabolismo de $[1-^{14}C]$ glucosa presentó un aumento significativo a tiempos tempranos en la mucosa gástrica de recuperación espontánea. Mientras que el tratamiento con lansoprazole no modificó este parámetro. En animales sanos el lansoprazole produjo una disminución de $[1-^{14}C]$ glucosa a las 72 horas.

De acuerdo con lo publicado por Sernka y Harris (1972) la actividad de la vía de las pentosas determinada por la relación $[1-^{14}C]$ glucosa/ $[U-^{14}C]$ glucosa, empieza a ser mayor de uno y por lo tanto empieza a estar activa a las 72 horas de haber retirado el etanol

El tratamiento con lansoprazole produjo a tiempos tempranos una disminución importante en la relación $[1-^{14}C]$ glucosa/ $[U-^{14}C]$ glucosa, producida por el aumento significativo en la $[U-^{14}C]$ glucosa, sin embargo a partir de las 48 horas esta relación empezó a subir y alcanzó valores significativos a las 72 horas lo que sugiere que el lansoprazole activa la vía de las pentosas mas temprano y en mayor magnitud que en una recuperación espontánea

DISCUSIÓN

Se han utilizado varios modelos experimentales para inducir un daño en la mucosa gástrica y, aunque los animales experimentales proporcionan una visión limitada de la patología en la mucosa humana, ofrecen buenas oportunidades para evaluar los mecanismos involucrados en el desarrollo y prevención del daño (Mózsik y Jávör, 1988)

La mayoría de los modelos experimentales de daño a la mucosa gástrica producen un daño agudo (shock hemorrágico, altas concentraciones de agentes irritantes como etanol, ácido clorhídrico), donde se presentan lesiones

espontánea y disminuyó de manera importante a las 72 horas de haber retirado el etanol

En animales sanos que recibieron lansoprazole el metabolismo de [U-¹⁴C] glucosa se incrementó significativamente a tiempos tempranos, y se normalizó a las 48 horas.

El metabolismo de [1-¹⁴C] glucosa presentó un aumento significativo a tiempos tempranos en la mucosa gástrica de recuperación espontánea. Mientras que el tratamiento con lansoprazole no modificó este parámetro. En animales sanos el lansoprazole produjo una disminución de [1-¹⁴C] glucosa a las 72 horas.

De acuerdo con lo publicado por Sernka y Harris (1972) la actividad de la vía de las pentosas determinada por la relación [1-¹⁴C] glucosa/[U-¹⁴C] glucosa, empieza a ser mayor de uno y por lo tanto empieza a estar activa a las 72 horas de haber retirado el etanol

El tratamiento con lansoprazole produjo a tiempos tempranos una disminución importante en la relación [1-¹⁴C] glucosa/[U-¹⁴C] glucosa, producida por el aumento significativo en la [U-¹⁴C] glucosa, sin embargo a partir de las 48 horas esta relación empezó a subir y alcanzó valores significativos a las 72 horas lo que sugiere que el lansoprazole activa la vía de las pentosas mas temprano y en mayor magnitud que en una recuperación espontánea

DISCUSIÓN

Se han utilizado varios modelos experimentales para inducir un daño en la mucosa gástrica y, aunque los animales experimentales proporcionan una visión limitada de la patología en la mucosa humana, ofrecen buenas oportunidades para evaluar los mecanismos involucrados en el desarrollo y prevención del daño (Mózsik y Jávör, 1988)

La mayoría de los modelos experimentales de daño a la mucosa gástrica producen un daño agudo (shock hemorrágico, altas concentraciones de agentes irritantes como etanol, ácido clorhídrico), donde se presentan lesiones

hemorrágicas, disminución del grosor de la mucosa gástrica e hiperemia (Mózsik y Jávör, 1988; Ito y Lacy, 1985)

Los estudios sobre las propiedades citoprotectoras de los inhibidores de la bomba de protones se han realizado *in vitro*, antes de la administración del agente nocivo o, en daños agudos. Como consecuencia, no se ha estudiado la reversión de un tejido dañado en un modelo crónico.

En este trabajo se pretendió observar las propiedades del lansoprazole sobre las alteraciones encontradas en la membrana plasmática, y en el metabolismo oxidativo de la mucosa gástrica en animales con gastritis inducida por alcohol, en un modelo que simula una gastritis activa, tal como la encontrada en el humano y para validar sus efectos bioquímicos.

La concentración de etanol utilizada es suficiente para producir un daño gástrico sin llegar a producir una úlcera, pero con una recuperación no muy rápida.

Hernández-Muñoz y Montiel-Ruiz (1996) publicaron que en este modelo de gastritis, el perfil histológico presenta ruptura del epitelio superficial y presencia de infiltrado de células inflamatorias, como leucocitos polimorfonucleares. Las alteraciones permanecieron aún a las 72 horas de haber retirado el etanol y todas estas características fueron reproducibles en este estudio.

La administración de lansoprazole a los animales que recibieron etanol indujo un alivio en las anormalidades histológicas de la mucosa gástrica, como la disminución en la degeneración del epitelio superficial y la presencia de infiltrado inflamatorio.

El desarrollo de la gastritis se caracteriza por una alteración en la composición lipídica de la mucosa gástrica la cual puede cambiar con diferentes etiologías. Nardone, et al. (1994) reportaron que en una gastritis en humanos se disminuye el nivel de FE y de FI, y se eleva la FC, y que en una infección con *H. pylori*, disminuyen FE y FC. Mosnier, et al., (1993) reportaron que la administración de etanol a ratas aumenta el nivel de FE en estómagos ulcerosos; sin embargo, Slomiany, et al., (1975) habían reportado que los estómagos ulcerosos de rata presentan una disminución de FE. Hernández-

Muñoz y Montiel-Ruiz (1996) reportaron un modelo de gastritis alcohólica en ratas con un aumento en el nivel de FE y de FS y una disminución en FI y FC.

En el presente estudio, las membranas plasmáticas aisladas de la mucosa gástrica de ratas a las que se les administró etanol, no presentaron cambios significativos en la determinación de fosfolípidos individuales a tiempos tempranos, sin embargo, se puede observar un aumento en el nivel de FE (48 horas) que indica que hay una disminución en la fluidez de la membrana, ya que se considera que FE es un fosfolípido que favorece la rigidez de la membrana y se ha reportado que el etanol induce el aumento de este fosfolípido (Mosnier, et al., 1993), esto se refleja en la disminución de la relación FC/FE. Estos datos coinciden con los reportados por Hernández-Muñoz y Montiel-Ruiz (1996).

Una menor elevación de FE, y por lo tanto un aumento en la relación FC/FE (48 horas) en los animales que recibieron lansoprazole, sugiere que este IBP incrementa la fluidez de la membrana que se ve disminuida con el daño gástrico. Este efecto del lansoprazole también se observa en los animales sanos.

El colesterol está localizado preferentemente en la membrana plasmática; de hecho, la rigidez de esta membrana se incrementa cuando el contenido de colesterol aumenta (Voelker, 1991). Se ha reportado que el daño a la mucosa gástrica produce un aumento en el nivel de colesterol de las membranas plasmáticas y de la relación colesterol: fosfolípidos. Esta relación también afecta la fluidez de las membranas y se incrementa cuando la permeabilidad membranal está alterada (Hernández-Muñoz y Montiel-Ruiz, 1996; Slomiany, et al., 1975).

La disminución en la relación FC/FE producida por el etanol coincide con un aumento en el nivel de colesterol y en la relación colesterol:fosfolípidos, lo que sugiere un aumento en la rigidez de las membranas plasmáticas.

A pesar de que el lansoprazole presenta un aumento en el nivel de colesterol a tiempos tempranos éste se revierte desde las 48 horas, efecto que también se ve reflejado en la relación colesterol:fosfolípidos y en un aumento progresivo de la relación FC/FE, lo que sugiere que el compuesto es capaz de

corregir las alteraciones producidas en la composición lipídica de las membranas plasmáticas.

La administración de lansoprazole a animales sanos no produjo cambios importantes en el nivel de colesterol ni en la relación colesterol:fosfolípidos.

La enzima 5'-nucleotidasa se localiza principalmente del lado externo de la membrana plasmática y se ha utilizado como marcadora de ésta (Thompson, et al., 1987). La actividad de esta enzima puede estimularse cuando aumenta la fluidez de la bicapa, y este aumento en la actividad puede deberse a un incremento en la flexibilidad conformacional de la enzima. Sin embargo, la 5'-nucleotidasa también requiere de una rigidez mínima de la membrana plasmática, por lo que, si se continúa el incremento en la fluidez de la membrana, se induce una inhibición progresiva de la actividad enzimática (Gordon, et al. 1980).

La actividad de la 5'-nucleotidasa depende de fosfolípidos específicos como Fl, el cual parece intervenir en la unión de la enzima a la membrana plasmática (Merisko, et al., 1981; Thompson, et al., 1987). La actividad de esta enzima también se ve disminuida por el aumento en el nivel de colesterol (Daveloose, et al., 1993, Hernández-Muñoz y Montiel Ruiz, 1996).

En este estudio se observó que la actividad de la enzima se redujo en animales con gastritis y se normalizó a tiempos tardíos. La disminución significativa de la actividad, coincide con un aumento en otros parámetros de fluidez como la relación colesterol:fosfolípidos.

Los animales a los que se les administró etanol y lansoprazole, presentaron un pico de actividad a las 48 horas, significativo contra los animales con gastritis y contra los controles, este comportamiento es similar al de la ranitidina, reportado por Hernández-Muñoz y Montiel-Ruiz (1996) y coincide con una reducción en la relación colesterol:fosfolípidos.

Se considera que la lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados es una característica de daño celular, y puede ocurrir por una sobreproducción de radicales libres o por la deficiencia de los mecanismos de defensa (glutatión, superóxido dismutasa, etc.) (Slater, 1984; Aguilar-Delfín, et al., 1996.)

Se ha reportado que los radicales libres de oxígeno están involucrados en el daño a la mucosa gástrica (Pihan, et al., 1987). Aunque el mecanismo exacto de formación de radicales libres todavía no se conoce, los radicales superóxido e hidroxilo intervienen en la etapa inicial del desarrollo del daño gástrico inducido por etanol (Szelenyi Y Brune, 1988, Yoshikawa, et al , 1997).

Hernández- Muñoz, et al., (2000) reportaron que durante el daño crónico con etanol, los parámetros indicativos de estrés oxidativo (TBARS) se incrementan de manera importante, lo que sugiere que el estrés oxidativo toma lugar durante la generación del daño a la mucosa gástrica. Sin embargo, también observaron que la regeneración del epitelio superficial que ocurre al retirar el etanol, se acompaña por un aumento en la lipoperoxidación de las membranas plasmáticas. Este incremento se asocia con la restauración de la mucosa gástrica dañada debido a que la elevación en los niveles de TBARS coincidió con la actividad máxima de timidín-cinasa, lo que sugiere una relación directa y significativa entre el nivel de lipoperoxidación y la magnitud de proliferación celular. Esta relación se presenta de una manera muy similar a la encontrada en otro modelo de proliferación celular que ocurre durante la regeneración hepática (Hernández-Muñoz, et al , 2000; Aguilar-Delfin, et al ,1996)

En el presente estudio, la administración de etanol aumentó significativamente el nivel de lipoperoxidación desde tiempos tempranos, alcanzando un pico a las 72 horas posteriores al retiro del tratamiento. El aumento en la proporción de lipoperoxidación en animales con gastritis, coincidió con la actividad máxima de TK en la mucosa gástrica, una enzima determinante en la síntesis de DNA y considerada como un marcador de proliferación celular confiable. Estos datos coinciden con lo reportado por Hernández-Muñoz, et al (2000) y, podría sugerir que un nivel de lipoperoxidación inducido en la recuperación de la gastritis favorece la proliferación celular, debido a que, existe evidencia que indica que los radicales de oxígeno pueden actuar como segundos mensajeros para activar factores transcripcionales, y que estos factores de transcripción son activados *in vitro* por productos de la lipoperoxidación (Hernández-Muñoz, et al., 1997).

La administración de lansoprazole a ratas sujetas al daño gástrico, cambió significativamente el perfil de lipoperoxidación al disminuir el nivel de TBARS durante todo el tiempo de estudio (Graf.4) Además de desplazar la elevación de TK hacia las 24 horas de tratamiento, presentando un comportamiento proliferativo similar al de la cimetidina (Hernández-Muñoz, datos no publicados)

La regeneración de las células de la superficie ocurre como resultado de la migración de las células epiteliales de las glándulas gástricas, lo que sugiere que se requiere de la lámina basal no dañada para mejorar la mucosa exitosamente, de aquí se propone que los agentes benéficos no solamente proporcionan protección a la mucosa gástrica sino que también permiten una reconstitución de la misma y pueden presentar diferentes mecanismos para la protección de la mucosa gástrica (Hernandez-Muñoz, et al., 2000).

Los mecanismos propuestos para los efectos de citoprotección atribuidos a algunos otros agentes, incluyen la estimulación de secreción de mucus, secreción alcalina y, síntesis DNA. Esto último, apoya la aseveración de que la proliferación celular es un factor importante en la recuperación del daño gástrico. De hecho las células de la superficie gástrica son de vida corta, con un continuo proceso de restitución para reparar los defectos en el sitio de exfoliación celular (Isenberg, 1985). La inhibición del ácido es un factor importante en el mecanismo de protección del lansoprazole. Sin embargo, podrían estar involucrados otros factores adicionales a los cambios de pH en el mecanismo de acción de este compuesto.

La mucosa gástrica es un tejido que requiere de una elevada actividad metabólica bajo condiciones basales y de estimulación, por lo que necesita de una gran cantidad de energía para mantener sus funciones, especialmente la secreción ácida, actividad dependiente de la ATPasa H^+-K^+ . La oxidación de glucosa ha sido considerado como el sustrato más eficiente para proporcionar esta energía (Fryklund, et al., 1990; Shaw, et al., 1985; Sernka y Harris, 1972).

Se ha demostrado que el daño gástrico inducido a través de un shock hemorrágico o de la exposición del epitelio a etanol al 50% reduce la energía metabólica debido a la reducción de la fosforilación oxidativa que puede estar

relacionada con la hipoxia en el tejido (Menguy, et al.,1974) Debido al alto requerimiento energético de la mucosa gástrica, un déficit de energía inducido por agentes nocivos podría ser responsable de su efecto. Estas alteraciones no son tan severas cuando el daño gástrico se induce con aspirina o con etanol a menores concentraciones. Sin embargo, se ha reportado que en experimentos *in vitro* y en daños agudos se produce una disminución de ATP, lo que sugiere la desviación del metabolismo oxidativo hacia vías sintéticas de precursores de DNA (Vía de las pentosas) más que a la producción de energía (Victor, et al.,1995; Orwell, et al., 1977).

La glucosa se ha considerado el principal sustrato para el metabolismo oxidativo de la mucosa gástrica de rata debido a su eficiencia para mantener la secreción ácida, de hecho, se ha propuesto que la energía producida en la mucosa gástrica se utiliza principalmente para la producción de ácido clorhídrico. De esta manera la oxidación de glucosa se ha considerado como un indicador de actividad secretoria (Sach y Shin, 1995; Fryklund, et al ,1990) y en el presente estudio, la oxidación de [U-¹⁴C] glucosa refleja la generación de ATP para la activación de la ATPasa H⁺-K⁺. Además, se tienen resultados que muestran que la administración subcrónica de etanol, aumenta la secreción ácida determinada por la acumulación de aminopirina (Hernández-Rincón, datos no publicados).

En el presente estudio, el aumento en la oxidación de [U-¹⁴C] glucosa en los animales con daño gástrico parece estar relacionado con un incremento en la demanda de energía metabólica por la actividad de la ATPasa H⁺-K⁺ y el estado de hipersecreción en el que se encuentra la mucosa gástrica

En animales a los que se les administró lansoprazole el nivel de oxidación de [U-¹⁴C] glucosa aumentó significativamente a tiempos tempranos probablemente debido a que la glucosa se esta utilizando para la activación de bombas ATPasa H⁺-K⁺ como respuesta compensatoria a la inhibición con lansoprazole. Este valor se normalizó mas tempranamente que en el grupo que no recibió el IBP. La disminución que se presentó a las 72 horas, se puede atribuir a la inhibición de la secreción ácida a través del bloqueo de la H⁺-K⁺ ATPasa que es más efectivo en un medio ácido generado por el daño gástrico

De aquí que, en el grupo de animales sanos que recibió lansoprazole no se presentó una disminución en el nivel de oxidación tan evidente.

En animales sanos que recibieron lansoprazole el metabolismo de [U-¹⁴C] glucosa presentó un aumento significativo a tiempos tempranos, probablemente debido a que se activan bombas ATPasa H⁺-K⁺ citosólicas como respuesta compensatoria de las bombas inhibidas por el lansoprazole. Conforme va aumentando el número de dosis de lansoprazole, se reduce la secreción ácida y el recambio de las bombas es más lento, probablemente como consecuencia un aumento en el número de bombas bloqueadas por el lansoprazole, por lo que se requiere menos energía para la secreción (Sach y Shin, 1995). Esta posibilidad podría explicar la normalización del metabolismo de glucosa al no requerir ATP para la secreción ácida por la reducción de la conversión del lansoprazole a sus metabolitos activos en un ambiente menos ácido (Barradell, et al , 1992).

El incremento en la vía de las pentosas puede estar relacionado con la restauración del glutatión reducido y con la síntesis de deoxiribonucleótidos para estimular la replicación celular. Debido a que ambos procesos requieren NADPH, esto favorecería el flujo de glucosa hacia la vía de las pentosas. El aumento de esta vía también se ha encontrado en etapas tempranas de fibrosis hepática (Hernández-Muñoz, et al. 1997)

CONCLUSIÓN

En este modelo, la administración de etanol en ratas produce un perfil histológico de gastritis con diferentes alteraciones a nivel de membrana plasmática: disminución de la actividad de 5'-nucleotidasa, aumento en los niveles de colesterol y lipoperoxidación, así como en la relación colesterol:fosfolípidos

Al retirar el agente nocivo, se presenta una fase de recuperación donde se revierten estas alteraciones y, que se acompaña de la regeneración de la superficie del epitelio de la mucosa gástrica y de cambios en el metabolismo oxidativo de glucosa.

El lansoprazole acelera la reversión de las alteraciones producidas en la mucosa gástrica al disminuir el infiltrado inflamatorio desde tiempos tempranos de su administración. Normaliza la relación colesterol:fosfolípidos y la actividad de la enzima 5'-nucleotidasa. También reduce el índice de lipoperoxidación, efecto que correlaciona con la restauración del microambiente lipídico.

El lansoprazole disminuye la oxidación total de glucosa, esto podría atribuirse a la inhibición de la secreción ácida a través del bloqueo de la ATPasa H^+-K^+ .

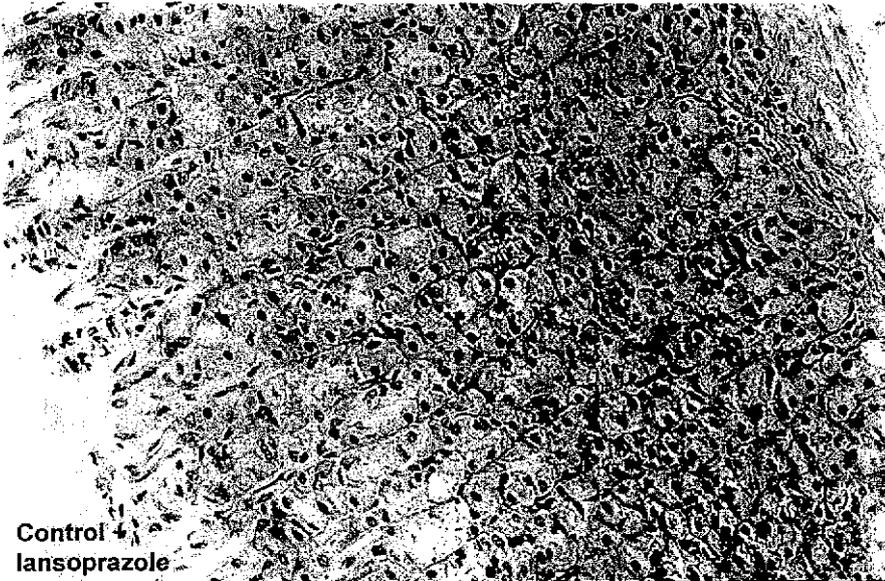
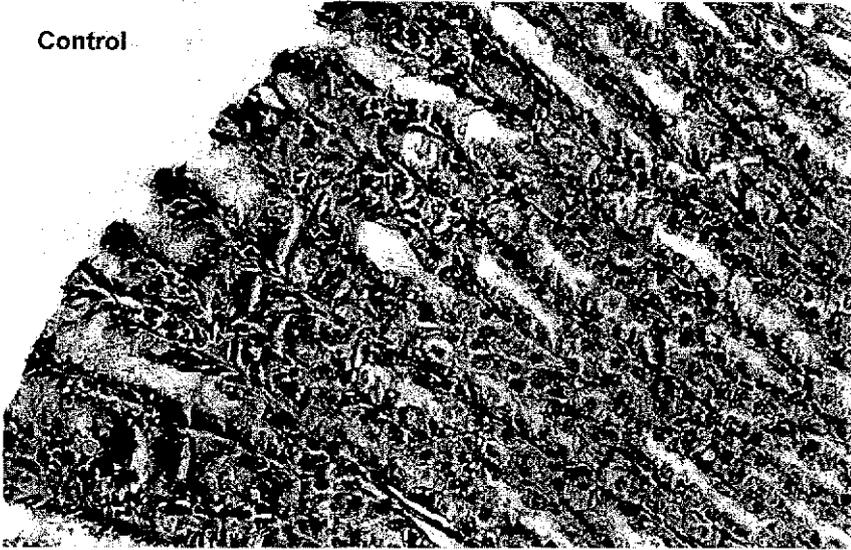
El lansoprazole aumenta la contribución de la vía de las pentosas al metabolismo de glucosa, esto probablemente este relacionado con la restauración de sistemas antioxidantes endógenos y con la proliferación compensatoria del epitelio superficial de la mucosa gástrica.

En conclusión, el lansoprazole, un inhibidor de la bomba de protones, corrige las alteraciones estructurales y funcionales generadas durante la instalación de una gastritis alcohólica. Y su efecto puede estar relacionado con un estímulo de la regeneración de la mucosa gástrica y favorecer al proceso de recuperación del daño gástrico

ANEXO

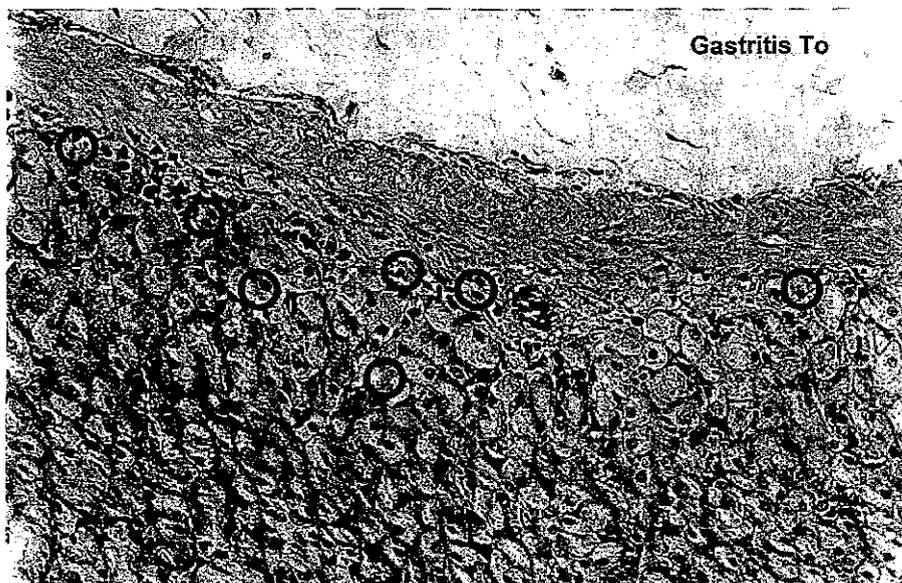
Cortes histológicos de mucosa gástrica de ratas que recibieron etanol y tratadas con lansoprazole

Control

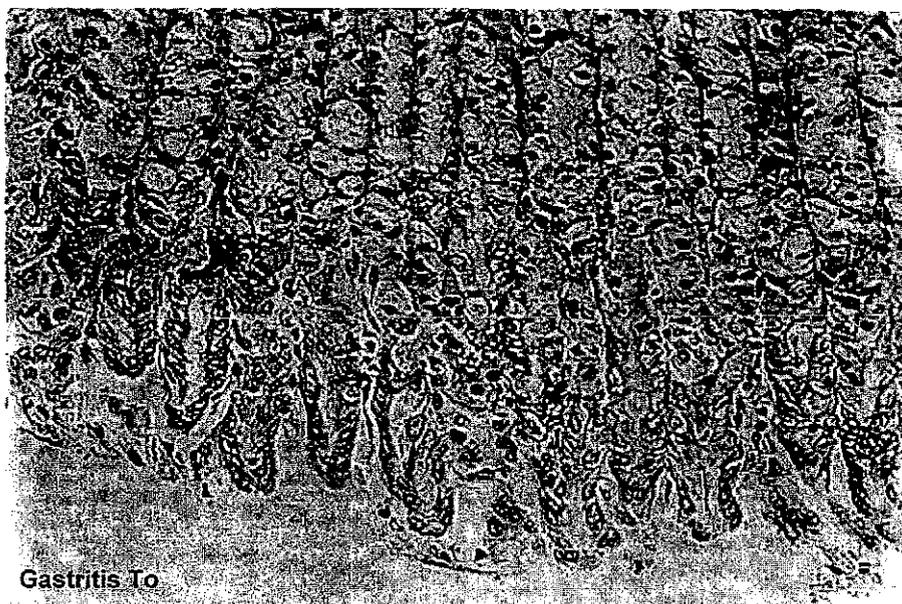


Control +
lansoprazole

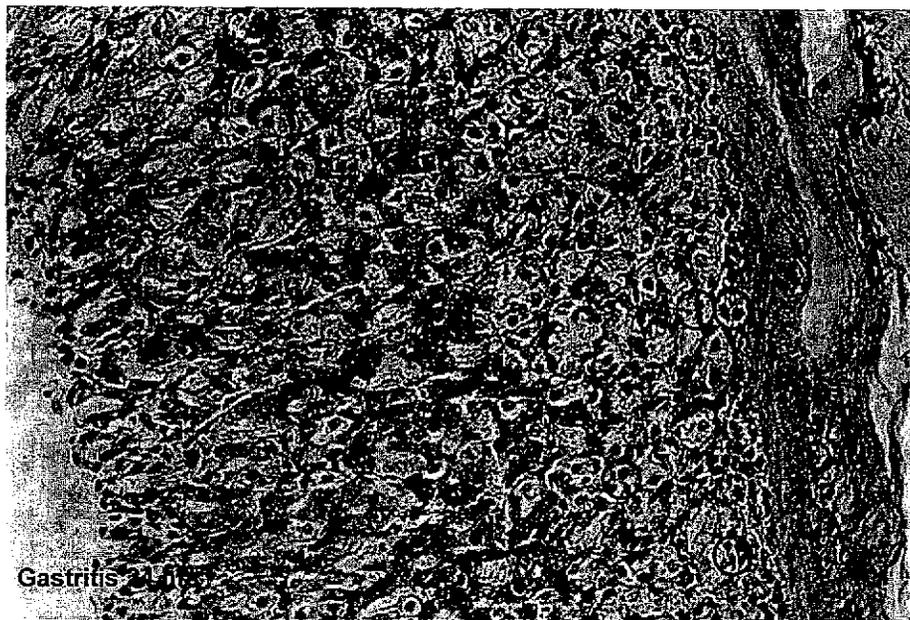
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



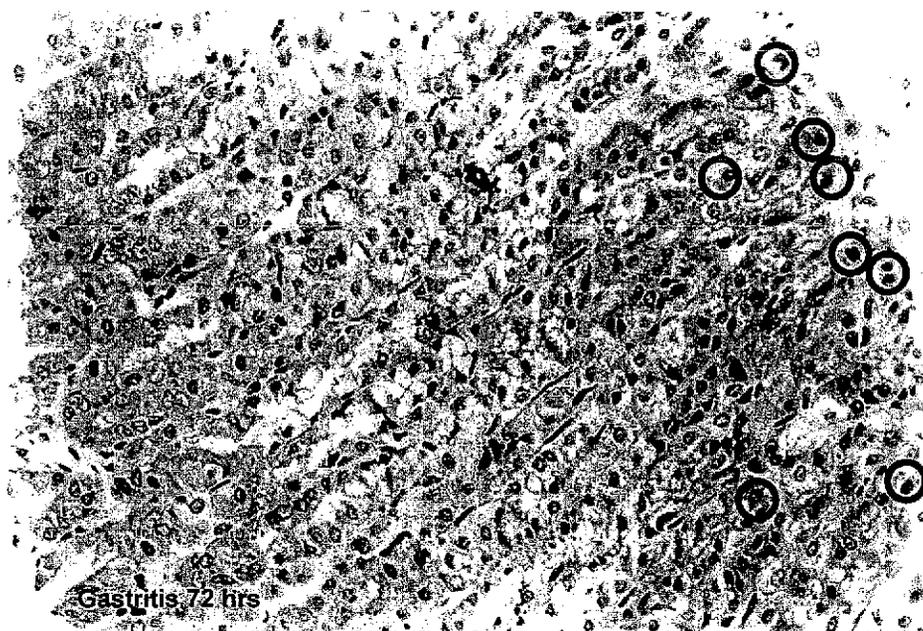
Al retirar el etanol se observa la presencia de infiltrado de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y la ruptura de células superficiales.



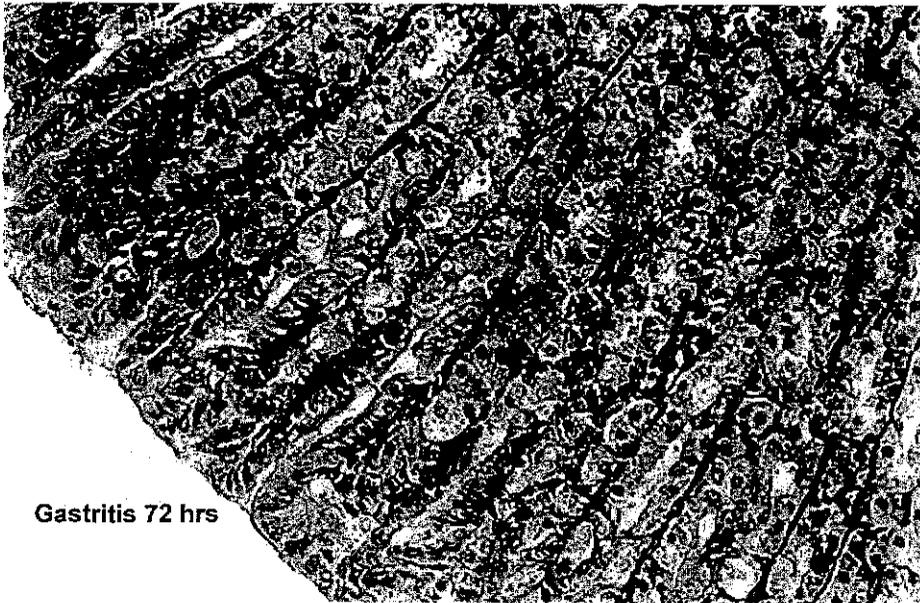
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



A las 24 hrs de retirar el etanol se empieza a ver la restauración del epitelio superficial, sin embargo, a las 72 hrs de recuperación continúa la presencia de PMN.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



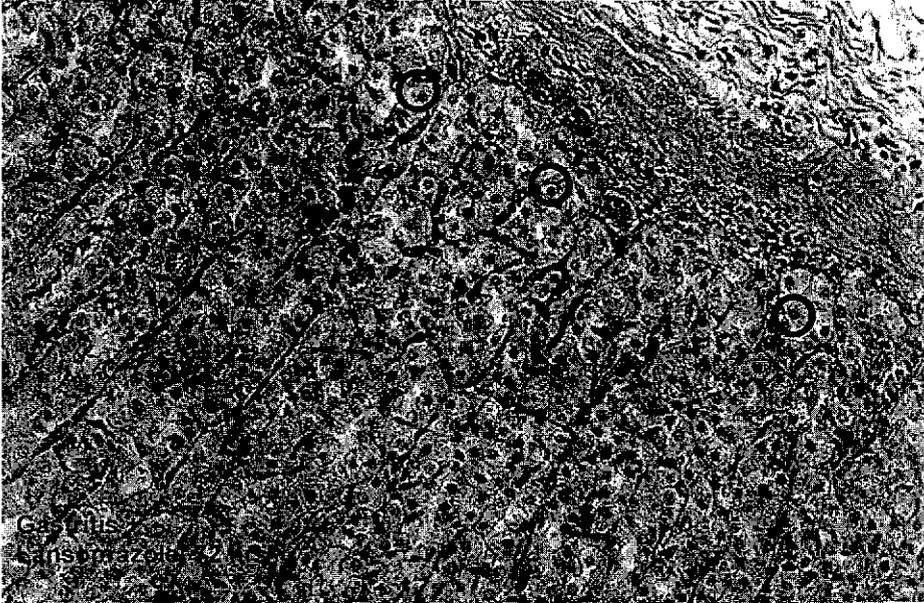
Gastritis 72 hrs

La administración de lansoprazole redujo de manera importante el infiltrado de PMN desde las 24 hrs de tratamiento.



Gastritis
lansoprazole 24 hrs

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



La administración de lansoprazole reduce de manera importante las anomalías histológicas de la mucosa gástrica producidas por etanol y adelanta la recuperación del epitelio superficial

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar-Delfin I., López-Barrera F., Hernández-Muñoz R., 1996, Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration, partial hepatectomy and acute CCl₄ administration, *Hepatology*, 24:657-662
- Allen A., Flemström G., Garner A., Kivilaakso E., 1993, Gastroduodenal mucosal protection, *Physiol. Rev.*, 73(4):823-847
- Barradell L., Faulds D., McTavish D., 1992, Lansoprazole A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its therapeutic efficacy in acid-related disorders, *Drugs*, 44(2):225-250.
- Bergmeyer, 1983, Thymidine kinase, *Meth. Enzym. Anal.*, Vol, 8, 3ra. Ed., Verlag Chemie, Deerfield, Florida, pp. 468-473
- Besancon M., Simon A., Sach G., Shin J., 1997, Sites of reaction of de gastric H, K- ATPasa with extracytoplasmic thiol reagents, *The J. Biol. Chem.*, 272(36) 22438-22446.
- Beuge J., Aust S., 1978, Microsomal lipid peroxidation, *Meth. Enzymol.*, 52: 302-310
- Bulut R., Unlüçerçi Y., Bekpinar S., Kuntsal L., 1999, Nitric oxide- mediated regulation of gastric H, K, ATPasa and alcohol dehydrogenase following ethanol-induced injury in rats, *Dig. Dis. Sci.*, 44(7): 1417-1422
- Burns R., 1996, Fundamentos de Química, Prentice Hall Hispanoamericana, 2^a, ed ,México, pp.613-615
- Daveloose D., Linard a., Arfi T., Viret J., Christon R., 1993, Simultaneous changes in lipid composition, fluidity and enzyme activity in piglet intestinal brush border membrane as affected by dietary polyunsaturated fatty acid deficiency, *Biochim et Biophys. Acta*, 1166:229-237.
- Davison J. S., 1989, Control of gastric secretion, *Gastrointestinal Secretion*, Butterworth & Co., London, Pp 87-101.
- Feldman M., 1995, Suppression of acid secretion in peptic ulcer disease, *J. Clin Gastroenterol.*, 20(supl. 1):S1-S6.
- Fryklund J., Gedda K., Scott D., Sach G., Wallmark B., 1990, Coupling of H⁺-K⁺- ATPasa activity and glucose oxidation in gastric glands, *Am. J. Physiol* 258 (gastrointest. Liver physiol 21) G719-G727.

Fukuda T, Arakawa T, Shimizu Y, Ohtani K, Higuchi K, Kobayashi K, 1995, Effects of lansoprazole on ethanol-induced injury and PG synthetic activity in rat gastric mucosa, *J. Clin Gastroenterol.*, 20 (suppl.2) S5-S7.

García- Saíñz y Fain N., 1980, Effect of insulin, catecholamines and calcium ions on phospholipid metabolism in isolated white fat-cells. *Biochem. J*, 186, 781-789

Gordon L., Sauerheber R., Esgate J, Dipple I., Marchmont R, Houslay M., 1980, The increase in bilayer fluidity of rat liver plasma membranes achieved by the local anesthetic benzyl alcohol affects the activity of intrinsic membrane enzymes, *The J. Biol. Chem.*, 255(10):4519-4527

Hernández I, Chacín J., 1994, Mechanism of Cholinergic stimulation of glucose oxidation in isolated gastric glands, *Am. J. Physiol.* 267 (gastrointes liver.physiol 30) G227-G234

Hernández-Muñoz R., Montiel-Ruiz C., Vázquez-Martínez O., 2000, Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative estrés and lipid peroxidation in ras, *Lab. Invest.*, 80(8) 1161-1169.

Hernández- Muñoz R., Montiel-Ruiz F., 1996, Revertían by histamina H2-receptor antagonistas of plasma membrane alterativos in ethanol-induced gastritis, *Dig. Dis. Sci.*, 41 11, 2156-2165

Hernández-Muñoz R., Díaz-Muñoz M, López V, López-Barrera F., Yáñez L., Vidrio S., Aranda-Fraustro A., Chagoya de Sánchez V, 1997, Balance between oxidative damage and proliferative potential in an experimental rat model of CCl4-induced cirrhosis: protective role of adenosine administration, *Hepatology*, 26:1100-1110.

Hernández-Muñoz R, Glender W Diaz-Muñoz M, García Saíñz JA, Chagoya de Sánchez V, 1984, Effects of adenosine on liver cell damage induce by carbón tetrachloride, *Biochem. Pharmacol*, 33: 2599-2604

Hersey S, Sach G, 1995, Gastric Acid Protection, *Physiol. Rev*, 75 (1): 155-180.

Isenberg J., 1985, Overview of clinical cytoprotection, *Dig. Dis Sci*, 30(11 supl.):81S-82S.

Ito S., Lacy E., 1985, Morphology of rat gastric mucosal damage, defense, and restitution in the presence of luminal ethanol, *Gastroenterology*, 88(1):250-260

Karam S., Leblond C., 1993a, Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach, II Outward migration of pit cells, *The anat record*, 236:280-296.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Karam S., Leblond C., 1993, Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach, III. Inward migration of neck cells followed by progressive transformation into zymogenic cells, *The anat. record*, 236:297-313.

Karam S., 1993, Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach, IV. Bidirectional migration of parietal cells ending in their gradual degeneration and loss, *The anat. record*, 236:314-332.

Kauffman G., 1985, The gastric mucosal barrier, component control, *Dig. Dis. Sci.*, 30(11) suppl.:69S-76S.

Kawano S., Tanumura H., Sato N., Tsuji S., Takei Y., Ogihara T., Nagano K., Fusamoto H., Kamada T., 1992, Effects of proton pump inhibitor on gastric mucosa hemodynamics and tissue oxygenation in anesthetized rats, *Eur. J. Pharmacol.*, 211:55-60.

Komuro Y., Ishii K., Miyake Y., Tanabe S., Oida M., Saigenji K., 1995, Effects of lansoprazole on gastric ulcer healing and mucin content, *J. Clin. Gastroenterol.*, 20(supl 2):S47-S51.

Lambrecht N., Munson K., Vagin O., Sachs G., 2000, Comparison of covalent with reversible inhibitor binding sites of the gastric H,K,-ATPase by site-directed mutagenesis, *The J. Biol. Chem.*, 275(6) 4041-4048.

Lacy E., 1985, Prostaglandins and histological changes in the gastric mucosa, *Dig. Dis. Sci.*, 30(11 suppl.):83S-94S.

Lewis J., Goldenring J., Asher V., Modlin I., 1990, Effects of epidermal growth factor on signal transduction in rabbit parietal cells, *Am. J. Physiol (gastrointes Liver Physiol)*, 258(21):G476-G483

Lichtenberger L., 1999, Gastroduodenal mucosal defense, *Curr. Op Gastroenterol.*, 15 463-472

Lichtengerger L., Graziani L., Dial E., 1983, Role of surface-active phospholipids in gastric cytoprotection, *Science*, 219 1327-1328

Loten E., Redshaw-Loten J., 1986, Preparation of rat liver plasma membranes in high yield *Anal. Biochem.*, 154 183-185

Lugea A., Mourelle M., Guarner F., Domingo A., Salas A., Malagelada J., 1994, Phosphatidylcholines as mediators of adaptive cytoprotection of the rat duodenum, *Gastroenterology*, 107 720-727

Mantle M., 1989, Macromolecular synthesis, storage and secretion, *Gastrointestinal Secretion*, Butterworth & Co, London, Pp 33-65

Menguy R , Desbaillets L., Masters F , 1974, Mechanism of stress ulcer: influence of hypovolemic shock on energy metabolism in the gastric mucosa, *Gastroenterology*, 66 46-55

Merisko E , Ojakian G., widnell C., 1981, The effect of phospholipids on the properties of hepatic 5'-nucleotidase, *The J. Biol. Chem.*, 256(4):1983-1993.

Moghadasian M., Godin D., 1996, Ethanol-induced gastrointestinal damage influence of endogenous antioxidant components and gender, *Dig. Dis. Sci.*, 41 (4):791-797.

Morales González, 2001, Papel de la alcohol deshidrogenasa (ADH) en la farmacocinética del etanol durante la regeneración hepática y los efectos morfológicos y bioquímicos de la administración aguda de etanol, Tesis de Doctorado, México, UNAM, pp 7-15.

Mosnier P , Rayssiguier Y , Motta C., Pelissier E , Bommelaer G., 1993, Effect of ethanol on rat gastric surfactant a fluorescence polarization study, *Gastroenterology*, 104 179-184.

Mózsik G., Jávör T., 1988, A biochemical and pharmacological approach to the genesis of ulcer disease I A model study of ethanol-induced injury to gastric mucosa in rats, *Dig. Dis. Sci.*, 33 (1):92-105.

Munson K, Lambrecht N., Shin J , Sach G., 2000, Analysis of the membrane domain of the gastric H⁺/K⁺-ATPase, *The J. Exp. Biol.*, 203 :161-170

Nardone G., D'Armiento F., Corso G., Coscione P., Esposito M., Budillon G., 1994, Lipids of human gastric mucosa effect of *Helicobacter pylori* infection and nonalcoholic cirrhosis, *Gastroenterology*, 107:362-368.

Oates P , Hakkinen J, 1988, Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats, *Gastroenterology*, 94 10-21.

Orwell R., Piper D., 1977, Krebs cycle, pentose phosphate pathway, and glycolysis in the uninvolved gastric mucosa of peptic ulcer and gastric cancer patients., *Gastroenterology*, 73 1320-1325.

Pai R., Tarnawski A , 1998, Signal transduction cascades triggered by EGF receptor activation, relevance to gastric injury repair and ulcer healing, *Dig. Dis. Sci.*, 43(9):14S-22S

Richardson P , Hawkey C., Stack W , 1998, Proton pump inhibitors, pharmacology and rationale for use in gastrointestinal disorders, *Drugs*, 56(3):307-335

Sach G., Shin J , 1995, The pharmacology of the gastric acid pump.the H⁺,K⁺-ATPase, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35 277-305.

Sauer H., Wilmanns W., 1985, Thymidine kinase, Bergmeyer HU, editor. *Meth. Enzym. Anal.*, Vol 3, Deerfield Beach VCH Publishers, 468-473

Sarau H., Foley J., Moonsammy G., Sach G., 1977, Metabolism of dog gastric mucosa. Levels of glycolytic, citric acid cycle and other intermediates, *The J. Biol. Chem.*, 252 (23) 8572-8581

Schmitz M., Renooij W., 1990, Phospholipids from rat, human, and canine gastric mucosa, composition and metabolism of molecular classes of phosphatidylcholine, *Gastroenterology* 99:1292-1296.

Sernka T., Harris J., 1972, Pentose phosphate shunt and gastric acid secretion in the rat, *Am. J. Physiol.*, 222(1):25-32

Shaw G., Anderson N., Hanson P., 1985, Metabolism and gastric acid secretion, substrate-dependency of aminopyrine accumulation in isolated rat parietal cells, *Biochem. J.*, 227:223-229

Sherley J., Kelly T., 1988, Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle, *The J. Biol. Chem.*, 263(17) 8350-8358.

Slater T., 1984, Free-radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. J.*, 222:1-15.

Slomiany A., Slomiany B., Horowitz M., 1975, Studies on changes in lipid profiles of the rat gastric mucosa with stress ulcers, *Clin. Chim. Acta.*, 59:215-226

Susuki M., Nakamura M., Mori M., Miura S., Tsuchiya M., Ishii H., 1995, lansoprazole inhibits oxygen-derived free radical production from neutrophils activated by *Helicobacter pylori*, *J. Clin. Gastroenterol.*, 10 (supl. 2) S93-S96.

Szelenyi I., Brune K., 1988, Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats, *Dig. Dis. and Sci.*, 33(7):865-871.

Thompson L., Ruedi J., Low M., 1987, Purification of 5'-nucleotidase from human placenta after release from plasma membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 145(1):118-125.

Victor B., Taegtmeier H., Miller T., 1995, Gastric mucosal high-energy phosphate metabolism, influence of ethanol and PGE₂, *Dig. Dis. and Sci.*, 40(1):120-127

Voelker D., 1991, Organelle biogenesis and intracellular lipid transport in eukaryotes, *Microbiol. rev.*, 55(4) 543-560

Wallmark B. Lorentzon P. Sach G 1990 The gastric H⁺ K⁺-ATPase *J. of internal medicine* 228 suppl.1:3-8

Wingroove A. Caret R 1984 *Química Orgánica* Harla México pp.485.

Wintersberger E. Rotheneder H. Grabner M. Beck G. Seiser C. 1992 Regulation of thymidine kinase during growth cell cycle and differentiation *Advan. Enzyme Regul.* 32:241-254.