



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

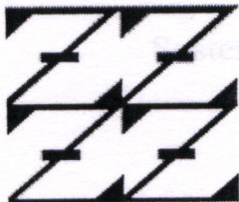
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Cuantificación de los niveles de óxido nítrico, tromboxano B₂, leucotrieno B₄ y grupos sulfhidrilo en estómago de rata originada por la administración de estigmasterol, β-lupeol, β-sitosterol y ácido 3α-hidroximasticadienónico.

T E S I S

**PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N:
ALEJANDRA GUADARRAMA REYNA
ALBERTO MARTINEZ MARTINEZ**

**U N A M
F E S
Z A R A G O Z A**



**LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION**

MEXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado para la Dirección General de Asuntos de Personal Académico a través del proyecto DGAPA IN201506 Y por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología a través de sus proyectos: CONACYT 41231 y CONACYT C01-18.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Navarrete por su apoyo, experiencia y conocimientos compartidos durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Jesús Arrieta por su apoyo en la realización de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 126 del conjunto E. Departamento de Farmacia de la Facultad de Química por su apoyo durante el desarrollo de la tesis.

INDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	3
1.1. Úlcera gástrica.....	3
1.1.1. Etiología y patología.....	4
1.1.2. Sintomatología.....	6
1.2. Modelos experimentales de inducción de lesiones gástricas.....	7
1.2.1. Inducción de lesiones gástricas por etanol.....	7
1.3. Mecanismos de defensa de la mucosa gástrica.....	8
1.3.1. Factores funcionales.....	8
1.3.2. Factores neuronales.....	8
1.3.3. Factores humorales.....	10
1.4. Mecanismo de defensa de la mucosa gástrica independiente de prostaglandinas.....	14
1.4.1. Grupos sulfhidrilo (GSH).....	14
1.4.2. Factor de crecimiento epidérmico.....	14
1.4.3. Somatostatina.....	15
1.4.4. Mecidanol.....	15
1.5. Tromboxanos (TXB ₂).....	15
1.6. Leucotrienos (LTB ₄).....	16
1.7. Metabolitos aislados de plantas con actividad antiulcerosa.....	17
1.7.1. Triterpenos.....	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19

3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVO GENERAL	21
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
6. METODOLOGÍA	22
6.1 Animales.....	22
6.2 Fármacos.....	22
6.3 Cuantificación de los niveles de nitratos.....	22
6.3.1 Análisis de muestras.....	23
6.4 Cuantificación de los niveles de tromboxanos y leucotrienos.....	25
6.4.1 Purificación de las muestras.....	25
6.4.2 Cuantificación de los niveles de TXB ₂	27
6.4.2.1. Análisis de las muestras.....	27
6.4.3. Cuantificación de los niveles de LTB ₄	28
6.4.3.1. Análisis de las muestras.....	28
6.5 Cuantificación de los niveles de grupos sulfhidrilo (GSH).....	30
6.5.1. Análisis de las muestras.....	31
6.6. Análisis estadístico.....	31
7. RESULTADOS	33
7.1. Niveles de nitratos en jugo gástrico.....	33
7.2. Niveles de TXB ₂ en jugo gástrico.....	33
7.3. Niveles de LTB ₄ en jugo gástrico.....	33
7.4. Niveles de GSH en tejido gástrico.....	43
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	48
8.1. Efecto sobre los niveles de nitratos después de la	

administración intragástrica de estigmasterol, β-lupeol y β-sitosterol.....	48
8.2. Efecto sobre los niveles de tromboxanos TXB ₂ después de la administración intragástrica de estigmasterol, β-lupeol y β-sitosterol.....	48
8.3. Efecto sobre los niveles de leucotrienos LTB ₄ después de la administración intragástrica de estigmasterol, β-lupeol y β-sitosterol.....	49
8.4. Efecto sobre los niveles de grupos sulfhidrilos (GSH) después de la administración intragástrica de estigmasterol, β-lupeol, ácido 3α-hidroxicasticadienónico y ácido 3β-hidroxicasticadienónico	50
9. CONCLUSIONES.....	52
10. PERSPECTIVAS.....	53
11. BIBLIOGRAFÍA.....	54

RESUMEN

Se conoce que el óxido nítrico y los grupos sulfhidrilos están involucrados en el mecanismo de acción gastroprotector del β-lupeol, el estigmasterol y el β-sitosterol; también, se sabe que para el ácido 3α-hidroxicasticadienónico únicamente se encuentran implicados los grupos sulfhidrilos en su mecanismo de acción. Por otro lado, se desconoce que papel desempeñan los tromboxanos (TXB₂) y leucotrienos (LTB₄) en su actividad gastroprotectora de los compuestos mencionados anteriormente; por lo que, en el presente trabajo se determinaron los niveles de óxido nítrico, TXB₂ y LTB₄ en jugo gástrico de rata; mientras que los niveles de grupos sulfhidrilos se cuantificaron en tejido epitelial. Encontrándose que los niveles de ON se incrementaron notablemente cuando se administró estigmasterol y β-lupeol (9.87, 10.98 μM/mL) respectivamente, no obstante, el pretratamiento con β-sitosterol, solo presentó un incremento parcial con respecto al grupo control; mientras que en TXB₂ solo se presentó un incremento parcial en los compuestos evaluados y finalmente; para el LTB₄ y GSH no hubo un incremento con su respectivo grupo control.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existen muchos fármacos para el tratamiento de la úlcera gástrica, como son los antiácidos, los antisecretores y los citoprotectores. Sin embargo, este padecimiento sigue teniendo un alto índice de morbilidad y mortalidad (Hoogerwerf y Pasricha, 2001), lo que demuestra que las herramientas terapéuticas con las que se cuenta en la actualidad no constituyen una garantía de solución del cuadro patológico en todos los casos, lo que justifica que se busquen nuevas alternativas terapéuticas.

En relación con lo anterior, dentro de la cultura herbolaria de nuestro país, se tiene el registro de más de 56 plantas utilizadas para el tratamiento específico de la úlcera gástrica y la gastritis, sin embargo a sólo dos de ellas se les han identificado los metabolitos responsables de su actividad gastroprotectora, *Hippocratea excelsa* y *Amphipterigium adstringens* (Navarrete *et. al.*, 2002, Arrieta *et. al.*, 2003). En el caso de *Hippocratea excelsa* (Cancerina), los metabolitos responsables de dicha actividad son: β -sitosterol, β -D-glucósido de β -sitosterol y epicatequina. Mientras que para *Amphipterigium adstringens* (Cuachalalate) los metabolitos responsables de su actividad gastroprotectora son: el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, el ácido *epi*-oleanólico y el β -sitosterol (Arrieta, 2003). Para el ácido 3 α -hidroximasticadienónico se reporta que los grupos sulfhidrilos son importantes en su mecanismo gastroprotector (Arrieta *et. al.*, 2003), mientras que para el β -sitosterol el óxido nítrico y los grupos sulfhidrilos, participan de manera importante en su mecanismo de acción (Arrieta *et. al.*, 2003) Mientras que para el estigmasterol y el β -lupeol que son otros metabolitos que tienen actividad gastroprotectora (Sánchez,

2003; Sandoval, 2004).

Sin embargo, no se sabe con certeza de que manera el óxido nítrico, el tromboxanos (TXB₂) y el leucotrienos (LTB₄) están involucrados en el mecanismo de acción del β-lupeol, el estigmasterol y el β-sitosterol; tal como, los grupos sulfhidrilos en el mecanismo de acción del ácido 3α-hidroxicasticadienónico, el β-lupeol y el estigmasterol; por lo que el presente trabajo se encaminó a cuantificar los niveles de óxido nítrico, TXB₂, LTB₄ y grupos sulfhidrilos después la inducción de la lesión gástrica con etanol.

I. FUNDAMENTO TEÓRICO.

1.1. Úlcera Gástrica.

La mucosa del estómago y parte alta del duodeno normalmente están protegidas de la acción irritante del ácido gástrico por una capa de moco y bicarbonato. Las células epiteliales de la mucosa se descaman continuamente y son sustituidas; las pequeñas lesiones se reparan rápidamente, sin embargo, si una porción de la superficie de la mucosa sufre erosión, la secreción ácida puede causar dolor llamándose comúnmente úlcera. Las úlceras pépticas son lesiones en la mucosa duodenal o gástrica que han sido provocadas por la digestión del ácido y la pepsina y se vuelven vulnerables a ella. Esto deja una zona desnuda de la mucosa susceptible a la digestión posterior. La mejor forma de diferenciar la erosión y la úlcera es por su profundidad. La pérdida de tejido mucoso es decir, la erosión; se regenera por la formación de epitelio sin formación de cicatriz, la lesión que se extiende a través de la *muscularis mucosae* se regenera mediante el desarrollo de tejido de granulación. Una úlcera aguda se caracteriza por bordes y fondo donde el tejido conjuntivo es escaso o no existe, mientras que una úlcera crónica posee tejido fibroso abundante en sus bordes y en su base.

Para la úlcera duodenal, la característica mas notable es el aumento de masa celular tipo parietal, lo que trae como consecuencia un incremento en la capacidad secretora, además, existe aumento de vaciado gástrico, que tiene como resultado un aumento de carga ácida para el duodeno, ya que gran parte de la proteína amortiguadora ha sido consumida o vaciada por el estómago.

1.1.1. Etiología y patología. El desarrollo de la úlcera péptica es el resultado de una zona localizada de necrosis y digestión del revestimiento del tubo digestivo. Esto deja una zona sin moco en la mucosa gástrica, susceptible a la posterior digestión (Sodeman y Sodeman, 1988). El ácido y la pepsina son los principales agentes causales de las úlceras. En las úlceras de tipo I, que se producen en el estómago, hay poca o ninguna hipersecreción de ácido. En las úlceras de tipo II abarcan tanto las úlceras gástricas, astrales, prepilóricas y duodenales, caracterizándose por existir hipersecreción de ácido y trastorno de los efectos de retroalimentación negativa de la acidificación en la descarga de gastrina y la secreción sostenida de ácido (Brunton, 1996).

La causa ordinaria de la úlcera péptica es el desequilibrio entre la secreción de jugo gástrico y el grado de protección de la barrera mucosa gastroduodenal. En ocasiones la úlcera avanza hasta los vasos sanguíneos causando hemorragia, o atraviesa completamente la pared intestinal, penetrando en órganos vecinos o creando una perforación libre en la cavidad peritoneal. Casi siempre hay actividad regeneradora que en cualquier momento puede lograr la curación de la úlcera, especialmente si esta se protege del jugo gástrico (Sodeman y Sodeman, 1988).

Los pacientes con úlceras prepilóricas tienden a secretar una mayor cantidad de ácido y pepsina que los sujetos normales. La hipersecreción ácida observada en la mayoría de los pacientes con úlcera duodenal puede deberse principalmente a cuatro factores los cuales son:

1. Un incremento de células parietales que origina una mayor capacidad de producción de ácido.
2. Un aumento de la estimulación de la secreción ácida.

3. Un incremento de la sensibilidad de las células parietales a los estímulos normales.

4. Una disminución de la inhibición de la secreción ácida y de la liberación de la gastrina (Lloyd *et. al.*, 1988, Lam, 1984, Spiro, 1987).

Además del daño producido por el ácido y la pepsina, se ha reportado que *Helicobacter pylori* participa en el desarrollo de la úlcera. La asociación más común de *H. pylori* y los humanos es con mucho la colonización gástrica asintomática, ya que esta bacteria permanece fija a la capa de moco y no penetra las capas epiteliales de la mucosa, sin embargo no se han identificado toxinas citodestructivas (Kumar, 1995; Ballesteros, 2000; Rodríguez *et. al.*, 2000). Una vez instalada la bacteria en las células parietales; esta induce varias anomalías en la función gástrica como la estimulación de ácido durante la ingesta de los alimentos, un deterioro de la inhibición normal del desarrollo de la gastrina, incremento de la masa celular parietal y una reducción en la secreción duodenal del bicarbonato. (Peek *et. al.*, 1997).

El consumo de tabaco también participa en el desarrollo de la úlcera debido a que retarda su cicatrización, se incrementan las complicaciones y la probabilidad de morir en los fumadores. Se han descrito varios mecanismos de acción del tabaco, como son una mayor secreción de ácido-pepsina, aceleración gástrica originada por una mayor carga ácida al duodeno, defectos en la secreción pancreática de bicarbonato, aumento del reflujo duodenal gástrico, disminución del flujo sanguíneo y de prostaglandinas. No obstante, estos efectos son variables, por lo que es imposible señalar cual de ellos es más relevante (Lyndell *et. al.*; 1997).

El consumo de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE'S) esta relacionado con la úlcera gástrica, ya que estos, inhiben a las enzimas responsables de la síntesis de prostaglandinas, lo que provoca una disminución en la producción de moco, bicarbonato y flujo sanguíneo, lo que se traduce como un daño para la mucosa gástrica y en casos graves conlleva a dos de sus complicaciones más graves como la hemorragia digestiva y la perforación (Flores, 2003).

Ciertas enfermedades como: la cirrosis hepática, la insuficiencia renal crónica, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el trasplante renal; se han asociado al desarrollo de la úlcera péptica. Así mismo existen padecimientos como: la artritis reumatoide, la enfermedad coronaria, el hiperparatiroidismo, la litiasis renal, la pancreatitis crónica y la fibrosis quística que también están relacionados con la úlcera gástrica (Rodríguez *et. al.*, 2000).

1.1.2. Sintomatología. La mayor parte de las úlceras pépticas causan dolor epigástrico corrosivo, quemante o taladrante, pero una minoría significativa, presenta complicaciones como hemorragia o perforaciones. El dolor tiende a empeorar por la noche y se presenta generalmente de una a tres horas después de las comidas durante el día. Las manifestaciones adicionales son náuseas, vómito, distensión, eructos y pérdida de peso importante (originando el espectro de alguna enfermedad maligna oculta). En forma ocasional, en las úlceras penetrantes el dolor es referido a la espalda, al cuadrante superior izquierdo o al tórax, y se puede interpretar de manera equivocada como de origen cardíaco. (Kumar *et. al.*, 1995; Soll, 1994).

1.2. Modelos experimentales de Inducción de Lesiones Gástricas.

Estos modelos se realizan con el propósito de evaluar la eficacia de los tratamientos terapéuticos (Silen,1988). Existen diferentes modelos experimentales de inducción de las lesiones gástricas los cuales deben reproducir tan fielmente como sea posible, el padecimiento como ocurre en los seres humanos (Galvin *et. al.*, 1992). Algunos de ellos son: Inducción de lesiones gástricas con etanol, producción de lesiones gástricas con agentes necrosantes, producción de úlceras gástricas con ácido acético, producción de lesiones gástricas con AINE`S, lesiones gástricas por ligadura del píloro e inducción de lesiones gástricas por estrés.

1.2.1. Inducción de lesiones gástricas con etanol. En las lesiones producidas por la administración oral de etanol se utilizan concentraciones que van del 40% al 70% (Hawkey *et. al.*, 1988). Las lesiones hemorrágicas aparecen en un lapso de 1 a 2 horas posteriores a la administración. El etanol a concentraciones altas promueve la solubilización de la superficie de la mucosa gástrica, agotamiento de la mucina intracelular con una difusión luminal de mucosustancias y liberación de electrolitos a través del lumen gástrico. El etanol concentrado también causa una rápida destrucción de las células epiteliales de la mucosa con la formación de áreas necróticas, donde el etanol y las macromoléculas atraviesan el tejido subyacente provocando que el daño gástrico aumente en su profundidad debido a que el etanol absoluto libera enzimas lisosomales y citosólicas. Se ha reportado que existe relación del daño gástrico por etanol con la reducción en los niveles de moco y grupos sulfhidrilos (Szabo *et. al.*, 1990).

1.3. Mecanismos de Defensa de la Mucosa Gástrica.

En general, los mecanismos de la mucosa gástrica, para protegerla de los factores agresivos como el ácido clorhídrico, la bilis, los fármacos anti-inflamatorios y el estrés consisten en factores funcionales, humorales y neuronales. La secreción moco-alcalino, la capa de fosfolípidos, la microcirculación y la motilidad son acciones funcionales; la síntesis y secreción de prostaglandinas, así como la liberación de óxido nítrico son factores humorales y las neuronas sensibles a capsaicina desencadenan acciones neuronales (Tsukimi *et. al.* 2001; Arrieta *et. al.* 2006).

1.3.1 Factores funcionales. Las sustancias secretadas en el lumen como el ácido, el moco y el bicarbonato permiten que la mucosa gastrointestinal tenga una resistencia notable a los factores que la dañan, como el ácido y la pepsina. La función principal del ácido gástrico es disminuir los niveles de bacterias en el intestino delgado. El epitelio actúa como una barrera a la difusión pasiva de sustancias perjudiciales y cuando el epitelio es dañado se puede reparar muy rápidamente por un proceso conocido como "restitución", que implica la migración de células epiteliales sanas a la lesión (Wallace *et. al.*, 2001). La microcirculación gástrica está involucrada en el mantenimiento de la mucosa gastrointestinal modulando la liberación del ON en el endotelio vascular (Calatayud *et. al.*, 2001).

1.3.2. Factores neuronales. Existen evidencias tanto morfológicas como funcionales de que las neuronas sensibles a capsaicina inervan el tracto gastrointestinal. Se ha demostrado que estas neuronas contribuyen a la protección de la mucosa. La aplicación local de capsaicina da como resultado una activación neuronal y liberación de neuropéptidos, tales como la sustancia

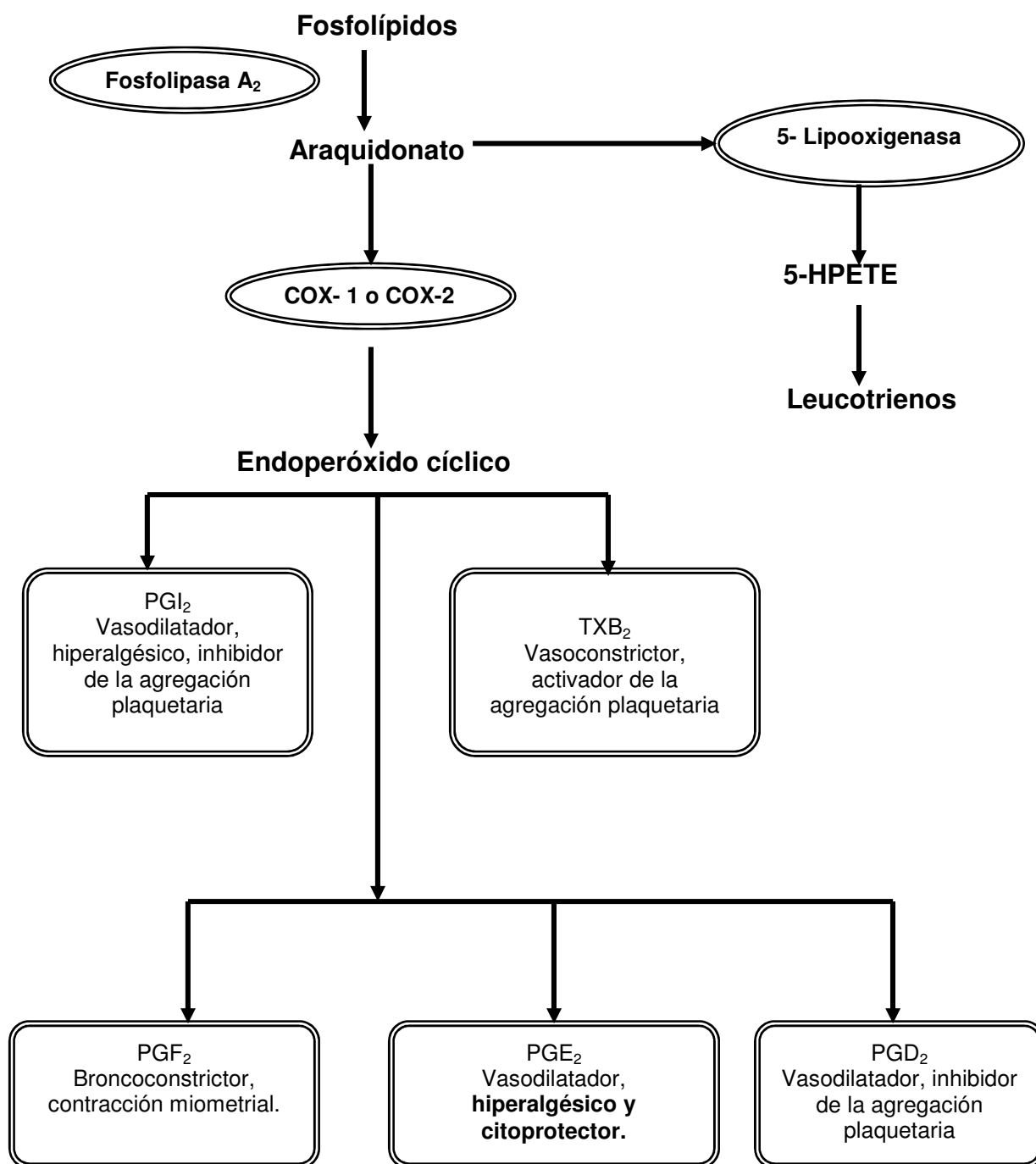


Figura 1. Metabolismo del ácido araquidónico (Parente *et. al.*, 2003).

p, calcitonina y neuroquinina los cuales provocan un incremento del flujo sanguíneo en la mucosa gástrica (Tsukimi *et. al.*, 2001).

1.3.3. Factores humorales. Las prostaglandinas son un grupo de ácidos grasos oxigenados de cadena larga derivados de un sustrato común el ácido araquidónico (Figura 1). Son sustancias naturales que se encuentran en todas las células de mamíferos. Las prostaglandinas difieren entre si por cambios en el anillo de cinco átomos de carbono y en las dos cadenas laterales unidas al anillo (Robert, 1987).

Las prostaglandinas se encuentran ampliamente distribuidas en el sistema digestivo y están involucradas en cierto número de procesos fisiológicos incluyendo la motilidad, flujo sanguíneo, secreción de moco, bicarbonato y reducción de la secreción de ácido.

La mucosa gástrica resiste una gran variedad de factores nocivos endógenos y exógenos, ya que existe una regeneración continua de prostaglandinas E₂ y prostaciclina (PGI₂) donde la mayoría de los mecanismos de la mucosa gástrica son estimulados o facilitados por prostaglandinas exógenas ó endógenas.

El daño gástrico inducido por la supresión de la síntesis de prostaglandinas puede ser prevenido por la administración de óxido nítrico (Atay *et. al.*, 2000), ya que el ON en condiciones aeróbicas estimula la conversión de ácido araquidónico a prostaglandinas E₂ y D₂ (Hajjar *et al.*, 1994). Recientes estudios en rutas enzimáticas del metabolismo del ácido araquidónico revelan que la síntesis de prostaglandinas depende de la actividad de la Ciclooxygenasa (COX) como el paso inicial para la formación de eicosanoides, tales como prostaglandinas (PGE₂) y tromboxanos (TXB₂), además el ácido araquidónico a través de la 5-lipooxygenasa (LOX) origina los leucotrienos (LTB₄) (Brzozowski, 2003).

Se han establecido dos isoformas de la COX catalogadas como COX-1 y COX-2. La COX-1 se encuentra en el organismo de manera constitutiva. Esta isoforma, genera prostaglandinas que están involucradas en la protección de la mucosa gastrointestinal. La isoforma COX-2 es inducida por una gran variedad de agentes tales como: citosinas, mitógenos, endotoxinas, factores de crecimiento, y lipopolisacáridos; generando prostaglandinas las cuales están implicadas en los procesos de inflamación (Atay *et. al.*, 2000).

Se ha propuesto que la COX1 y la COX-2 actúan en conjunto para mantener la integridad de la mucosa gástrica en condiciones normales y el daño se desarrolla cuando ambas isoenzimas son inhibidas. La mucosa puede resistir al daño provocado por ácidos exógenos mediante la COX-1, solo si la COX-2 es inducida y asiste a la COX-1. La inducción de la COX-2 puede ocurrir durante el daño de la mucosa gástrica provocada por isquemia o úlcera gástrica donde el daño se reduce y acelera la cicatrización (Figura 2). La COX-2 es esencial para el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica con otros mediadores del sistema de defensa gástrica como ON o neuronas aferentes (Peskar, 2001).

El óxido nítrico es un simple gas diatómico producido en la mucosa gástrica a partir del aminoácido L-arginina por la enzima óxido nítrico sintasa (SON) y desempeña un papel importante en la traducción de señales. Se ha demostrado que agentes liberadores de óxido nítrico, tales como la nitroglicerina y nitroprusiato de sodio, inhiben el daño gástrico inducido por HCl 50 mM o etanol al 70%. Los inhibidores no selectivos de la SON, tales como nitro-L-arginina (L-NA) y L-NAME, evitan la citoprotección en presencia de irritantes suaves, ya que, se considera que el óxido nítrico producido por la

SON participa de manera importante en la integridad y mantenimiento de la mucosa gástrica (Tsukimi *et. al.*, 2001).

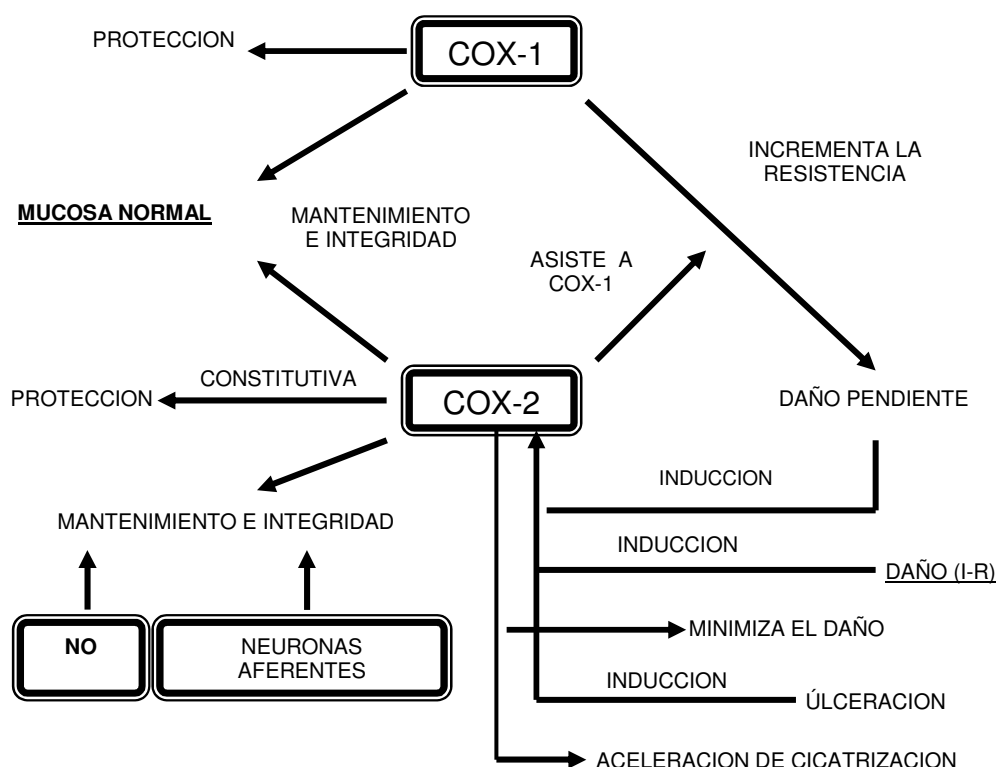


Figura 2. Papel que desempeñan la COX-1 y la COX-2 en el mecanismo de protección de la mucosa gástrica.

Se sabe que el óxido nítrico está implicado en el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica mediante el aumento de su flujo sanguíneo, así como; en la producción de prostaglandinas. Sin embargo, aun no está claro como el óxido nítrico incrementa los niveles de prostaglandinas.

En la literatura se han reportado algunas teorías para tratar de explicar como el óxido nítrico incrementa los niveles de prostaglandinas:

1. Se sugiere que el anión superóxido (O_2^-) es generado durante la activación de la COX y se cree que participa en la auto-inactivación de la COX. El óxido nítrico interacciona con el O_2^- y limita la cantidad de los radicales libres

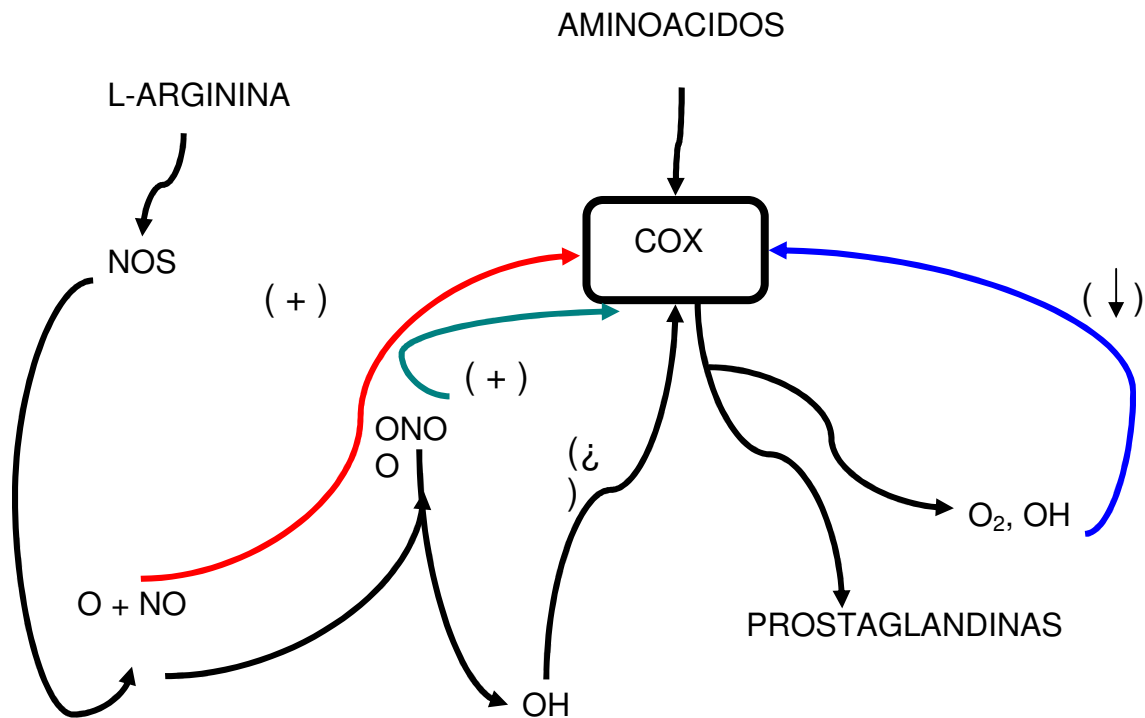


Figura 3. Hipótesis del mecanismo del óxido nítrico en la generación de prostaglandinas en defensa de la mucosa gástrica.

necesarios para su inactivación (Figura 3). Es por lo tanto, que el óxido nítrico aumenta los niveles de la prostaglandinas (Salvemini *et, al.*, 1997).

2.- Por otro lado el óxido nítrico nitrosila residuos de cisteína en la reacción catalítica de la COX, favoreciendo la formación de nitrosotioles, lo que puede conducir a cambios conformacionales en la estructura de la enzima dando como resultado un incremento en la eficacia de la reacción (Salvemini *et, al.*, 1997).

3.- Cuando el óxido nítrico y O_2^- interactúan para formar la molécula citotóxica peroxinitrilo ($ONOO^-$), esta al descomponerse origina el radical hidroxilo (OH^-)

el cual al parecer interactúa con la COX provocando cambios conformacionales en la estructura de la COX provocando un incremento en la actividad catalítica de dicha enzima (Salvemini *et. al.*, 1997).

1.4. Mecanismo de Defensa de la Mucosa Gástrica Independiente de Prostaglandinas.

Esta protección incluye sustancias citoprotectoras que no estimulan la biosíntesis de prostaglandinas en la mucosa gástrica. Entre estos se encuentran los grupos sulfhidrilos (GSH), el factor de crecimiento epidérmico, somatostatina y meciadanol (Huang *et. al.*, 2000).

1.4.1 Grupos Sulfhidrilos (GSH). En 1981 Szabo reportó que los compuestos que contienen grupos sulfhídrido protegen a la mucosa gástrica del daño inducido por etanol. De estas observaciones se deduce que los grupos sulfhídrido son citoprotectores de la mucosa gástrica y pueden participar en la citoprotección inducida por las prostaglandinas. Los grupos sulfhídrido son requeridos para la síntesis de prostanoides y para la activación de los receptores de las prostaglandinas, además son responsables de la defensa de la mucosa gástrica, ya que influyen en la permeabilidad de la membrana y captura de radicales libres (Szabo *et. al.*, 1981; Konturek *et. al.*, 1987; Shorrock *et. al.*, 1988; Maity *et. al.*, 1998).

1.4.2. Factor de crecimiento epidérmico. Es un polipéptido producido por las glándulas salivales y de Brunner. Estimula la síntesis de RNA y DNA en la mucosa gástrica, además; favorece el crecimiento y la diferenciación celular acelerando la reparación de la mucosa gástrica (Chao *et. al.*, 2003). Se ha reportado que tiene un efecto inhibitor de la secreción ácido gástrica, pero en dosis no antsecretoras ha mostrado una protección del estómago contra las

lesiones producidas por aspirina, además previene la formación de lesiones por estrés en ratas. Sin embargo, no está del todo definido su participación en la defensa gastroduodenal humana (Shorrocks *et al.*, 1988; Allen *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1999).

1.4.3. Somatostatina. La somatostatina es una hormona peptídica, distribuida ampliamente en el organismo que se ha utilizado en el tratamiento de lesiones agudas del tracto gastroduodenal (Puente *et al.*, 1995).

1.4.4 Mecidanol. Es un inhibidor de la histidina descarboxilasa y tiene acción gastroprotectora contra el daño producido por etanol y aspirina, posiblemente producida por la disminución de la formación de histamina en la mucosa (Konturek *et al.*, 1990).

1.5. Tromboxanos.

Es el mayor metabolito de ácido araquidónico producido por plaquetas (vía COX-1). Las plaquetas producen más del 95% de los tromboxanos detectables en suero, siendo otra fuente los neutrófilos. Los Tromboxanos son potentes vasoconstrictores y agonistas para la agregación plaquetaria. Cualquier reducción en el flujo sanguíneo puede provocar que la mucosa sea más susceptible al daño gástrico, también se ha sugerido que los tromboxanos contribuyen de manera importante en la ulceración del tracto gastrointestinal. Los Tromboxanos tienen la capacidad de estimular la liberación de Leucotrienos y la adherencia de leucocitos en el endotelio vascular, contribuyendo al daño de la mucosa a través de una modulación de la respuesta inflamatoria (Wallace *et al.*, 2001).

Con el desarrollo de los inhibidores de la síntesis de TXB₂ fue posible definir la contribución de estos, en el daño de la mucosa gástrica en modelos

experimentales para la inducción de lesiones gástricas. La inhibición de la síntesis de tromboxanos demostró que reduce el daño provocado por sales biliares o por etanol. Takahashi y colaboradores demostraron que el TXB₂ se encuentra en niveles elevados en tejido dañado del estómago y que la inhibición de la síntesis de tromboxano, acelera la curación de las úlceras por promoción de la regeneración de la mucosa. Hawkey y colaboradores reportaron que no existen cambios en los niveles de tromboxano en el tejido gástrico tomado de pacientes con úlcera (Wallace *et. al.*, 2001).

1.6. Leucotrienos.

Los leucotrienos son sintetizados a partir del ácido araquidónico, el paso limitante en la síntesis de leucotrienos lo constituye la enzima 5-lipooxigenasa (LOX). Existe diferentes tipos de leucotrienos, sin embargo es conveniente dividirlos en dos principales clases las cuales son: leucotrienos tipo B₄ (LTB₄) y leucotrienos peptídicos (LCT₄, LDT₄, Y LTE₄). La síntesis de Leucotrienos ocurre comúnmente en células epiteliales, inmunocitos y células endoteliales. En la mucosa gástrica, la masa celular es la mayor fuente de leucotrienos tipo peptídicos, mientras que en los neutrofilos predominan los leucotrienos tipo B₄ (Wallace *et. al.*, 2001).

El rol que desempeñan los leucotrienos en la mucosa gástrica ha sido estudiado extensamente en años recientes, los leucotrienos estimulan la secreción de la pepsina lo que provoca una reducción del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica, además interfirieren en el vaciado gástrico (Atay *et. al.*, 2000).

Los productos de la LOX dañan la integridad de la mucosa gástrica y aumentan los efectos provocados por agentes nocivos. Se ha propuesto que los

inhibidores de la LOX y los antagonistas de los leucotrienos disminuyen las lesiones gástricas inducidas por varios agentes necrosantes (Atay *et al.*, 2000).

1.7. Metabolitos aislados de plantas con actividad gastroprotectora.

Se han aislado e identificado diferentes tipos de metabolitos de plantas usadas para el tratamiento de la úlcera gástrica, como son los flavonoides, las saponinas, taninos, los alcaloides, algunos polisacáridos, aceites, gomas y mucílagos, entre los que destacan los triterpenos siendo estos los más comunes.

1.7.1. Triterpenos. Estructuralmente están conformados por tres unidades de isoprenos y se ha propuesto previamente que el grupo hidroxilo en posición C3 es importante para esteroides y triterpenos en su actividad gastroprotectora (Arrieta *et al.*, 2006; Navarrete *et al.*, 2002).

Se ha reportado que varios triterpenos incluyendo la carbenoxolona, el ácido oleanólico, y otros esteroides poseen actividad gastroprotectora. Por ejemplo, el acetato de Lupeol aislado de *Spilanthes ocyimifolia*, el taraxerol aislado de *Taraxacum officinale* y el ácido ursólico aislado de *Psychotria adenophylla*; inhiben las lesiones gástricas causadas por estrés en ratas (Gupta *et al.*, 1981; Snykers *et al.*, 1989). También el ácido oleanólico el cual se encuentra presente en especies como *Prosopis granulosa*, *Calendula*, *Helianthus* y *Solidago* poseen actividad antiulcerosa cuando la lesión es inducida con Aspirina, Indometacina, Reserpina y Tetragastrina (Gupta *et al.*, 1981; Snykers *et al.*, 1989).

De las plantas que se ha aislado la mayor cantidad de compuestos triterpenicos con actividad gastroprotectora se encuentran *Hippocratea excelsa* (cancerina) y *Amphiterygium adstringens* (cuachalalate). De la cancerina, los metabolitos

responsables de dicha actividad son: β -sitosterol, β -D-glucósido de β -sitosterol, epicatequina y la mezcla de α - y β - amirinas (Navarrete *et. al.*, 2002). Mientras que para el cuachalalate se reporta que los metabolitos responsables de la actividad biológica son: el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, ácido *epi*-oleanólico y β -sitosterol (Arrieta *et. al.*, 2003).

Existe evidencia de que el β -sitosterol presenta actividad gastroprotectora en úlcera gástrica inducida con ácido acético y en el modelo de inducción de lesiones gástricas con etanol en ratas (Arrieta *et. al.*, 2006). También se ha reportado que en el efecto gastroprotector del β -sitosterol están involucradas las prostaglandinas (Arrieta, 2003).

Se ha reportado que, tanto el estigmasterol como el β -lupeol presentan actividad gastroprotectora contra las lesiones gástricas inducidas con etanol en rata Wistar y que en su mecanismo de gastroprotección están involucradas las prostaglandinas (Sánchez, 2003; Sandoval, 2004).

Por otro lado para el ácido 3 α -hidroximasticadienónico se ha reportado que presenta efecto gastroprotector importante y en su mecanismo de acción participan los grupos sulfhidrilo (Flores, 2003).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se ha descrito que para el 3α-hidroxiimastacadienónico los grupos sulfhidrilos participan de manera importante en su mecanismo de acción (Arrieta *et. al.*, 2003); mientras que, para el β-sitosterol el óxido nítrico y los grupos sulfhidrilos están implicados en su gastroprotección (Arrieta *et. al.*, 2006). De la misma manera, el estigmasterol y el β-lupeol tienen actividad gastroprotectora con la participación de los grupos sulfhidrilos, el óxido nítrico y las prostaglandinas en su mecanismo gastroprotector (Sánchez, 2003; Sandoval, 2004).

Sin embargo, no se conoce si efectivamente se incrementan los niveles de los grupos sulfhidrilos cuando se administra el ácido 3α-hidroxiimastacadienónico, estigmasterol y β-lupeol, cuando se inducen lesiones gástricas con etanol. También se ignora si existe un aumento en los niveles de óxido nítrico en el jugo gástrico por la administración de estigmasterol, β-lupeol y β-sitosterol en el proceso de lesiones gástricas. Así mismo, se desconoce la función que desempeñan los LTB₄ y TXB₂ cuando se administran estigmasterol, β-sitosterol y β-lupeol. Por lo que en el presente trabajo se cuantificaron los niveles de ON, LTB₄ y TXB₂ en jugo gástrico y los niveles grupos sulfhidrilos en tejido gástrico de rata para explicar de qué forma están involucrados en el mecanismo de acción gastroprotector de esos productos naturales.

3. HIPÓTESIS.

La administración intragástrica de estigmasterol, β -lupeol y β -sitosterol; incrementaran los niveles de oxido nítrico y modificarán los niveles de tromboxanos TXB2 y leucotrienos LTB4 en el jugo gástrico al inducir daño gástrico con etanol.

Mientras que la administración del ácido 3 α -hidroximasticadienónico, del ácido β - hidroximasticadienónico, del estigmasterol y del β -lupeol incrementarán los niveles de los grupos sulfhidrilos en tejido gástrico en el mismo proceso de inducción de daño gástrico.

4. OBJETIVO GENERAL.

Cuantificar los niveles de óxido nítrico, tromboxano B₂, leucotrieno B₄ y grupos sulfhidrilo en estómago de rata después de la administración intragástrica de estigmasterol, β-lupeol, β-sitosterol y ácido 3α-hidroxiimastigidienónico en el modelo de inducción de daño gástrico con etanol.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Inducir la lesión gástrica por la administración de etanol en rata Wistar.
2. Cuantificar los niveles de nitratos, tromboxano B₂ y leucotrieno B₄ en jugo gástrico de rata pretratadas con estigmasterol, β-lupeol y β-sitosterol respectivamente, en lesiones gástricas inducidas con etanol.
3. Cuantificar los niveles de grupos sulfhidrilo en tejido gástrico de rata pretratadas con estigmasterol, β-lupeol, ácido 3α-hidroxiimastigidienónico y ácido 3 β-hidroxiimastigidienónico en lesiones gástricas inducidas con etanol.

6. METODOLOGÍA.

6.1. Animales. Todos los experimentos se realizaron con ratas Wistar macho de un peso de 175 a 200 g, adquiridos del Centro UNAM-Harlan (Harlan México S. A. de C. V.). Los animales fueron tratados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado de los animales (NOM-062-Z00-1999) y en conformidad con las reglas internacionales para el cuidado de los animales de laboratorio. Las ratas se colocaron de manera individual en cajas con un piso de alambre para evitar la coprofagia, estas se privaron de alimento 24 horas antes de la experimentación teniendo libre acceso al agua. Todos los experimentos se realizaron usando de 6-8 animales por grupo (Navarrete *et. al.*, 1998).

6.2. Fármacos.

Los compuestos fueron suspendidos en Tween 80 al 0.5 % preparándose minutos antes de realizar los experimentos y administrados vía oral. Las ratas control recibieron únicamente Tween 80 al 0.5 % a una dosis de 0.5 mL/100 g de peso administrado oralmente. El estigmasterol y β-sitosterol se adquirieron a Sigma Aldrich Corporation (95% de pureza). El Ácido 3α-hidroximasticadienónico se aisló del extracto metanólico de cuachalalate preparado de forma industrial por laboratorios Mixim (Flores, 2003). El β-lupeol se aisló del extracto hexánico de *Pseudobombax ellipticum* (Sandoval, 2004).

6.3. Cuantificación de los niveles de nitratos.

Para la cuantificación de los niveles de nitratos, se administraron en experimentos separados estigmasterol (300 mg/kg p. o.), β-lupeol (30 mg/kg p. o) y β-sitosterol

(30 mg/kg, p. o.) respectivamente, 30 minutos después los animales fueron tratados con 1 mL de etanol absoluto, administrado por vía intragástrica, de forma independiente del peso. Dos horas después de la administración del etanol, se administro 1 mL de solución salina intragástricamente y de forma inmediata el contenido gástrico fue aspirado, las muestras obtenidas fueron almacenadas a -80°C para su posterior análisis. Este procedimiento se realizo de la misma manera para la cuantificación de tromboxanos (TXB2) y leucotrienos (LTB4) como se representa en el Diagrama 1.

6.3.1. Análisis de las muestras. Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente, a partir de este punto estas fueron tratadas de acuerdo al método descrito por el producto comercial para la cuantificación de nitratos/nitritos (Cayman Chemical Corporation), que en primer lugar se realiza la conversión de nitratos a nitritos por medio de la enzima nitrato reductasa y finalmente la adición del reactivo de Griess para convertir los iones nitritos en un diazocompuesto de color púrpura, que finalmente se mide espectrofotométricamente a 405 nm para la determinación de la concentración de nitratos y cuya técnica se describe a continuación:

Realización de la curva Standard: Se colocó en un tubo de ensaye 0.9 mL de solución amortiguadora y se adicionaron 0.1 mL de estándar reconstituido de nitratos para obtener una concentración stock de 200 μ M. Posteriormente se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 μ M; las muestras control solamente contenían solución amortiguadora, cada muestra fue analizada por triplicado.

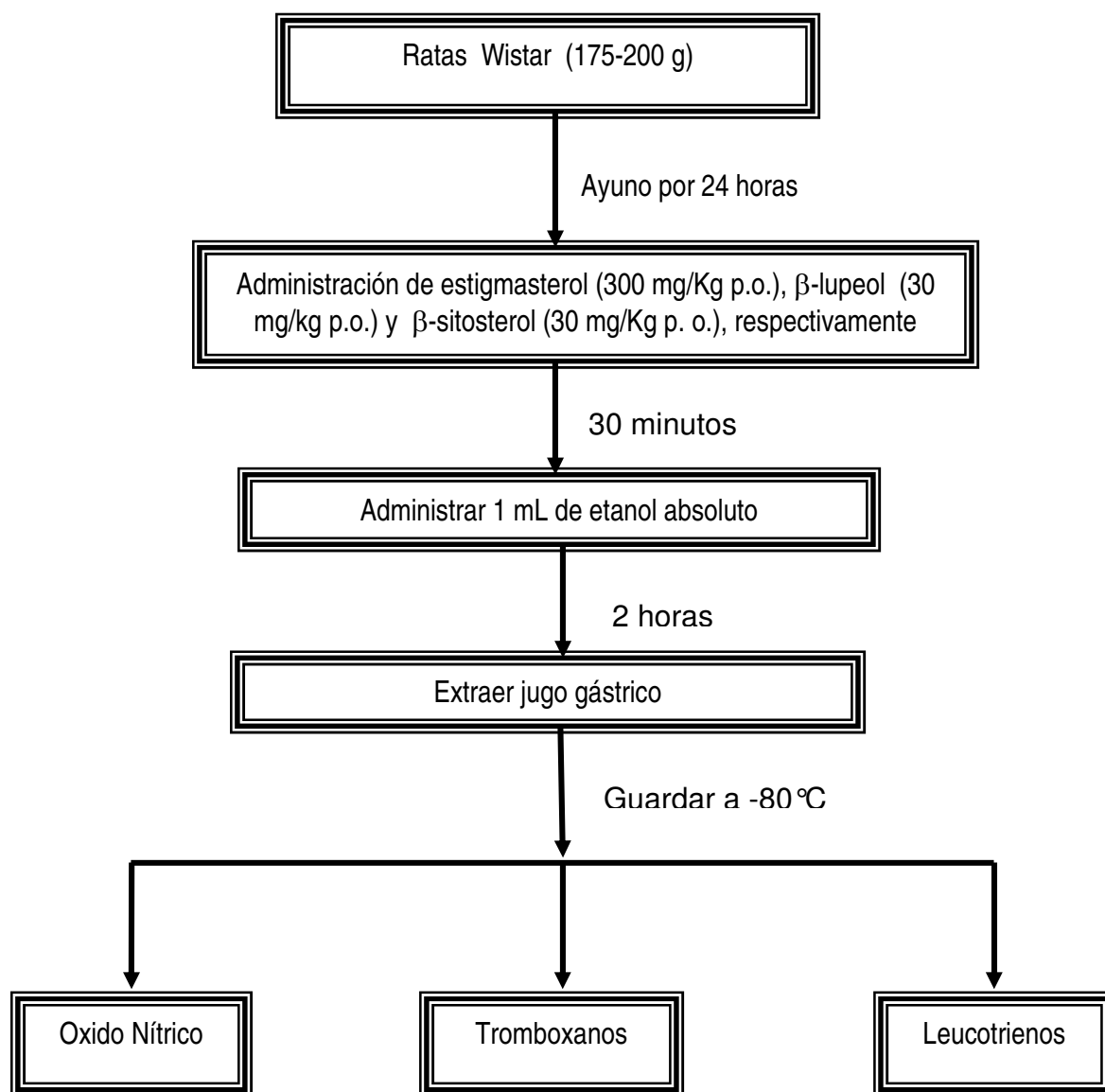


Diagrama 1. Obtención de muestras de jugo gástrico de rata para la cuantificación de oxido nítrico, tromboxanos y leucotrienos pretratadas con estigmasterol (300 mg/Kg p.o.), β -lupeol (30 mg/Kg p.o.) y β -sitosterol (30 mg/Kg p.o.) respectivamente sobre daño gástrico inducido con etanol.

Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos, de cada una se tomaron 80 µL de sobrenadante los cuales se colocaron en los pozos de la placa. A las muestras anteriores, se les adicionó 10 µL de la mezcla enzima cofactor y 10 µL de la mezcla nitrato reductasa dejándose incubar a temperatura ambiente por 3 horas.

Después, se adicionaron 50 µL del reactivo de Griess 1 e inmediatamente 50 µL del reactivo de Griess 2, incubando por 10 minutos a temperatura ambiente, tiempo suficiente para la formación de un color azul (Indicativo de la presencia de nitratos); posteriormente la placa fue leída a una longitud de 540 nm utilizando para ello un lector de ELISA modelo 680 Microplate Reader de la marca BIO-RAD (Konturek *et. al.*, 2001; Konturek *et. al.*, 1998.; Ka-Shun Ko *et. al.*, 2004; Sobko *et. al.*, 2004).

6.4. Cuantificación de los niveles de tromboxanos y leucotrienos.

6.4.1. Purificación de las muestras. Las muestras se descongelaron, dejando que alcanzaran la temperatura ambiente, posteriormente se tomo 1 mL de cada una de las muestras y se les adiciono 1 mL de una mezcla etanol/agua en proporción 4:1 y 20 µL de ácido acético glacial. Se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm durante 2 minutos. A continuación se tomo 1 mL del sobrenadante de las muestras centrifugadas el cual se colocó en una columna específica para la purificación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Amprep C₁₈, Amersham Pharmacia Biotechnologies), previamente humectada dos veces con 1 mL de etanol al 10%. De forma inmediata se eluyó la columna con 1 mL de agua destilada y después con 1 mL de hexano y finalmente con 0.75 mL de acetato

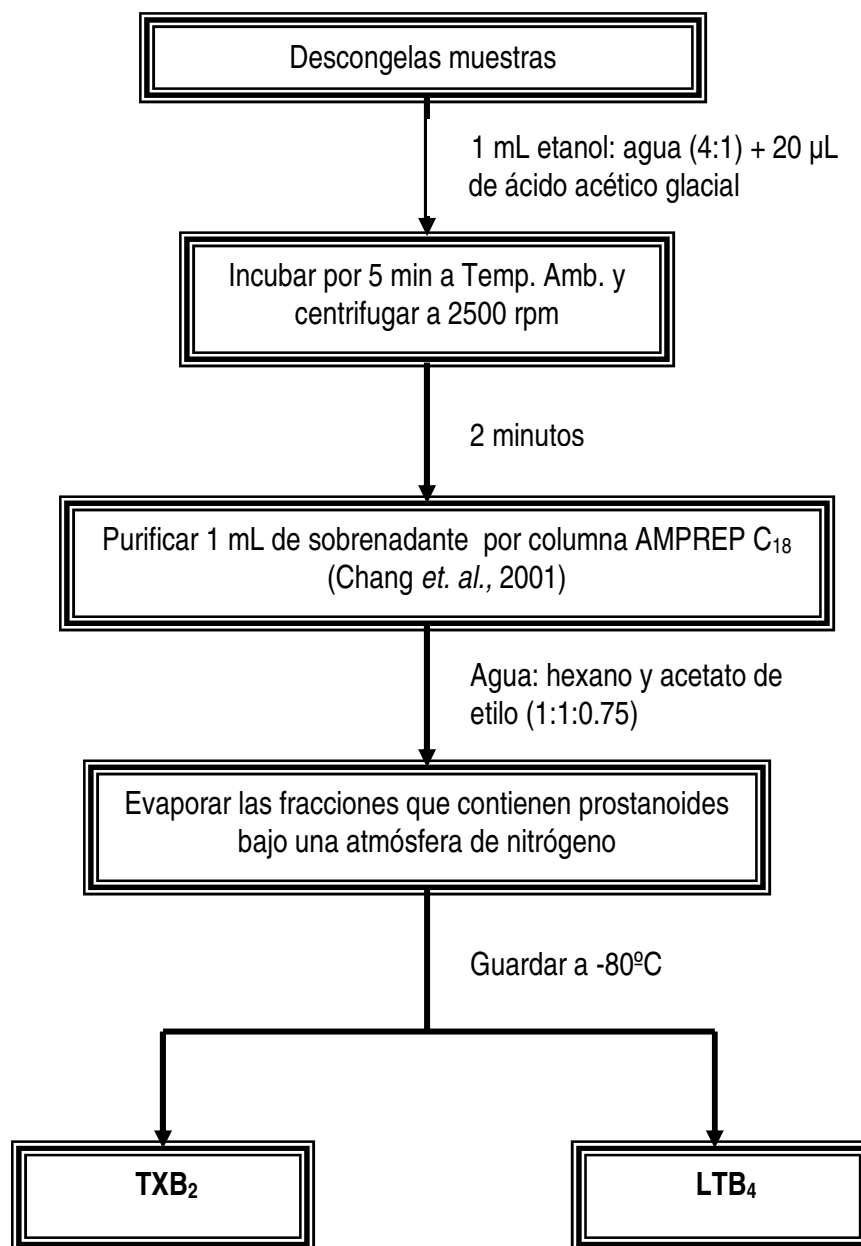


Diagrama 3. Proceso de purificación de jugo gástrico de rata pretratadas con estigmasterol (300 mg/Kg p.o.), β-lupeol (30 mg/Kg p.o.) y β-sitosterol (30 mg/Kg p.o.) respectivamente, sobre daño gástrico inducido con etanol para la obtención de prostanoides.

de etilo que fue donde se obtuvieron las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

El acetato de etilo fue evaporado con nitrógeno (Gianfranco *et. al.*, 2004) y las muestras se guardaron a -80 °C para su posterior análisis (Diagrama 3).

6.4.2. Cuantificación de los niveles de tromboxanos TXB₂.

6.4.2.1. Análisis de las muestras. Las muestras fueron tratadas de acuerdo al método descrito por el paquete comercial para el inmunoensayo enzimático de tromboxanos TXB₂ (Assay Designs) basado en una competencia del TXB₂ y del conjugado acetilcolinesterasa -TXB₂ para un antisuero de conejo-TXB₂ y con el reactivo de Ellmann se desarrollará una reacción enzimática de color amarillo y cuya técnica se describe a continuación:

Para la realización de la curva estándar, se colocaron 100 µL de una solución stock cuya concentración fue de 100000 pg/mL en un tubo de ensaye con 0.9 mL de solución amortiguadora, a continuación se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 10000, 3333, 1111,370, 123, 41.1 y 13.7 pg/mL; las muestras control solamente contenían solución amortiguadora; cada muestra fue analizada por duplicado.

Se tomaron 100 µL de cada una de las muestras, las cuales fueron colocadas en los pozos de la placa que contenían suero anti-ratón IgG, Inmediatamente, se les adicionó 50 µL del conjugado azul TXB₂ HS-EIA, con excepción de los pozos marcados como actividad total y blancos. Posteriormente, se le adicionó 50 µL de anticuerpo amarillo TXB₂ HS-EIA a cada uno de ellos, con excepción de los pozos mencionados anteriormente. La placa se colocó en incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación.

Al término de este, se aspiró el contenido de todos los pozos y se lavó cada uno de ellos con 400 µL de solución amortiguadora (Tris salino con detergente) tres veces; al finalizar los lavados se aspiraron nuevamente y se secaron los pozos con papel absorbente. Posteriormente, se les adicionó 5 µL del conjugado azul TXB₂ HS-EIA a los pozos de actividad total. A todos los pozos se les adicionó 200 µL de sustrato pNpp (Buffer de p-nitrofenil fosfato) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos, tiempo suficiente para que desarrolle color verde e inmediatamente se les adicionó 50 µL de una solución Stop (fosfato trisódico). La placa fue leída a una longitud de 405 nm utilizando el lector de ELISA (Diagrama 4).

6.4.3. Cuantificación de los niveles de leucotrienos LTB₄.

6.4.3.1. Análisis de muestras. Las muestras fueron tratadas de acuerdo al método descrito por el paquete comercial para el inmunoensayo enzimático de leucotrienos LTB₄ (Assay Designs) cuyo fundamento es similar al mencionado a la técnica de TXB₂ y cuya técnica se describe a continuación:

Para la realización de la curva standard, se colocaron 100 µL de una solución stock cuya concentración fue de 120000 pg/mL en un tubo de ensaye con 0.9 mL de solución amortiguadora, a continuación se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 12000, 3000, 750, 188 y 46.9 pg/mL; las muestras control solamente contenían solución amortiguadora; cada muestra fue analizada por duplicado.

Se colocaron 100 µL de cada una de las muestras en los pozos de la placa que contenían suero anti-ratón IgG, posteriormente, se les adicionó 50 µL del conjugado azul LTB₄ HS-EIA, con excepción de los pozos marcados como actividad total y blancos. Inmediatamente, se le adicionó 50 µL de

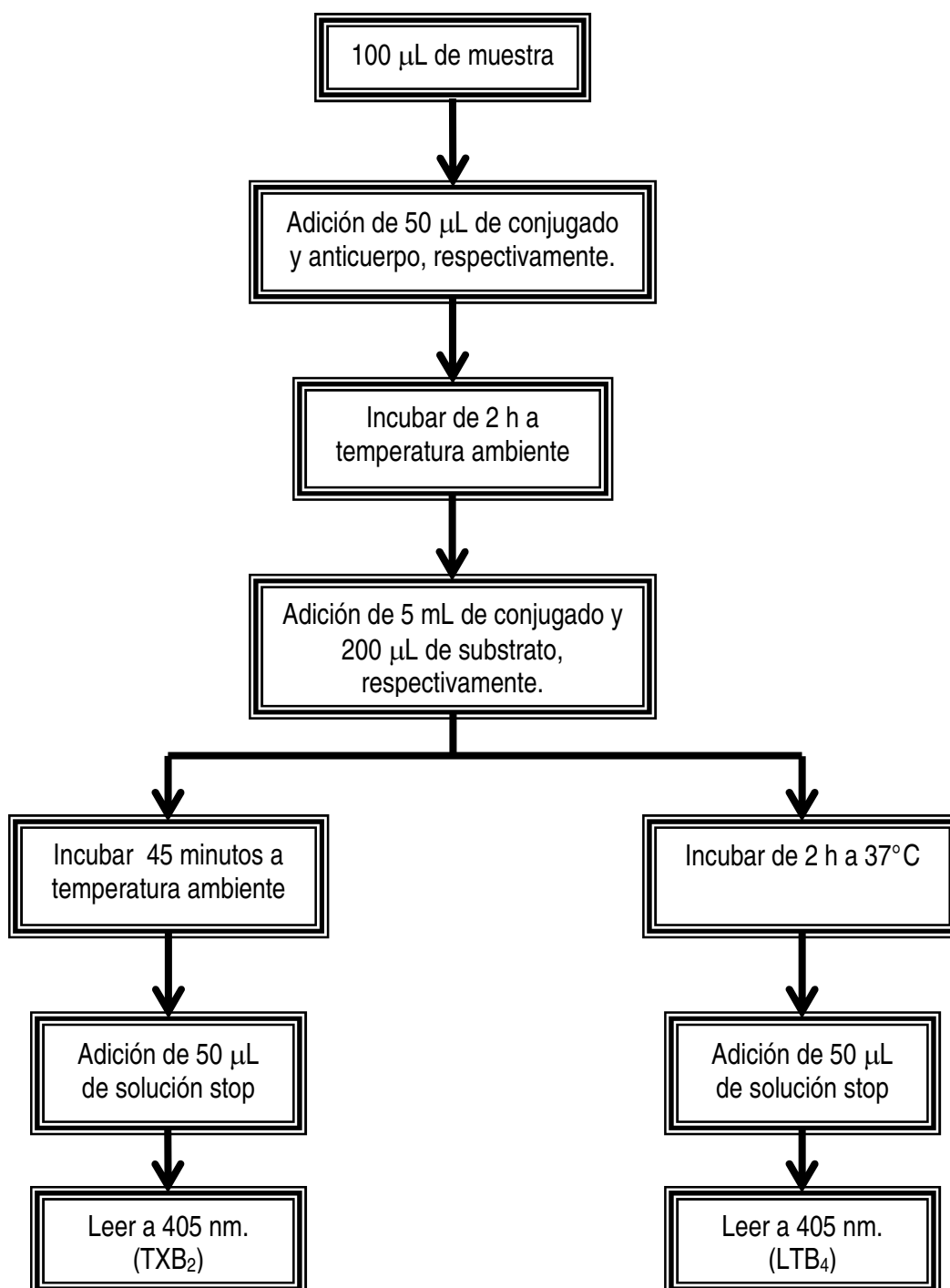


Diagrama 4. Cuantificación de TXB₂ y LTB₄ en jugo gástrico de rata pretratadas con estigmasterol (300 mg/Kg p.o.), β-lupeol (30 mg/Kg p.o.) y β-sitosterol (30 mg/Kg p.o.) respectivamente, sobre el daño gástrico inducido con etanol.

anticuerpo amarillo LTB₄ HS-EIA a cada uno de ellos, con excepción de los pozos mencionados anteriormente. La placa se colocó en incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Al término de este, se aspiró el contenido de todos los pozos y se lavó cada uno de ellos con 400 µL de solución amortiguadora (Tris salino con detergente) tres veces; al finalizar los lavados se aspiraron nuevamente y se secaron los pozos con papel absorbente. Posteriormente, se les adicionó 5 µL del conjugado azul LTB₄ HS-EIA a los pozos de actividad total. A todos los pozos se les adicionó 200 µL de sustrato pNpp (Buffer de p-nitrofenil fosfato) y se incubó a 37°C durante 2 horas, tiempo suficiente para que desarrolla color verde e inmediatamente después se les adicionó 50 µL de una solución Stop (fosfato trisódico). La placa fue leída a una longitud de 405 nm. Utilizando un lector de ELISA (Diagrama 4).

6.5. Cuantificación de los niveles de grupos sulfhidrilos (GSH).

Para la cuantificación de los niveles de grupos sulfhidrilos se administraron los compuestos estigmasterol (300 mg/kg p.o.), β-lupeol (30 mg/kg p.o.), el ácido 3α-hidroxicasticadienónico (30 mg/kg p.o.) y el ácido 3α-hidroxicasticadienónico (30 mg/kg p.o.), 30 minutos después se administró 1 mL de etanol, transcurridas 2 horas los animales fueron sacrificados con éter etílico e inmediatamente, los estómagos fueron removidos, realizando una incisión por medio de la curvatura mayor tomando muestras en el cuerpo de la mucosa. La mucosa fue pesada (0.5 g aproximadamente) y después; se le adicionó 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos (NaH₂PO₄ 0.1 N mas Sacarosa 0.25 N a pH 7.4) Las muestras obtenidas fueron almacenadas a -80°C para su posterior análisis.

6.5.1. Análisis de las muestras. Para cuantificar GSH en la mucosa gástrica, la técnica empleada esta basada en una reacción con el DNTB formando una reacción de color amarillo (indicativo de una formación del complejo GSH-TNB) y cuya técnica se describe a continuación:

Las muestras obtenidas fueron descongeladas a temperatura ambiente, posteriormente homogeneizadas con un dispersor ULTRA-TURRAX modelo T8 de la marca IKA y centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una microcentrífuga refrigerada Micromax RF modelo 120 de la marca Termo Electrón Corporation. Del sobrenadante se tomó 1 mL de muestra e inmediatamente se le adicionó 3.75 mL de solución amortiguadora Tris-HCl pH 8.2, 1.25 mL de DNTB (5,5`-Dithio-bis(2-dinitrobenzoico ácido)) y 20 mL de metanol. Se les dejo reposar

por 5 minutos a temperatura ambiente, tiempo suficiente para la formación de color amarillo (indicativo de la presencia de GSH). Las muestras fueron leídas a una longitud de 412 nm (Diagrama 5), usando para ello un espectrofotómetro Hitachi modelo 200-100.

Los resultados obtenidos fueron expresados en μM por gramo de tejido, (Takeuchi *et. al.*, 1989; Sedlak *et. al.*, 1968; Pongpiriyadacha *et. al.*, 2003).

6.6. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos, se analizaron utilizando una prueba de análisis de varianza (ANADEVA) seguida de la prueba de Dunnet (Montgomery, 1991), en caso de requerirlo.

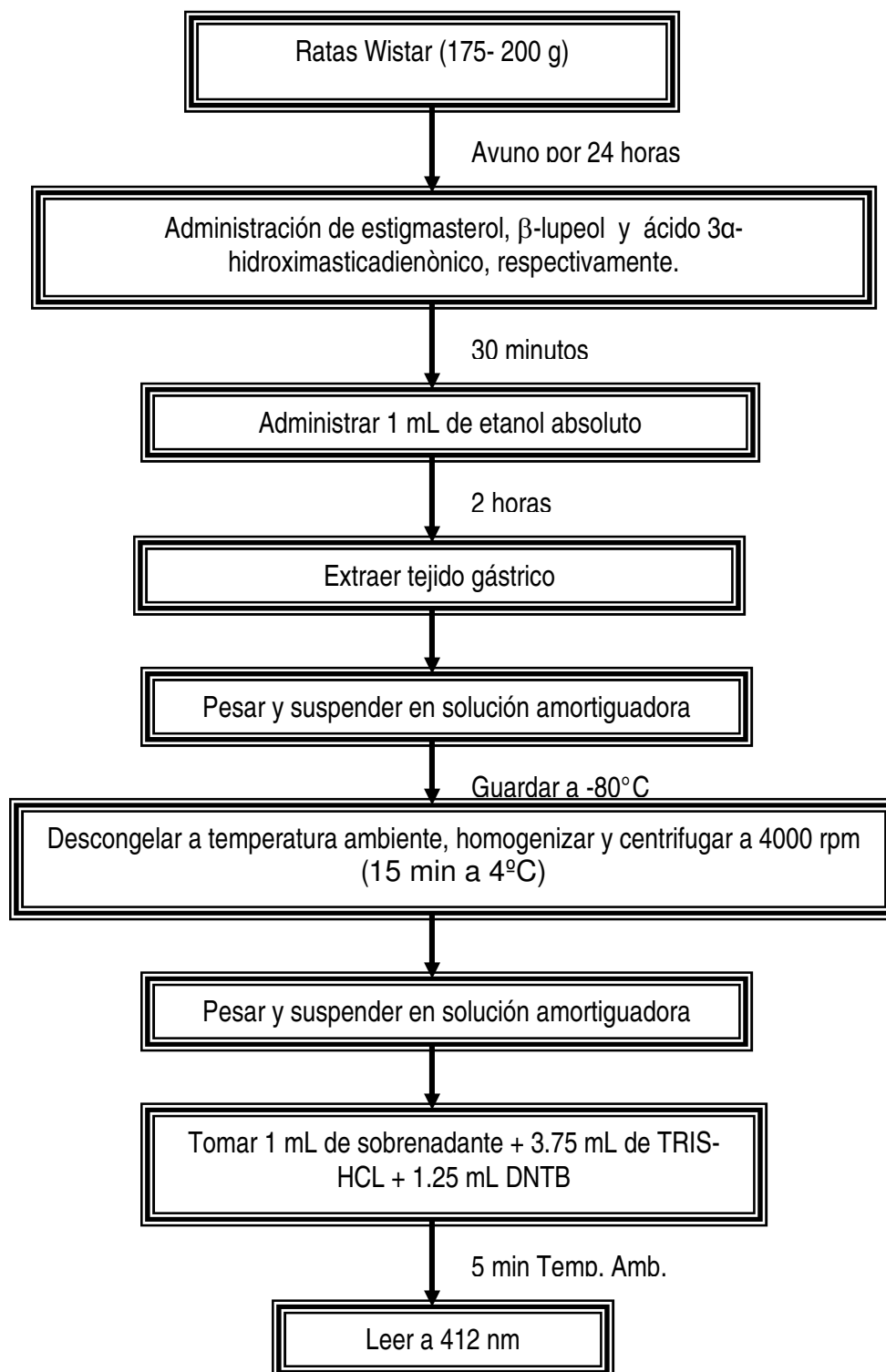


Diagrama 5. Cuantificación de GSH en tejido de estomago de rata con lesiones gástricas inducidas con etanol y pretratadas con estigmasterol, β-lupeol y ácido 3α-hidroxicasticadienónico.

7. RESULTADOS.

7.1. Niveles de nitratos en jugo gástrico.

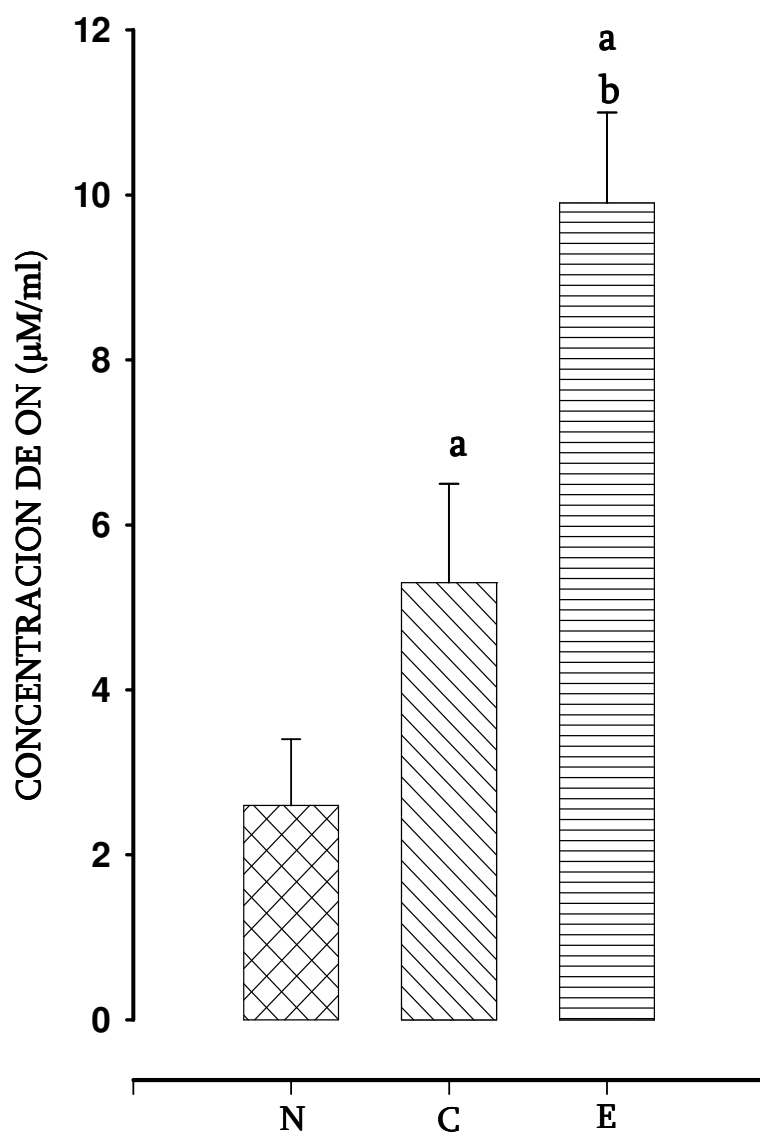
Después de la administración de estigmasterol y β-lupeol los niveles de nitratos se incrementaron notablemente ($9.87 \pm 1.13 \mu\text{M/mL}$ y $10.98 \pm 1.12 \mu\text{M/mL}$ respectivamente) en relación al grupo control tratado con el vehículo ($5.28 + 1.22 \mu\text{M/mL}$) y al grupo normal que no llevó tratamiento ($2.58 \pm 0.81 \mu\text{M/mL}$) como lo indican las Gráficas 1 y 2 respectivamente. Por otro lado para el β-sitosterol los niveles de nitratos ($5.75 \pm 1.07 \mu\text{M/mL}$) no se incrementaron (Gráfica 3), ya que no existe una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control.

7.2. Niveles de TXB₂ en jugo gástrico.

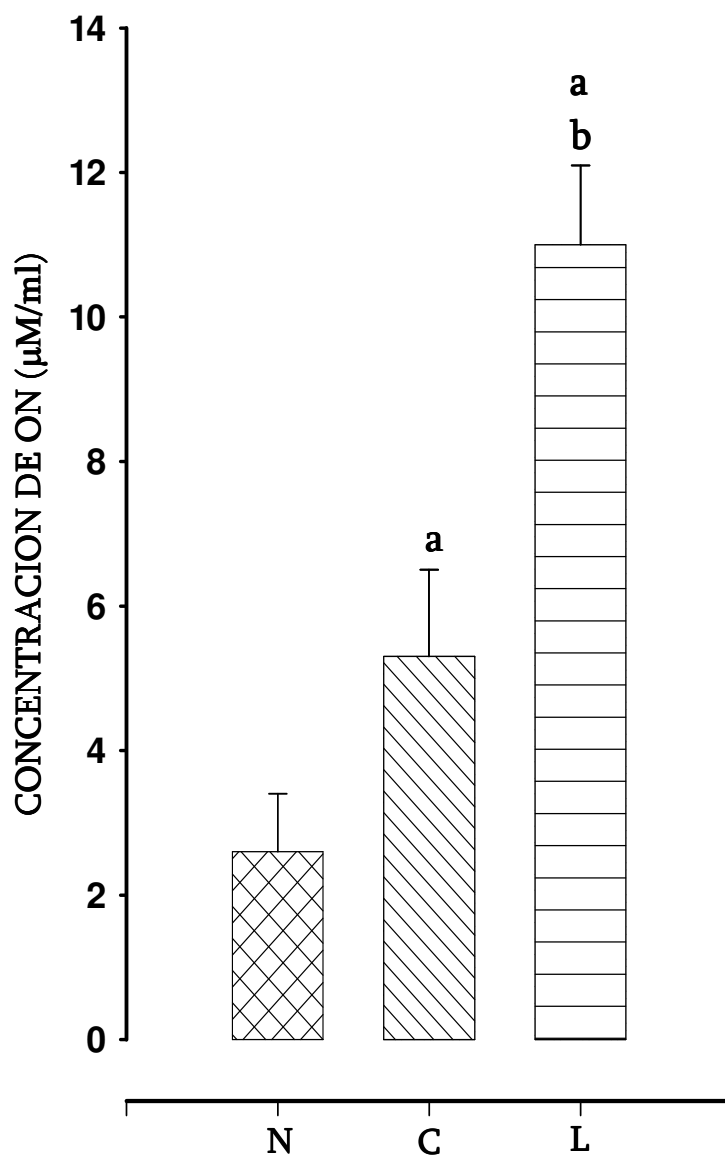
Los niveles de TXB₂ se incrementaron tanto para el grupo control ($829 \pm 105 \text{ pg/mL}$) como para los grupos tratados con 300 mg/kg de estigmasterol ($672 \pm 127 \text{ pg/mL}$, Gráfica 4), 30 mg/kg β-Lupeol ($822 \pm 98 \text{ pg/mL}$, Gráfica 5) y 30 mg/kg β-sitosterol ($732 \pm 90 \text{ pg/mL}$, Gráfica 6) mostrando una diferencia significativa respecto al grupo normal ($233 \pm 50 \text{ pg/mL}$).

7.3. Niveles de LTB₄ en jugo gástrico

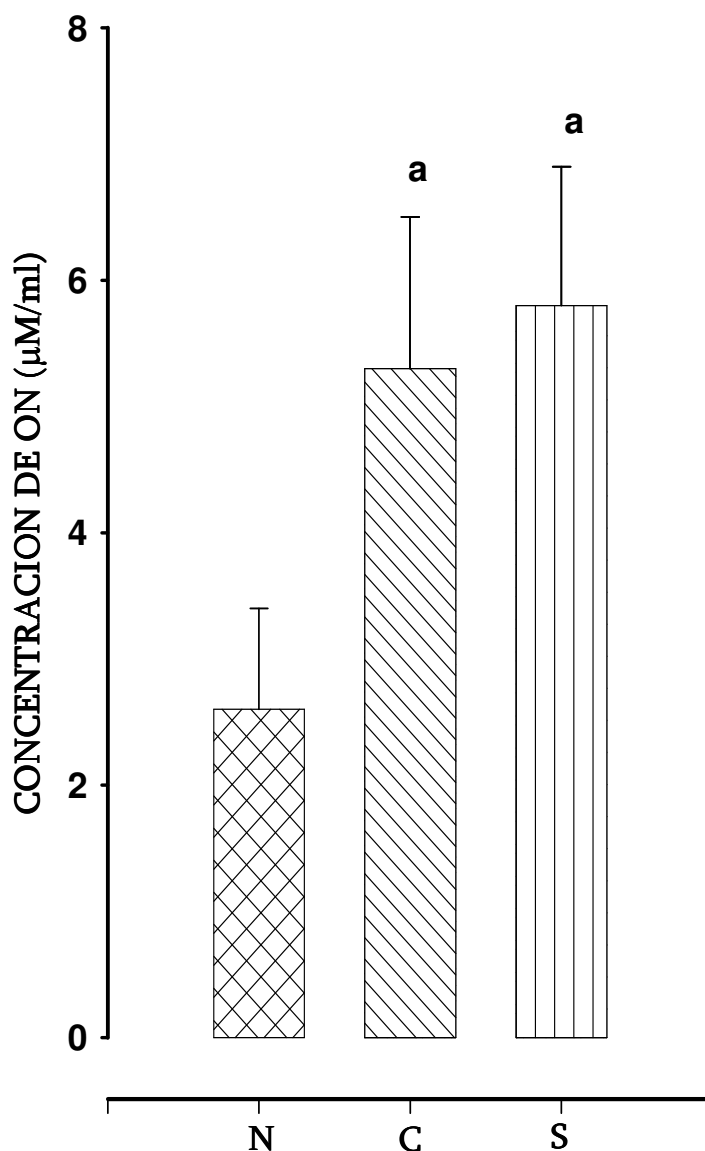
Los resultados obtenidos de los niveles de LTB₄ en ratas pretratadas con estigmasterol ($6954 \pm 63 \text{ pg/mL}$), β-Lupeol ($7550 \pm 231 \text{ pg/mL}$) y β-sitosterol ($7216 \pm 150 \text{ pg/mL}$), se muestran en las Gráficas 7, 8 y 9, donde los niveles de LTB₄ no se incrementaron de manera significativa en ninguno de los casos. Los niveles obtenidos para el grupo control fueron $6799 \pm 131 \text{ pg/mL}$, y para el grupo normal fueron $6534 \pm 146 \text{ pg/mL}$.



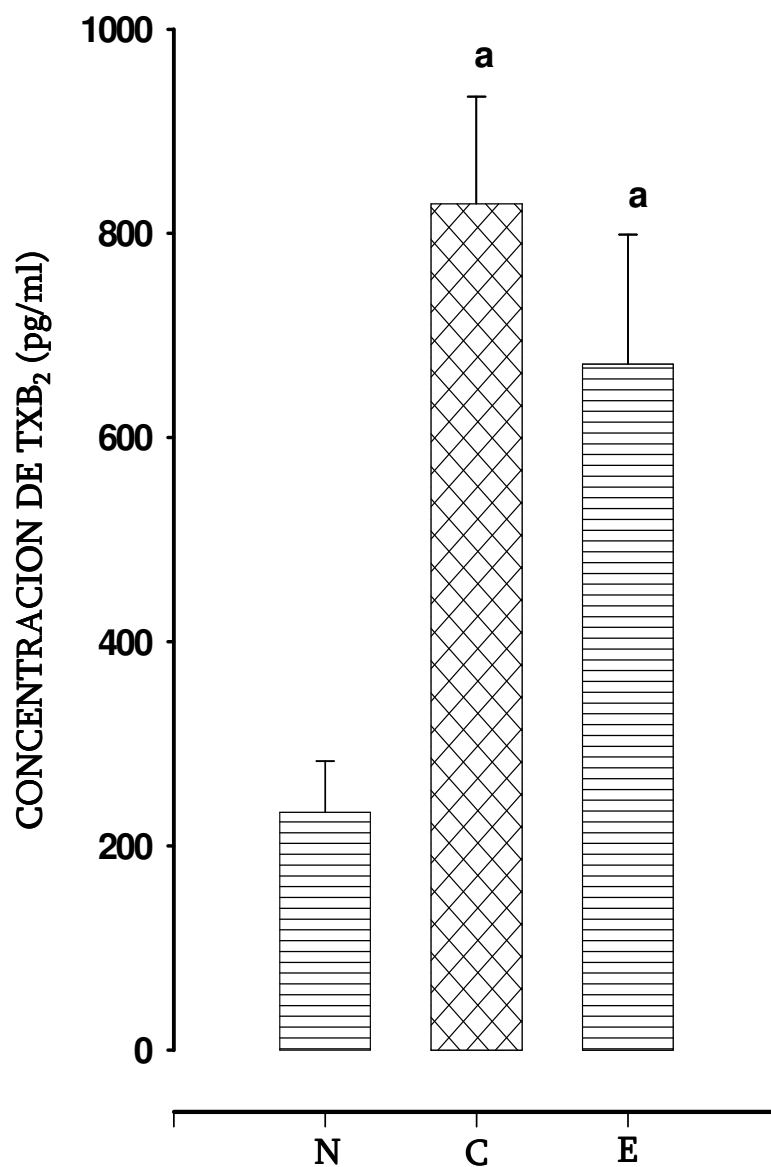
Grafica 1. Niveles de Oxido Nítrico (ON) en jugo gástrico de rata pretratadas con Estigmasterol (E; 300 mg/kg, p.o.) sobre lesiones gástricas inducida con etanol. Cada barra representa la media \pm EEM de al menos seis determinaciones. *a*: indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo Normal (N) y *b* indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo Control (C).



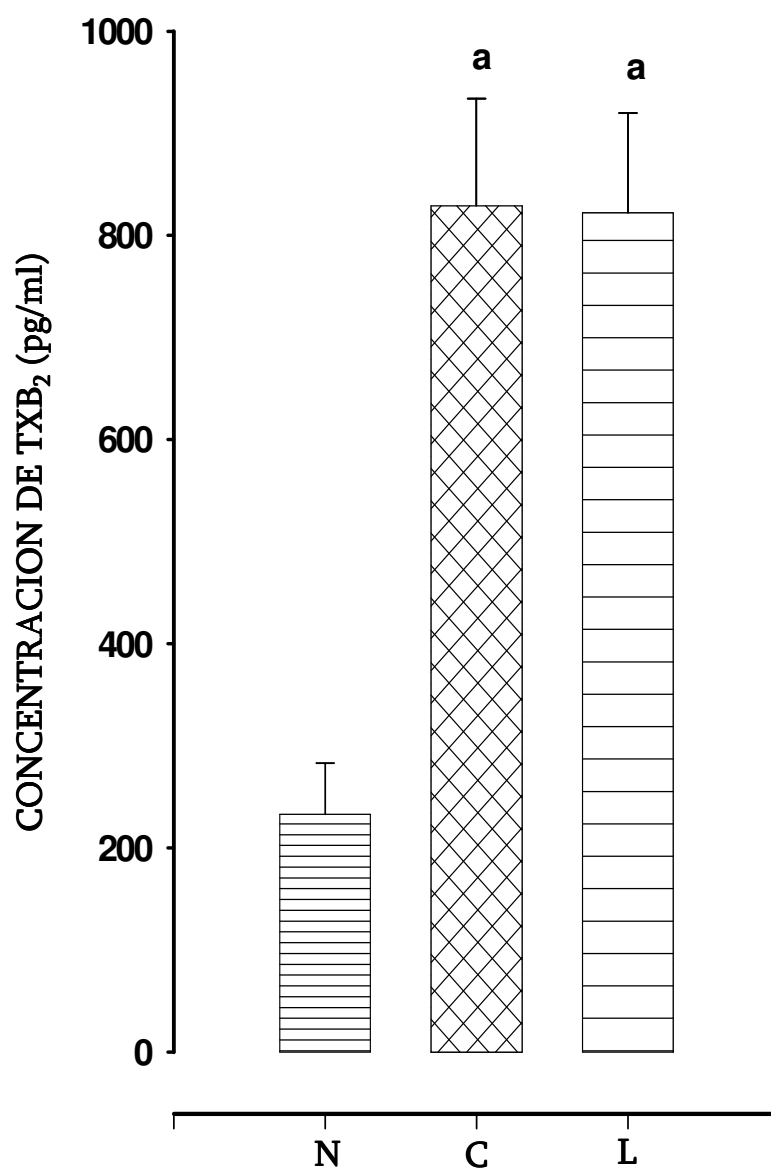
Grafica 2. Niveles de ON en jugo gástrico de rata pretratadas con β - lupeol (L, 30 mg/kg, p.o.) sobre úlcera gástrica inducida con etanol. Cada barra representa la media \pm EEM de al menos seis determinaciones a: indica diferencia significativa con respecto al grupo Normal (N) y b, $p < 0.05$ indica diferencia significativa con respecto al grupo Control (C).



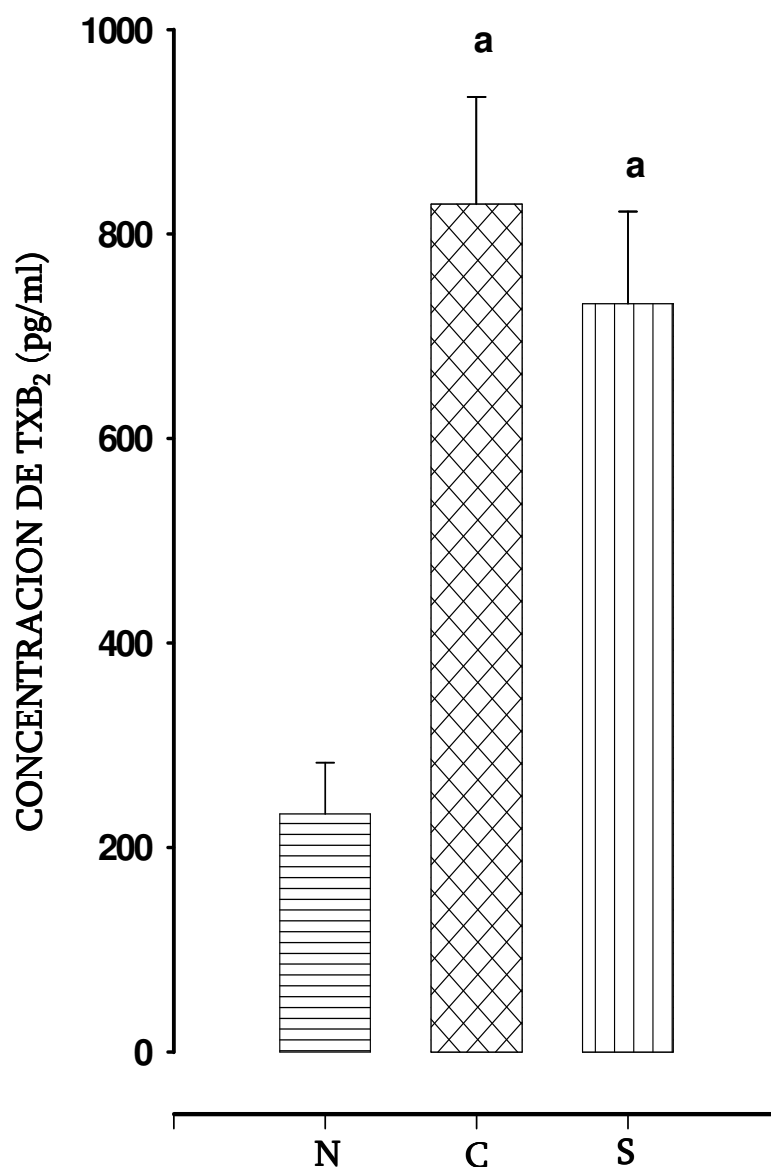
Grafica 3. Niveles de ON en jugo gástrico de rata pretratadas con β -sitosterol (**S**, 30 mg/kg, p.o) sobre las lesiones inducidas con etanol. Cada barra representa la media \pm EEM de al menos seis determinaciones. a: indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo Normal (**N**). **C** = grupo control.



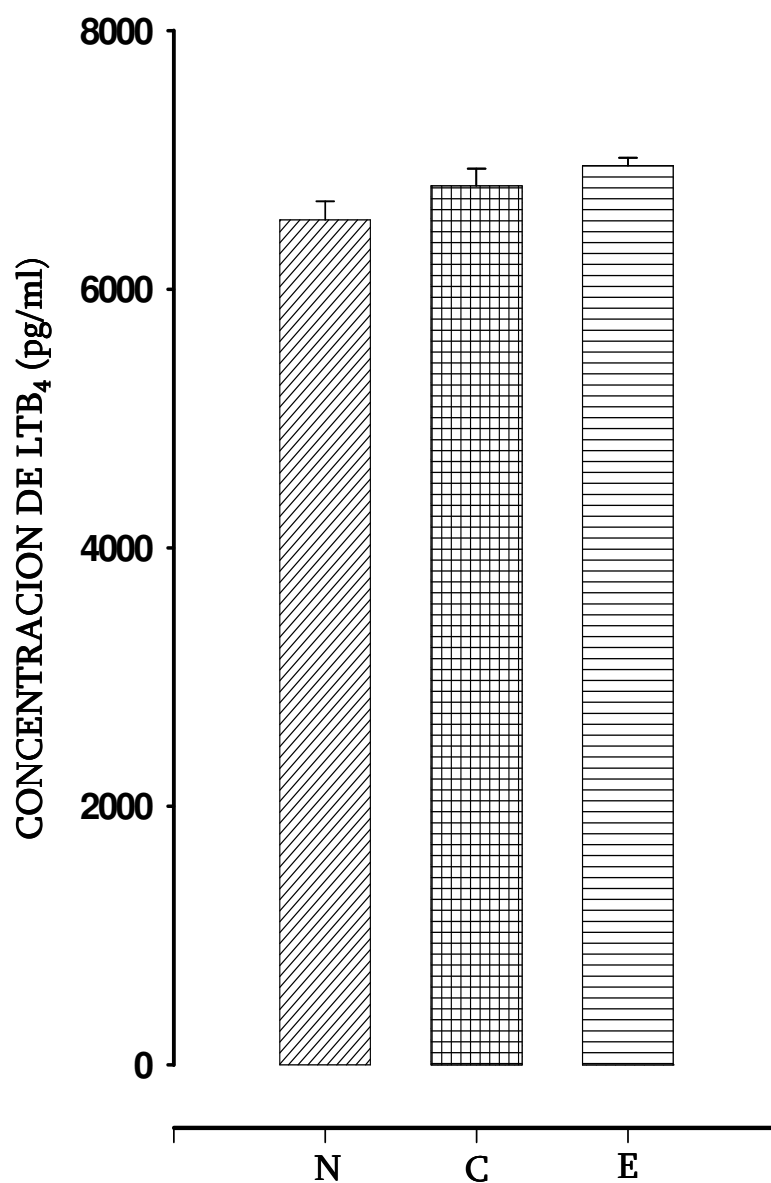
Grafica 4. Niveles de TXB₂ en jugo gástrico de rata pretratadas con Estigmasterol (**E**, 300 mg/kg, p.o.) sobre las lesiones inducidas con etanol. Cada barra representa la media ± EEM de al menos seis determinaciones. *a*: indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo Normal (**N**). **C**= grupo Control.



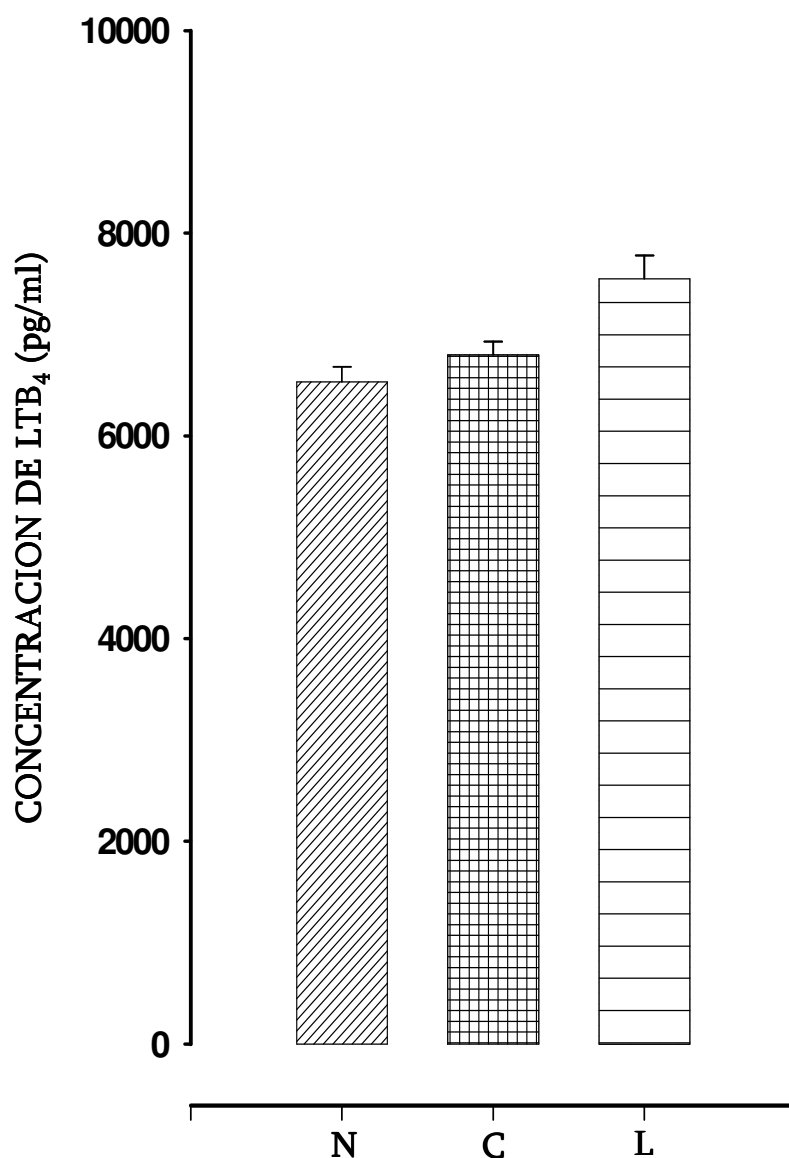
Grafica 5. Niveles de TXB₂ en jugo gástrico de rata pretratadas con β-lupeol (L, 30 mg/kg, p.o.) sobre lesiones inducidas con etanol. Cada barra representa la media ± EEM de al menos seis determinaciones. a: p < 0.05 indica diferencia significativa con respecto al grupo Normal (N). C = grupo control.



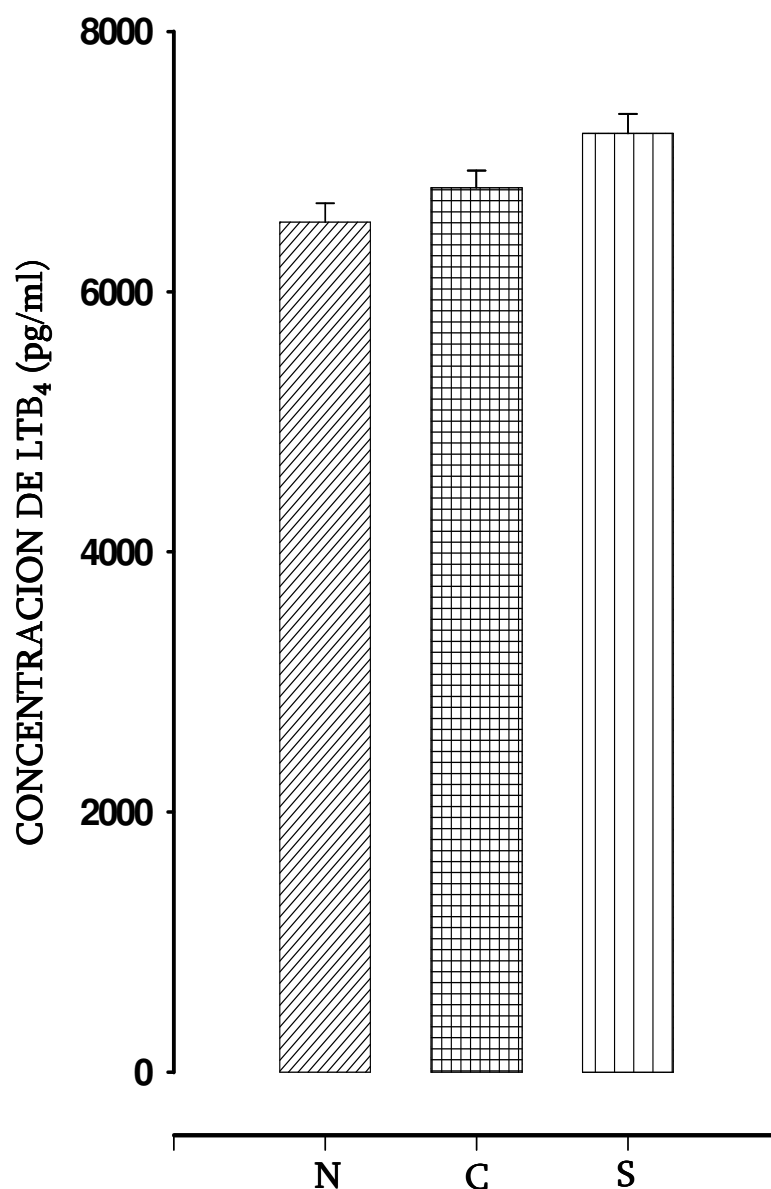
Grafica 6. Niveles de TXB₂ en jugo gástrico de rata pretratadas con β-sitosterol (**S**, 30 mg/kg, p.o.) sobre lesiones inducidas con etanol. Cada barra representa la media ± EEM de al menos seis determinaciones. *a*: $p < 0.05$ indica diferencia significativa con respecto al grupo Normal (**N**). **C**= grupo control.



Grafica 7. Niveles de LTB₄ en jugo gástrico de rata pretratadas con Estigmasterol (**E**, 300 mg/kg, p.o.) sobre lesiones inducidas con etanol. Cada barra representa la media \pm EEM de al menos seis determinaciones. **N** = Grupo Normal y **C** = grupo Control.



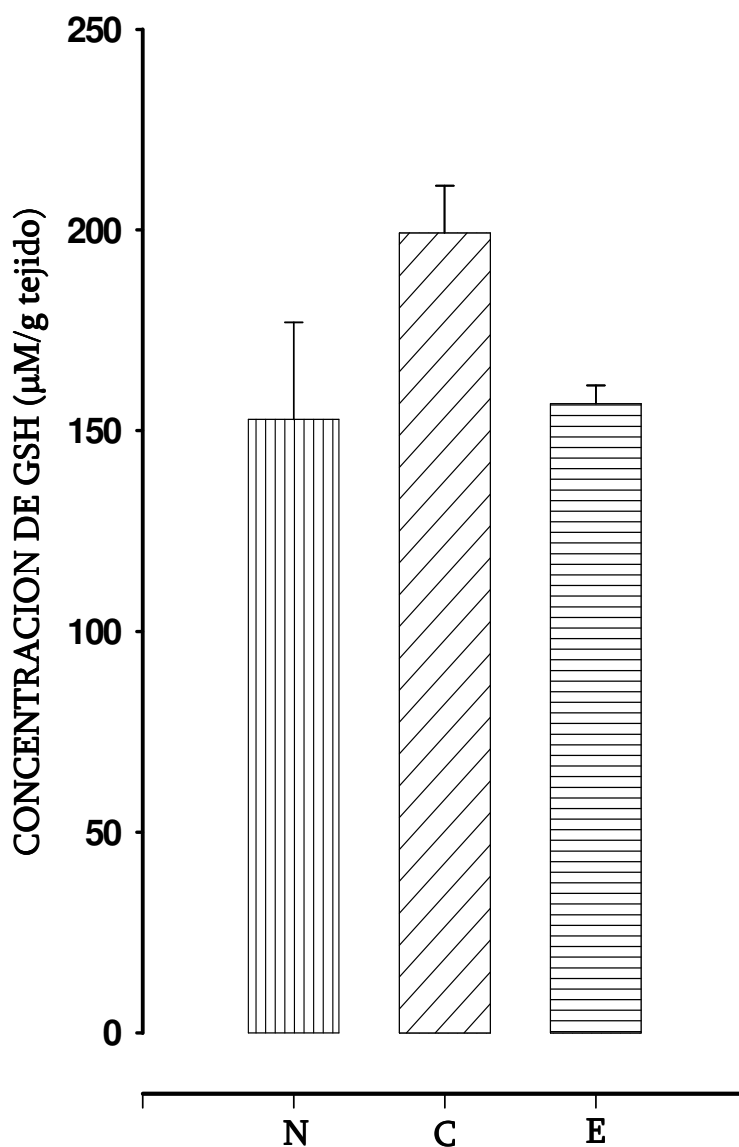
Grafica 8. Niveles de LTB₄ en jugo gástrico de rata pretratadas con β -lupeol (L, 30 mg/kg, p.o.) sobre lesiones inducidas con etanol. Cada barra representa la media \pm EEM de al menos seis determinaciones N = Grupo Normal y C = grupo Control.



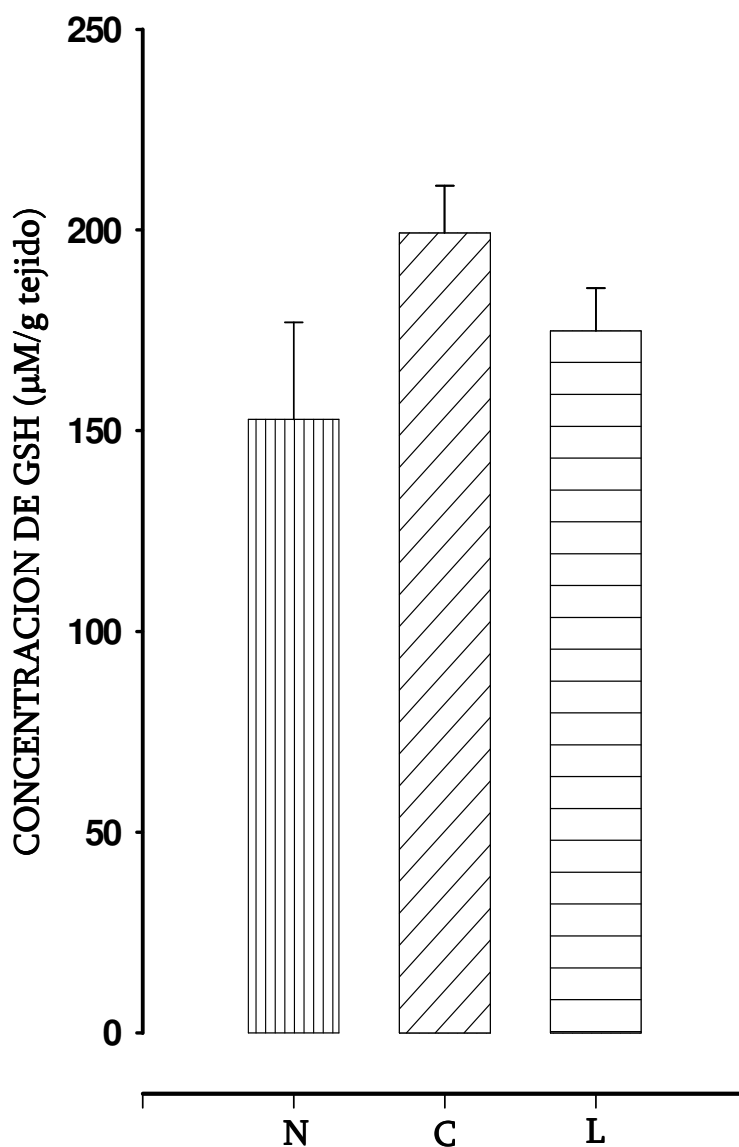
Grafica 9. Niveles de LTB₄ en jugo gástrico de rata pretratadas con β -sitosterol (**S**, 30 mg/kg, p.o) sobre lesiones inducidas con etanol. Cada barra representa la media \pm EEM de al menos seis determinaciones. **N** = Grupo Normal y **C** = grupo Control.

7.4. Niveles de GSH en tejido gástrico.

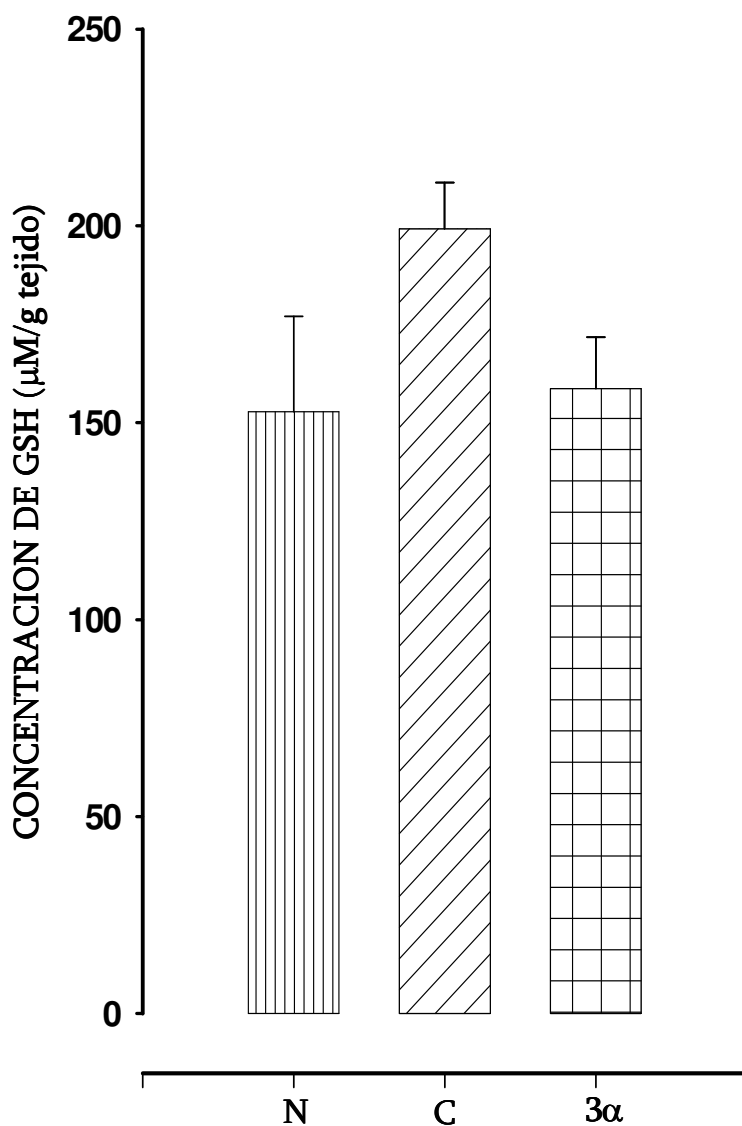
Como se muestra en la Gráfica 10 a 12 los niveles de GSH obtenidos al administrar estigmasterol ($156.77 \pm 4.5 \mu\text{M/g}$ de tejido), β-lupeol ($174.85 \pm 10.58 \mu\text{M/g}$ de tejido) o ácido 3α-hidroximasticadienónico ($158.73 \pm 13.0 \mu\text{M/g}$ de tejido) fueron menores al grupo control ($199.16 \pm 11.77 \mu\text{M/g}$ de tejido), pero no de manera significativa, registrándose niveles similares a los obtenidos con el grupo normal ($152.83 \pm 24.20 \mu\text{M/g}$ de tejido). Durante la etapa de purificación del ácido 3α-hidroximasticadienónico, se aisló e identificó el compuesto ácido 3β-hidroximasticadienónico, el cual mostró niveles de GSH de $172.81 \pm 14.77 \mu\text{M/g}$ en tejido gástrico a la dosis de 30 mg/kg, p. o., encontrándose que tampoco los niveles se incrementan de manera significativa al compararse con el grupo normal y el control de vehículos como se muestra en la Gráfica 13.



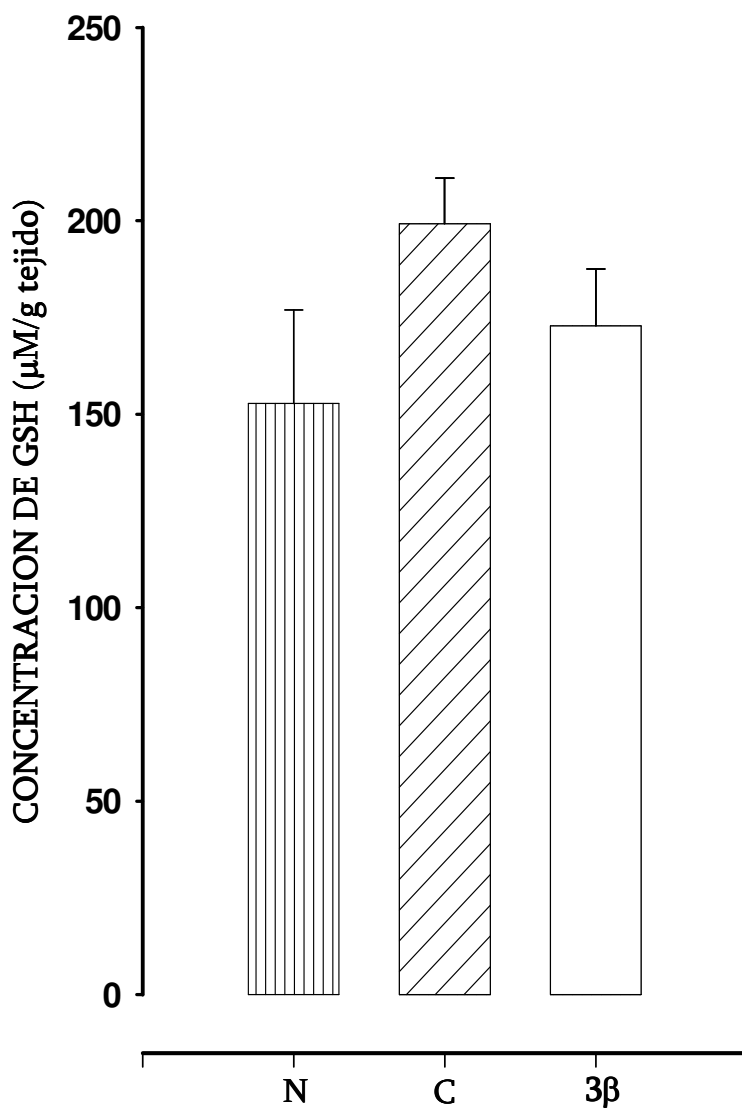
Grafica 10. Niveles de GSH en tejido de estómago de rata pretratadas con Estigmasterol (**E**, 300 mg/kg, p.o.) sobre lesiones gástricas inducidas con etanol. Cada barra representa la media \pm EEM de al menos seis determinaciones. **N** = Grupo Normal y **C** = grupo Control.



Grafica 11. Niveles de GSH en tejido de estómago de rata pretratadas con β -lupeol (L, 30 mg/kg, p.o.) sobre lesiones gástricas inducidas con etanol. Cada barra representa la media \pm EEM de al menos seis determinaciones. **N** = Grupo Normal y **C** = grupo Control.



Grafica 12. Niveles de GSH en tejido de estómago de rata pretratadas con Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**3 α** , 30 mg/kg, p.o.) sobre lesiones gástricas inducidas con etanol. Cada barra representa la media \pm EEM de al menos seis determinaciones. **N** = Grupo Normal y **C** = grupo Control.



Grafica 13. Niveles de GSH en tejido de estómago de rata pretratadas con Ácido 3 β -hidroximasticadienónico (3 β , 30 mg/kg, p.o.) sobre lesiones gástricas inducidas con etanol. Cada barra representa la media \pm EEM de al menos seis determinaciones. **N** = Grupo Normal y **C** = grupo Control.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

8.1. Efecto sobre los niveles de nitratos después de la administración intragástrica de estigmasterol, β-lupeol y β-sitosterol.

El papel que desempeña el óxido nítrico en la defensa y/o daño de la mucosa gastrointestinal ha sido sujeto de muchos estudios (Gianfranco *et. al.*, 2004). Se ha reportado que el óxido nítrico favorece la citoprotección de la mucosa gástrica, a través del incremento del flujo sanguíneo y la inhibición de la liberación de metabolitos oxigenados en la microcirculación gástrica, además regula la producción de prostaglandinas e interactúa con prostanoïdes y neuropéptidos sensoriales, regulando la integridad de la mucosa gástrica (Martin *et. al.*, 2001; Matsuda *et. al.*, 1999). Sin embargo, existen controversias sobre el rol predominante del óxido nítrico en el tracto gastrointestinal: protector o dañino (Wallace *et. al.*, 2001). En el presente estudio se observó que el estigmasterol y el β-lupeol estimulan la producción de óxido nítrico en jugo gástrico del estómago de rata, lo cual sugiere, que el ON esta implicado de manera importante en el mecanismo de acción de estos compuestos, mientras que el β-sitosterol no presentó aumento en los niveles de nitratos, lo que sugiere que el ON no esta implicado en su mecanismo de acción.

8.2. Efecto sobre los niveles de tromboxanos TXB₂ después de la administración intragástrica de estigmasterol, β-lupeol y β-sitosterol.

Los tromboxanos son producidos a partir del ácido araquidónico (vía COX-1), son potentes vasoconstrictores y agonistas para la agregación plaquetaria. Por lo que una reducción en el fluido gástrico potencialmente generaría en la mucosa mayor susceptibilidad al daño gástrico causado por agentes nocivos. Se ha sugerido que los tromboxanos pueden contribuir a la formación de

úlceras gástricas a través de la modulación de la respuesta inflamatoria (Wallace *et. al.*, 2001), además de que los tromboxanos tienen la capacidad de estimular la liberación de los leucotrienos B₄ y la adherencia de leucocitos al endotelio vascular, favoreciendo así el daño gástrico (Wallace *et. al.*, 2001).

Con el desarrollo de inhibidores de la síntesis de tromboxanos, fue posible definir la contribución de estos en las lesiones gástricas en modelos experimentales; donde se ha reportado que los inhibidores de tromboxanos demostraron reducir el daño gástrico inducido por sales biliares o por etanol (Wallace *et. al.*, 2001). Por otro lado Takahashi *et. al.*, (1999), demostró que en el estómago de rata con un alto índice de tejido gástrico dañado, el tromboxano B₂ acelera la cicatrización de las lesiones gástricas por regeneración de la mucosa gástrica. Los niveles de tromboxano B₂ por el pretratamiento con estigmasterol, β- sitosterol y β- lupeol fueron mayores a los del grupo normal lo que sugiere que el tromboxano B₂ participa en la gastroprotección de estos compuestos, que de acuerdo con lo propuesto por Takahashi *et. al.*, (1999), lo que estaría haciendo el tromboxano B₂ sería favorecer la cicatrización.

8.3. Efecto sobre los niveles de leucotrienos LTB₄ después de la administración intragástrica de estigmasterol, β-lupeol y β-sitosterol.

Los leucotrienos LTB₄ son sintetizados a partir del ácido araquidónico por medio de la enzima 5-Lipooxigenasa, que generalmente ocurre en las células epiteliales y endoteliales (Wallace *et. al.*, 2001). En la mucosa gástrica, los leucotrienos LTB₄ estimulan la liberación de metabolitos reactivos del oxígeno que contribuyen al daño del tejido gástrico asociado con la inflamación. Se reporta que los leucotrienos no parecen producir ulceración gástrica, pero pueden favorecer el daño gástrico inducido por agentes tales como etanol y

ácido en ratas (Wallace *et. al.*, 1990). Se han propuesto dos teorías para tratar de explicar la participación del LTB₄ en el daño gástrico; una de ellas propone que los leucotrienos pueden incrementar la susceptibilidad de la mucosa al daño gástrico debido a una reducción del flujo sanguíneo en la mucosa gástrica; la otra sugiere que el efecto del LTB₄ está relacionado con otros mecanismos nocivos para la mucosa gástrica (Wallace *et. al.*, 1990). La administración previa del estigmasterol, β -sitosterol y β -lupeol no incrementaron los niveles de LTB₄, con respecto a los niveles normales, lo cual sugiere que estos compuestos no disminuyen los niveles del LTB₄ por lo tanto no participan en su mecanismo de acción.

8.4. Efecto sobre los niveles de grupos sulfhidrilos (GSH) después de la administración intragástrica de estigmasterol, β -lupeol, ácido 3 α -hidroximasticadienónico y 3 β -hidroximasticadienónico.

Los grupos sulfhidrilo han sido implicados significativamente en la conservación de la integridad gástrica, particularmente cuando las especies reactivas de oxígeno son involucradas en la fisiología del daño gástrico. Los radicales libres derivados del oxígeno son asociados con las lesiones gastrointestinales, y los antioxidantes previenen la formación de lesiones inducidas por varios agentes necrosantes (Pongpiriyadacha *et. al.*, 2003; Gianfranco *et. al.*, 2004).

El daño gástrico inducido por etanol está asociado a una reducción significativa en los niveles de GSH en la mucosa gástrica de seres humanos y en animales experimentales (Gianfranco *et. al.*, 2004; Takeuchi *et. al.*, 1989). Además, la administración de GSH previene el daño gástrico inducido por etanol en seres humanos y aquellos tratamientos con compuestos donadores de GSH protegen

a la mucosa gástrica contra el daño provocado por agentes necrozantes, estrés o isquemia (Gianfranco *et. al.*, 2004).

Se ha reportado además, que los incrementos o la disminución de GSH endógenos pueden inducir citoprotección contra el daño inducido por etanol, y que la prevención o agravación de estas lesiones puede estar asociado con el incremento de la permeabilidad vascular o la inhibición de la motilidad gástrica (Takeuchi *et. al.*, 1989).

La administración de estigmasterol, ácido 3 α -hidromasticadienónico, β -lupeol y el ácido 3 β -hidroximasticadienónico no modificaron los niveles de GSH en la mucosa gástrica, lo que sugiere que el mecanismo gastroprotector de estos compuestos es distinto a la participación de los grupos GSH endógenos.

9. CONCLUSIONES.

Las conclusiones que se desprenden del presente trabajo son las siguientes:

1. Los niveles de nitratos en jugo gástrico de rata se incrementaron significativamente al ser pretratadas con estigmasterol y β-lupeol, pero no así con el β-sitosterol; en el modelo de inducción de lesiones gástricas con etanol.
2. Los niveles de TXB₂ y LTB₄ en jugo gástrico no se modificaron por el tratamiento con estigmasterol, β-lupeol y β-sitosterol.
3. Los niveles de grupos sulfhidrilo en tejido gástrico no se modificaron por el tratamiento con estigmasterol, β-lupeol, ácido 3α-hidroxicasticadienónico y ácido 3β-hidroxicasticadienónico.

10. PERSPECTIVAS.

1. Evaluar la actividad gastroprotectora del estigmasterol, β-lupeol, ácido 3α-hidroxicasticadienónico y el ácido 3β-hidroxicasticadienónico utilizando **inhibidores de PGE₂, COX y GSH**, respectivamente; sobre lesiones gástricas inducidas con etanol en rata Wistar y cuantificar los niveles PGE₂, GSH, TXB₂ y LTB₄ para conocer más acerca de sus mecanismos de acción.
2. Sintetizar los derivados metilado, acetilado, succínico y ftalato del ácido 3β-hidroxicasticadienónico y evaluar su actividad gastroprotectora.
3. Desarrollar un método analítico para aislar e identificar el ácido 3α-hidroxicasticadienónico y su isómero el ácido 3β-hidroxicasticadienónico.

BIBLIOGRAFÍA

Allen A., Flemstrom G., Garner A., Kivilaakso E. (1993). Gastroduodenal mucosal protection. *Pharmacol. Rev.* 73:823-857.

Arrieta J., Benítez J., Flores E., Castillo C., Navarrete A. (2003). Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Medica.* 69:905-909.

Arrieta J., Sánchez-Mendoza ME., Castillo-Henkel C., Navarrete A. (2006). Role of endogenous prostaglandins in gastroprotection of β -sitosterol and four derivative esters on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Proc. Wets. Pharmacol. Soc.* 49:130-33.

Atay S., Tarnawski A., Dubois R. (2000). Eicosanoids and the stomach. *Prost. Other. Lip. Mediat.* 61:105-124.

Ballesteros M. (2000). Úlcera péptica y *Helicobacter pylori*. Resultados y consecuencias de su erradicación. *Rev. Gastroenterol. Méx.* 65 (supl. 2):41-49.

Brunton L. (1996). Fármacos para el control de la acidez gástrica y el tratamiento de úlceras pépticas. Editor Goodman Guilman A. En las bases farmacológicas de la terapéutica, tomo I pp. 965-1001.

Catalayud S., Borrachina D., Espulgues J. (2001). Nitric oxide: relation to integrity, and healing of the gastric mucosa. *Microscopy Research and technique*.53:325-335.

Chang D., Young T., Hsu C., Kuo S., Hsieh T. (2001). Endoscopic Comparison of the gastroduodenal safety and the effects on arachidonic acid products between meloxicam and piroxicam in the treatment of osteoarthritis. *Clinical Rheumatology*. 20:104-113.

Chao J., Liu K., Chen S., Fang C., Tsao C. (2003). Effect of oral epidermal growth factor on mucosal healing in rats with duodenal ulcer. *World Journal of Gastroenterology*. 9:2261-2265.

Flores E. (2003). Participación del óxido nítrico, grupos Sulfhidrilos y prostaglandinas en el efecto gastroprotector del ácido 3 α -hidromasticadienónico. Tesis profesional Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. (UNAM). pp. 10-13.

Gianfranco N., Lazzeri G., Lubrano V., Colucci R., Vassalle C., Fornai M., Blandizzi C., Del Tacca M. (2004). Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. *Toxicology and applied Pharmacology* 195:62-72.

Gupta, M., Nath, R., Gupta, G. y Bhargava, K. (1981). *Ind. J. Res.* 73:649-652.

Hawkey CJ, Kemp RT, Walt RP, Bhaskar NK, Davies J, Filipowicz B.(1988). Evidence that adaptive cytoprotection in rats is not mediated by prostaglandins. *Gastroenterology* **94**:948–954.

Hoogerwef, W. A. y Pasricha, P.J. (2001). Agents used for control of gastric and treatment of peptic ulcers and gastroesophageal reflux disease. In J.G. Hardman L.L. Limbird y A.G. Gilman (eds). Goodman and Gilman. The pharmacological basis of therapeutics 10th ed. McGraw-Hill. USA. 1005-1020.

Huang JQ, Hunt RH (2000). Treatment of acute gastric and duodenal ulcer. In M Wolfe, ed., Therapy of Digestive Disorders. Philadelphia: W.B. Saunders. pp. 113–126

Jones MK, Itani RM, Wang H, Tomikawa S, Sarfeh IJ, Szabo S, Tarnawski A.(1999). Activation of VEGF and Ras genes in gastric mucosa during angiogenic response to ethanol injury. *Am. J.Physiol.* 276(39):G1345-G1355, 1999.

Ka-Shun Ko J., Cho C., Lam S. (2004). Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. *World Journal of Gastroenterology* 10(17):2503-2508.

Konturek S. (1990). Mechanisms of gastroprotection. *Scand. J. Gastroenterol.* 25 (Suppl. 174):15-28.

Konturek S., Brzozowski T., Piastucki I., Radecki T., Dupuy D., Szabo S. (1987). Gastric mucosal protection by agents altering gastric mucosal sulfhydryls. *Dig.* 37:65-71.

Konturek P., Brzozowski Z., Sliwowski R., Pajdo J., Stachura E., Hahn G. (1998). Involvement of nitric oxide and prostaglandins in gastroprotection induced by bacterial lipopolysaccharide. *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* 33:691-700.

Konturek P., Brzozowski T., Meixner H., Ptak A., Hahn E., Konturek S. (2001). Central and peripheral neural aspects of gastroprotective and ulcer healing effects of lipopolysaccharides. *Journal of physiology and Pharmacology.* 52(4 pt 1):611-623.

Kumar V. (1995). *Patología humana.* Ed. Mc. Graw Hill, quinta edición, México pp. 505-509.

Lam S. (1984). Patogénesis and pathophysiology of duodenal ulcer. *Clin. Gastroenterol.* 13:451-469.

Lloyd S. (1988). *Fisiopatología, principios biológicos de la enfermedad.* Ed. Médica Panamericana, México pp. 1071-1087.

Martin M., Jimenez M., Motilva V. (2001). New issues about Nitric Oxide and its effects on the gastrointestinal tract. *Current Pharm. Design.* 7:881:903.

Matsuda, H., Li, Y., y Yoshikawa, M. (1999). Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic. And oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci.* 65:27-32.

Montgomery D. (1991). Diseño y análisis de experimentos. Grupo editorial iberoamerica. 85 – 118.

Navarrete A, Martínez Uribe LS, Reyes B. (1998). Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytotherapy Research*; 12:1-4.

Navarrete A., Trejo Miranda JL., Reyes Trejo L. (2002). Principles of root bark of *hippocratea excelsa* (hippocrataceae) with gastroprotective activity *Journal of Ethnopharmacology*. 79:383-388.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Estados Unidos Mexicanos. SAGARPA.

Parente L., Perreti M. (2003). Advances in pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes spotlight. *Biochem Pharmacol.* 65:153-159.

Peek R, Blaser M. (1997). Pathophysiology of helicobacter pylori-induced gastritis and ulcer peptic. American Journal of Medicine. 102:200-207.

Peskar B. (2001). Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defense. J. Physiol. Paris. 95:3-9.

Pongpiriyadacha Y., Matsuda H., Morikawa T., Asao Y., Yoshikawa M. (2003). Protective effects of polygodial on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents in rats and the posible mechanism of action. Biol. Pharm. Bull. 26:651-657.

Puente Martínez P., Iglesias M., Sacristán de Lama M., Juan Garciasola A. (1995). Incidencia de utilización de la somatostatina en indicaciones no aprobadas por la dirección general de farmacia y productos sanitarios. Farmacia Hospitalaria. 19 (4): 215-218

Robert A. (1987). Sistemas reguladores: prostaglandinas. Editor Edward B. En Gastroenterología, en tomo VII. pp. : 4877-4884.

Rodríguez H., Karma J., Guerrero F. (2000). Factores de riesgo para la recurrencia de la úlcera péptica. Gac. Méd. Méx. 137:303-310.

Salvemini D. (1997). Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. Cell. Mol. Life. Sci. 53:576-582.

Sánchez L.M. (2003). Actividad Gastroprotectora de estigmasterol sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas Wistar. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Sandoval A. (2004). Involucramiento de las prostaglandinas, óxido nítrico y grupos sulfhidrilo en el mecanismo de acción gastroprotector del β -Lupeol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Colima.

Sedlak J., Lindsay. (1968). Estimation of total, protein bound, and non protein sulfhydryl groups in tissue with ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25:192-205.

Shorrock C., Rees W. (1988). Overview of gastroduodenal mucosal protection. *Am. J. Med.* 84(suppl. 2A): 25-34.

Snykers, F. y Fourie, T. (1989). *Eur. Patent* EP 93520. EN. 100:39613.

Sobko Y., Reidenrs C., Norin E., Midtvedt T., Gustafsson L., Lunberg J. (2004). Gastro-intestinal nitric oxide generation in germ-free and conventional rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 203:1-21.

Sodeman, A. y Sodeman, M. (1988). Fisiopatología clínica. Mecanismos de producción de los síntomas. 7ª ed. Ed. Interamericana. México, D. F.

Soll A. (1994). Úlceras gástrica, duodenal y por estrés. Editores Sleinsenger M., Fordtran J., Scharschmidet B., Feldman M. Y Cello J. En Enfermedades gastrointestinales fisiopatología, diagnostico y tratamiento, tomo I pp. 623-624.

Spiro M. (1987). Peptic ulcer is not disease-only a sign. J. Clin. Gastroenterol. 9:623.

Szabo S., Golberg I. (1990) Experimental pathogenesis: drugs and chemical lesions in the gastric mucosa. Scand. J. Gastroenterol. 25(suppl. 174):1-8.

Szabo S., Trier J., Frankel P. (1981). Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. Sci. 214:200-202.

Takahashi S., Shigeta J., Ishikawa M., Kobayashi N., Okabe S.(1999). Role of thromboxane A2 in healing of gastric ulcers in rats. Japan Journal of Pharmacology. 79:101-107.

Takeuchi K., Okada M., Niiida H., Okabe S. (1989). Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol: relation to microvascuolar permeability, gastric motiity and cytoprotection. J. Pharmacol. Exp. Therap. 248:836-841.

Tsukimi Y., Okabe S. (2001). Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. Biol. Pharm. Bull. 24:1-9.

Wallace J. (1990). Lipid mediators of inflammation in gastric ulcer. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 258:1-11.

Wallace J., Ma L. (2001). Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. Exp. Biol. Med. 226: 1003-1015.