

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE VITAMINA E  
EN LA RECUPERACIÓN DE UNA GASTRITIS  
SUBCRÓNICA INDUCIDA POR ETANOL EN RATAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M.EN C. MARISELA OLGUÍN MARTÍNEZ.**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ**

**MÉXICO, D.F.**

**MAYO 2007**



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.

# EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE VITAMINA E EN LA RECUPERACIÓN DE UNA GASTRITIS SUBCRÓNICA INDUCIDA POR ETANOL EN RATAS

## RECONOCIMIENTOS

Para la realización de este proyecto se contó con el apoyo de CONACYT.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo formado por:

Dr. Rolando Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Mauricio Díaz Muñoz	Instituto de Neurobiología, UNAM.
Dr. Julio Moran Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

## AGRADECIMIENTOS

Una vez más y por siempre,  
**al Dr. Rolando Hernández Muñoz,**  
por su generosidad y entusiasmo en el trabajo,  
su cordialidad y respeto.  
Por compartir su tiempo y sus conocimientos.  
Por escuchar y dar siempre comentarios oportunos  
para aprender, pensar y también para sonreír,  
haciendo este camino más interesante y agradable.  
Gracias por su amistad, Gracias por su existencia.

## AGRADECIMIENTOS

***A mis padres,***

Yolanda Martínez Sánchez y Alfredo Olguín García,  
la educación que me dieron, sus errores y omisiones  
que me permitieron llegar aquí.

***A José Manuel Anaya Pérez,***

por estar junto a mi, por su ayuda,  
su comprensión su amistad y  
sobre todo por su paciencia.

***A Judith Catalina Navarro Gómez,***

por su amistad incondicional y  
por esos maravillosos momentos de café.

***A Francisco Javier de la Mora Bravo,***

por su alegría y por su optimismo.

***A mis compañeros de laboratorio:***

Edgar Mendieta Condado, por su ayuda  
para el desarrollo de este trabajo;  
Juan Antonio Suárez Cuenca, Serafín Ramírez  
y María de Lourdes Sánchez Sevilla, a todos ellos  
porque durante estos años se volvieron parte de mi vida.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>GENERALIDADES</b> .....	6
<b>Especies Reactivas de Oxígeno</b> .....	6
Anión superóxido .....	6
Peróxido de Hidrógeno .....	6
Radical hidroxilo .....	7
Radical peróxilo .....	7
<b>Fuentes de las especies reactivas de Oxígeno</b> .....	8
Metabolismo mitocondrial .....	8
NADPHoxidasa .....	8
Sistema de citocromo P450 .....	9
Xantina Oxidasa .....	9
Peroxisomas .....	9
<b>Acción de las especies reactivas de oxígeno</b>	
<b>Sobre biomoléculas</b> .....	9
Lípidos .....	9
Proteínas .....	10
Ácidos nucleicos .....	11
<b>Antioxidantes</b> .....	11
Antioxidantes enzimáticos .....	11
Superóxido Dismutasa .....	11
Sistema del glutatión .....	12
Catalasa .....	12
Antioxidantes no enzimáticos .....	13
Carotenos .....	13
Vitamina C .....	13
Polifenoles .....	13
Vitamina E .....	14
<b>Estrés oxidativo</b> .....	16
<b>Papel fisiológico de las especies</b>	
<b>Reactivas de oxígeno</b> .....	16
<b>Etanol</b> .....	17
<b>El estómago</b> .....	18
<b>Daño gástrico inducido por etanol</b> .....	20
<b>ANTECEDENTES</b> .....	22
<b>HIPÓTESIS</b> .....	23
<b>OBJETIVO</b> .....	23
<b>METODOLOGÍA</b> .....	24
Modelo animal .....	24
Aislamiento de fracciones	
Subcelulares de mucosa gástrica .....	24
Determinación de $\alpha$ -tocoferol .....	26
Ensayo para lipoperoxidación y	
Grupos carbonilo en proteínas .....	26

Estimación de la síntesis de DNA y Proliferación celular compensatoria Después de retirar el etanol -----	26
Morfometría -----	27
Determinación de antioxidantes Endógenos -----	27
Ensayo de eventos apoptóticos -----	27
Análisis de ciclina D1 por "western blot" -----	28
Estadística -----	28
<b>RESULTADOS</b> -----	29
Contenido de $\alpha$ -tocoferol en la mucosa gástrica -----	29
Cambios en los parámetros oxidativos en la mucosa Gástrica de animales con gastritis y Tratados con vitamina e -----	29
Efecto de la vitamina E sobre la recuperación de la Masa de la mucosa y sobre la capacidad proliferativa y de síntesis de DNA de las células gástricas -----	33
Defensas antioxidantes en la mucosa Gástrica de animales control y de ratas con gastritis tratados o no con vitamina E -----	37
Eventos apoptóticos en las células de la Mucosa gástrica de animales con gastritis y tratados con $\alpha$ -tocoferol -----	39
Niveles de ciclina D1 en animales con gastritis tratados o no con $\alpha$ -tocoferol -----	41
<b>DISCUSIÓN</b> -----	43
<b>CONCLUSIÓN</b> -----	48
<b>REFERENCIAS</b> -----	49

Palabras Clave: alfa-tocoferol, gastritis, antioxidantes, estrés oxidativo, proliferación celular.

## ABREVIATURAS

ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
BHT	Hidroxitolueno butilado
BrdU	Bromodeoxiuridina
CAT	Catalasa
Cdk4	Cinasa dependiente de ciclina
CD	Dienos conjugados
CEHC	2,5,7,8-tetrametil-2(2'-carboxietil)-6-hidroxicromano
Cu/Zn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente decobre y zinc
DNA	Acido desoxiribonucléico
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERK	Cinasa de regulación extracelular
EROS	Especies reactivas de oxígeno
GSH	Glutati3n reducido
GSHPx	Glutati3n peroxidasa
GSHRx	Glutati3n reductas
GSSG	Glutati3n oxidado
4-HNE	4-Hidroxinonenal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
JNK	Cinasa termal-c-jun
LP	Lipoperoxidaci3n
MAPKs	Proteína cinasa activadora de mit3genos
MDA	Dialdehído mal3nico
MEOS	Sistema microsomal de oxidaci3n de etanol
Mn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucle3tido
NADH	Nicotinamida adenina dinucle3tido reducido
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucle3tido reducido
NFKB	Factor nuclear k B
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ani3n superoxido
ODC	Ornit3n descarboxilasa
OH	Radical hidroxilo
p38 MAPK	Proteína cinasa activadora de mit3genos p38
PKC- $\alpha$	Proteína cinasa C-alfa
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
PRB	Proteína de retinoblastoma
ROO <sup>•</sup>	Radical per3xilo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante-beta
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral-alfa
TK	Timid3na cinasa
XO	Xantina oxidasa



## RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno se forman continuamente en el organismo y son potencialmente dañinas para la integridad celular; para limitar la exposición a estas especies, la célula ha desarrollado un sistema complejo de defensa antioxidante. Cuando el incremento de agentes oxidantes en el organismo es excesivo y la capacidad antioxidante es insuficiente, se produce un estado de estrés oxidativo el cual puede generar daño celular y está involucrado en la patogénesis de diversas enfermedades incluyendo las lesiones gástricas. Sin embargo, se tiene evidencia de que las especies reactivas de oxígeno también participan en los procesos fisiológicos normales como proliferación celular, envejecimiento y apoptosis..

Se ha desarrollado un modelo de gastritis crónica inducida por la administración de etanol en ratas que se caracteriza por un perfil histológico y que se acompaña por el incremento en el nivel de lipoperoxidación. Después de retirar el etanol estas alteraciones se revierten gradualmente y se lleva a cabo la regeneración epitelial. Sin embargo, durante el periodo de recuperación, se presenta un aumento adicional de lipoperoxidación que coincide en temporalidad con el incremento en la proliferación celular. Lo que sugiere que la proliferación compensatoria al daño gástrico está regulada por los eventos lipoperoxidativos.

El presente estudio se llevo a cabo para analizar la participación del estrés oxidativo durante la proliferación compensatoria de la mucosa gástrica que se presenta en el periodo de recuperación del daño inducido por el etanol, para ello se utilizó la vitamina E como antioxidante.

Los animales con gastritis recibieron una dosis diaria de vitamina E (12, 24 y 100 UI/kg de peso) durante 4 días. Se realizó un análisis morfométrico y se determinaron parámetros indicativos de estrés oxidativo, proliferación celular, eventos apoptóticos y actividades de antioxidantes endógenos (Glutación y superóxido dismutasa) en la mucosa gástrica de los grupos experimentales.

Durante el periodo de recuperación la restitución de la superficie epitelial coincidió con un incremento en el nivel de lipoperoxidación, de proliferación celular y fue seguido por una apoptosis activa. Con la administración de dosis elevadas de vitamina E (100 UI/kg) se presentó un claro efecto antioxidante acompañado de la reducción en la proliferación celular y de eventos apoptóticos tempranos, a pesar de que la vitamina E también promovió el incremento de los antioxidantes endógenos. Los indicadores de

proliferación celular mostraron una correlación inversa con los eventos apoptóticos en los animales con gastritis, y esta correlación se perdió al administrar vitamina E probablemente al alterar la traslocación de la ciclina D1 activa al interior del núcleo. Este trabajo proporciona evidencia que sugiere que un estrés oxidativo moderado es necesario para la progresión de la proliferación celular durante la recuperación del daño gástrico.

En conclusión, la administración de  $\alpha$ -tocoferol inhibe la proliferación celular y favorece los eventos apoptóticos en la mucosa gástrica dañada por etanol. Además, los eventos lipoperoxidativos parecen sincronizar los eventos proliferativos y apoptóticos. Por lo que la temporalidad, la localización y la magnitud de la producción de especies reactivas de oxígeno son factores importantes para determinar el destino de las células

**ABSTRACT**

Reactive oxygen species and lipid peroxidation (LP) have been implicated in the pathogenesis of ethanol-induced gastric damage; however, they are also involved in physiological processes, such as cell proliferation and apoptosis. We have characterized an experimental model of ethanol-induced chronic gastritis in which a compensatory mucosal cell proliferation is apparently regulated by lipoperoxidative events. Therefore, the present study is an attempt to further assess the participation of oxidant stress during gastric mucosa proliferation, by administering  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) to rats with gastritis. A morphometric analysis was done, and parameters indicative of oxidant stress, cellular proliferation (including cyclin D1 levels), apoptotic events, and activities of endogenous antioxidant systems were measured in gastric mucosa from our experimental groups. After ethanol withdrawal, restitution of surface epithelium coincided with increased LP which was followed by an active apoptosis. High  $\alpha$ -tocopherol dosing (100 IU/kg b.w.) showed a clear antioxidant effect, abolished cell proliferation, and promoted an early and progressive apoptosis, despite vitamin E also enhancing levels of endogenous antioxidants (Mn-SOD activity and total glutathione amount). Indicators of cell proliferation inversely correlated with apoptotic events, and this relationship was blunted by administering vitamin E, probably by affecting translocation of active cyclin D1 into the nucleus. The present study provides evidence suggesting that a moderate oxidant stress could be a necessary modulatory event to the progression of cell proliferation during the healing of ethanol-gastric damage. In conclusion,  $\alpha$ -tocopherol administration inhibited cell proliferation, leading to a predominance of apoptotic events in ethanol-induced gastric damage. Therefore, the timing and magnitude of lipoperoxidative events seemed to synchronize *in vivo* cell proliferative and apoptotic events, probably by changing cell redox state.

## INTRODUCCIÓN

Históricamente, las especies reactivas de oxígeno (EROS) se han visto como compuestos tóxicos capaces de causar daño a macromoléculas como lípidos, proteínas y DNA produciendo la muerte celular, mutaciones y otras toxicidades. Existe evidencia de que las EROS y otros radicales libres participan en el desarrollo de una variedad de enfermedades o situaciones tóxicas (1), tales como la exposición a agentes como el etanol. Sin embargo, para contrarrestar los efectos dañinos de los radicales libres las células cuentan con sistemas antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos, predominantemente la superóxido dismutasa (SOD) y el glutatión, los cuales llegan a ser las principales defensas antioxidantes contra las EROS, manteniendo un balance en el estado oxidativo celular (1).

En contraste con el bien reconocido daño celular, se ha propuesto que las EROS, como superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), también participan de manera esencial en las vías de señales celulares, al modular algunos procesos fisiológicos, como la proliferación celular, la diferenciación, el envejecimiento y la apoptosis (1,2). Evidencia directa para este concepto, se basa en el hecho de que la exposición a bajos niveles de EROS puede incrementar la respuesta al crecimiento de varios tipos de células de mamíferos incluyendo fibroblastos (1) y células endoteliales (3). Los antioxidantes pueden proteger a las células contra los efectos tóxicos producidos por altas concentraciones de EROS; sin embargo, también pueden inhibir las funciones fisiológicas normales de las EROS. Se ha reportado que los antioxidantes suprimen la proliferación celular normal en fibroblastos (4), células de músculo liso (5), células epiteliales (6) y líneas celulares cancerosas (7,8). De esta manera, muchos de los procesos celulares parecen depender del balance entre la concentración intracelular de especies prooxidantes y compuestos antioxidantes, lo que sugiere que la remoción total de EROS no necesariamente resulta ventajoso para las células. Más bien, el mantener cierto nivel de EROS es importante para una adecuada función celular. Sin embargo, cuando la producción de EROS excede la capacidad antioxidante, las células pueden entrar en lo que se denomina estrés oxidativo (8).

Está bien documentado que altas concentraciones de etanol son capaces de dañar a la mucosa gástrica (3,8). El etanol promueve exfoliación epitelial, episodios rápidos y fuertes de isquemia-reperusión, incrementos en la generación de EROS, y

alteraciones en el estado redox intracelular. Además, el etanol también disminuye los niveles de antioxidantes endógenos durante el daño a la mucosa gástrica (10, 11).

Se ha desarrollado un modelo de daño crónico a la mucosa gástrica inducido por la ingestión continua de etanol, que se caracteriza por un perfil histológico, alteraciones en las membranas plasmáticas de la mucosa gástrica (12) y que se acompaña por el incremento en el nivel de radicales libres y lipoperoxidación (LP). Al suspender la administración de etanol estas alteraciones se revierten gradualmente y se lleva a cabo la regeneración epitelial. Sin embargo, durante el periodo de recuperación se presenta una segunda elevación de LP en las membranas plasmáticas de la mucosa gástrica, la cual coincide en temporalidad con la proporción de proliferación celular (11).

Estos resultados han llevado a proponer que las modificaciones peroxidativas controladas de las membranas plasmáticas podrían tener un papel importante en la proliferación celular compensatoria de la mucosa gástrica que ocurre después del daño, lo que sugiere que la presencia de una elevación de LP estrictamente controlada, participa en la progresión de la proliferación celular más que reflejar un daño gástrico (11).

Debido a lo anterior, se podría esperar que la administración *in vivo* de antioxidantes modifique la progresión de esta proliferación celular compensatoria y la recuperación de la mucosa gástrica dañada por la administración de etanol en ratas.

Entre los diversos antioxidantes, la vitamina E es una familia de moléculas de cuales el  $\alpha$ -tocoferol es el más importante desde el punto de vista bioquímico y fisiológico. Su papel como atrapador de radicales libres en las membranas biológicas es bien conocido y es considerado como el antioxidante liposoluble más potente y capaz de proteger a las membranas biológicas contra la LP (13).

Este estudio se llevó a cabo con el propósito de investigar si la administración intragástrica de vitamina E disminuye la LP que se presenta en las membranas plasmáticas y si esto tiene un efecto diferencial en la proliferación celular compensatoria y en la recuperación de la mucosa gástrica dañada por la administración crónica de etanol en ratas.

## GENERALIDADES

### ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las especies reactivas de oxígeno (EROS) son moléculas derivadas de la reducción incompleta del oxígeno e incluyen algunos radicales libres, los cuales se definen como especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados y que pueden existir de manera independiente. Debido a esta configuración los radicales libres son compuestos inestables, altamente reactivos, de vida corta y con la capacidad de abstraer un electrón de otro sustrato orgánico. Estas moléculas se sintetizan en bajas concentraciones y se degradan por los procesos fisiológicos normales en todos los organismos aeróbicos (14). Entre las EROS que se forman dentro de la célula se encuentran:

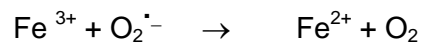
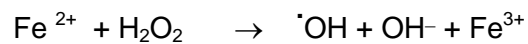
**Anión Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ):** El anión superóxido se forma por la reducción univalente del oxígeno molecular y por la acción de sistemas enzimáticos como el de xantina oxidasa, NADPH oxidasa y por la cadena respiratoria mitocondrial. El  $O_2^{\cdot-}$  es poco reactivo y no es particularmente dañino para el organismo. Sin embargo, es precursor de otras especies reactivas como peróxido de hidrógeno; además, puede actuar como reductor de metales de transición, producir el ión ferroso a partir del ión férrico, y reaccionar con el peróxido de hidrógeno para formar compuestos oxidantes más potentes como el radical hidroxilo (14).

Aunque su producción en muchos casos es accidental, en otros muestra un papel funcional como ser vasoconstrictor del músculo liso y bactericida en las células fagocíticas.

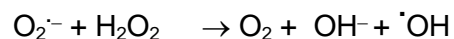
**Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ):** Este compuesto no tiene electrones desapareados, por lo que no es un radical libre, pero está dentro de las EROS. Puede formarse por la reducción parcial del oxígeno con dos electrones, por la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  o bien, por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). A diferencia del  $O_2^{\cdot-}$ , el  $H_2O_2$  puede difundirse a través de las membranas celulares. Presenta una reactividad limitada pero es capaz de promover la producción de radicales hidroxilo al reaccionar con iones de metales de transición (14).

**Radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ):** Es un compuesto altamente reactivo de difusión limitada; se considera el oxidante más potente en los sistemas biológicos debido a que reacciona fácilmente con las moléculas biológicas como lípidos, proteínas y DNA. Cuando este radical se genera cerca de las membranas biológicas, puede atacar a los ácidos grasos y producir lipohidroperóxidos que se descomponen en una serie de compuestos tóxicos como aldehídos.

La generación de  $\cdot\text{OH}$  puede llevarse a cabo por la reacción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con de metales de transición, principalmente  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , a través de la reacción denominada de Fenton; en esta reacción el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  participa en el reciclamiento de los iones metálicos. La fuente de los metales de transición puede ser proteínas como la ferritina al interactuar con el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .



El radical hidroxilo también puede producirse por la reacción de Haber-Weiss donde reacciona el superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (14):



**Radical peróxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ):** Los radicales hidroxilo interactúan con carbohidratos, proteínas y lípidos y, producen radicales  $\text{ROO}\cdot$  como intermediarios. Estos radicales son ligeramente menos reactivos que el  $\cdot\text{OH}$  pero pueden dañar a las biomoléculas. El ejemplo mejor caracterizado es la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados iniciada por  $\cdot\text{OH}$  (14).

Otras EROS son el oxígeno singulete, óxido nítrico, anión peróxinitrito y el ácido hipocloroso.

## FUENTES DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

Son muchas y variadas las fuentes de especies reactivas de oxígeno y radicales libres, y éstas pueden ser endógenas o exógenas. Algunas de las EROS surgen como subproductos no deseados de las reacciones entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras se generan *in vivo* con un fin determinado como el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $H_2O_2$ , producidos por las células fagocíticas activadas.

Entre las fuentes endógenas se encuentran la mitocondria, el metabolismo a través del citocromo P450, los peroxisomas y la activación de células inflamatorias (15). Entre las fuentes exógenas están: radiaciones ionizantes, humo de cigarro, solventes orgánicos, fármacos y pesticidas.

**Metabolismo mitocondrial:** Se considera una de las principales fuentes de EROS. A pesar de que la cadena de transporte electrónico es altamente eficiente, un pequeño porcentaje (1-5%) de los electrones que pasan a través de la cadena respiratoria se combinan con moléculas de oxígeno y forman  $O_2^{\cdot-}$  y, posteriormente  $H_2O_2$  y  $\cdot OH$ . La producción de  $O_2^{\cdot-}$  mitocondrial se incrementa cuando la concentración de oxígeno aumenta o cuando la cadena respiratoria está muy reducida, como en los periodos de isquemia y posterior reperusión.

En la cadena respiratoria hay dos sitios de producción de  $O_2^{\cdot-}$ , una es la ubiquinona y la otra la NADH deshidrogenasa (15).

**NADPH oxidasa:** En diferentes células y particularmente en las células fagocíticas, macrófagos y neutrófilos del sistema inmune se encuentra el sistema de NADPH oxidasa que al activarse genera cantidades importantes de  $O_2^{\cdot-}$  subsecuentemente se forman  $H_2O_2$  y  $\cdot OH$ . Los radicales de oxígeno producidos por la NADPH oxidasa, contribuyen a la destrucción de agentes infecciosos de modo directo, o se combinan con haluros en presencia de la mieloperoxidasa dando lugar a agentes más reactivos, como el hipoclorito, el cual también actúa como oxidante antimicrobiano. La producción masiva de EROS en condiciones inflamatorias se denomina “estallido respiratorio” y tiene un papel importante como primera línea de defensa contra organismos patógenos.



En la respuesta inflamatoria también participan otras enzimas como la 5-lipooxigenasa y ciclooxigenasa, involucradas en la generación de  $H_2O_2$  (14).

**Sistema de citocromo P450:** Se localiza en el retículo endoplásmico, cataliza la oxigenación de una variedad de compuestos exógenos como medicamentos, solventes y anestésicos y, de compuestos endógenos como colesterol, ácidos biliares y ácidos grasos.

Este sistema requiere de dos electrones que son transferidos al citocromo P450 por la flavoproteína NADPH-P450 reductasa; los electrones activan al oxígeno y este se inserta en el sustrato, durante este proceso se libera  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  (16,17).

**Xantina oxidasa:** En condiciones fisiológicas normales esta enzima se encuentra como xantina deshidrogenasa que oxida a la xantina y produce NADH, no teniendo lugar la producción de EROS. Durante periodos de isquemia esta enzima se convierte en xantina oxidasa (XO) por oxidación o por proteólisis. La XO cataliza la reacción de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico; en estas reacciones la XO puede transferir electrones al oxígeno y producir  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  (15).

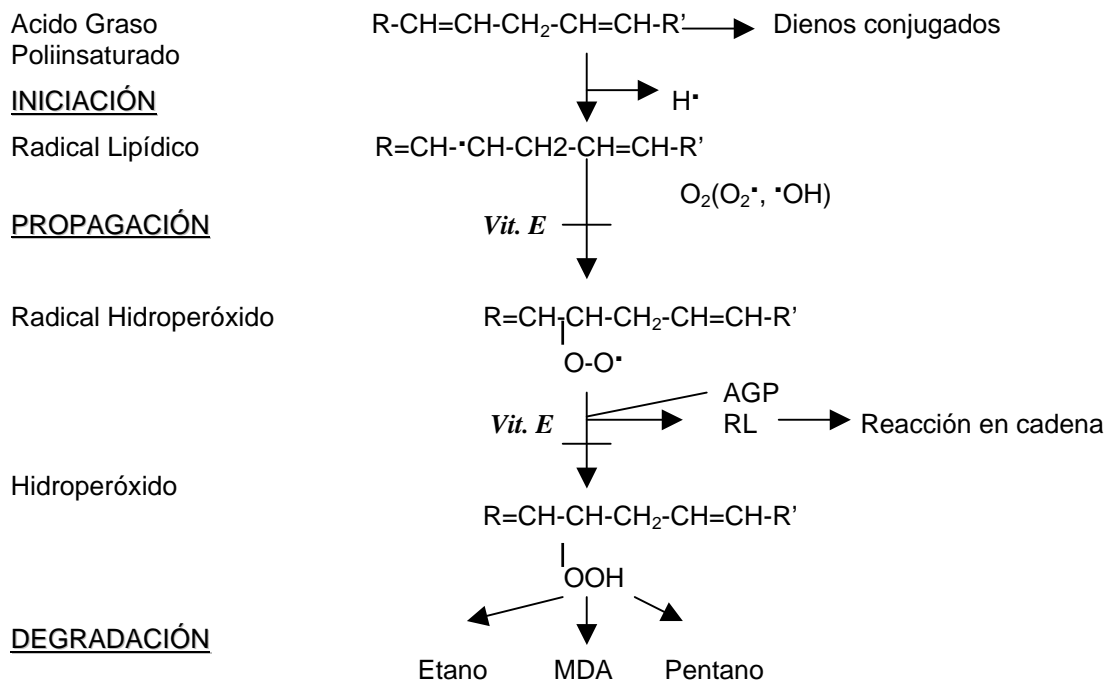
**Peroxisomas:** Participan el metabolismo de ácidos grasos y durante este proceso generan peróxido de hidrógeno como subproducto (18).

## **ACCIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO SOBRE BIOMOLÉCULAS.**

Las EROS se forman continuamente en el organismo y pueden ser dañinas para la integridad celular debido a que pueden reaccionar con las biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Estas reacciones pueden alterar la fluidez de las membranas, el transporte de iones, la actividad enzimática y la función celular normal.

**Lípidos:** Los ácidos grasos poliinsaturados son particularmente susceptibles a modificaciones por EROS debido a la presencia de dobles enlaces. La lipoperoxidación (LP) es particularmente destructiva, ya que se desarrolla como una reacción en cadena. Se inicia cuando las EROS atacan un ácido graso poliinsaturado y le extraen un átomo de hidrógeno al grupo metileno adyacente al doble enlace, para formar el radical acilácido graso (Fig.1; 19).

Los productos finales de la LP son lípidos peroxidados que al degradarse originan nuevos radicales libres y una variedad de compuestos citotóxicos como los aldehídos 4-hidroxinonenal (4-HNE), malondialdehído (MDA) e hidrocarburos (pentano y hexano). Estos subproductos pueden modificar a las proteínas (aminoácidos) y a los ácidos nucleicos (purina, pirimidina) (19).



**Fig 1. Reacción de lipoperoxidación iniciada por la sustracción de un hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado dejando un electrón desapareado en el átomo de carbono.** El lípido puede reaccionar con oxígeno o alguna EROS para formar un radical hidroperóxido; el hidroperóxido puede abstraer un átomo de hidrógeno de otros lípidos y continuar la reacción en cadena. Generando una variedad de productos como etano, pentano y MDA. La vitamina E puede terminar esta reacción en cadena en diferentes etapas al donar un átomo de hidrógeno y formar ella misma un radical. El radical de vitamina E es poco reactivo comparado con los radicales lipídicos. (20)

**Proteínas:** La oxidación de proteínas se inicia principalmente por  $\cdot OH$ , aunque también puede llevarse a cabo por metales como fierro y cobre; este proceso depende de la proximidad del radical a la proteína y de la concentración de antioxidantes disponible. Las mayores modificaciones que producen los radicales libres de oxígeno en las proteínas son alteraciones químicas irreversibles en el esqueleto protéico, fragmentación de la cadena y oxidación de aminoácidos con la producción de grupos carbonilo (aldehídos y

cetonas), cambios en su estructura tridimensional, fragmentación, agregación o entrecruzamiento, pérdida de actividad y finalmente la degradación protéica (19).

**Ácidos nucleicos:** El  $\cdot\text{OH}$  puede reaccionar fácilmente con ácidos nucleicos produciendo cambios estructurales como modificación en las bases púricas y en los componentes de azúcar produciendo entrecruzamientos y ruptura de la cadena. Estos efectos son potencialmente mutagénicos (19).

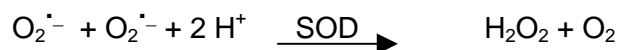
### **ANTIOXIDANTES.**

Debido a que las EROS y otras formas de radicales libres se producen constantemente durante los procesos metabólicos, la célula ha desarrollado un sistema complejo de defensa antioxidante para limitar la exposición a estas especies. Los antioxidantes celulares están armónicamente integrados para proveer el máximo de protección y pueden dividirse en enzimáticos y no enzimáticos.

#### **Antioxidantes enzimáticos:**

Existen varias enzimas destinadas a convertir las EROS en especies menos reactivas o en moléculas inocuas antes de que promuevan la generación de productos capaces de dañar a las estructuras celulares. Entre las enzimas antioxidantes se encuentran:

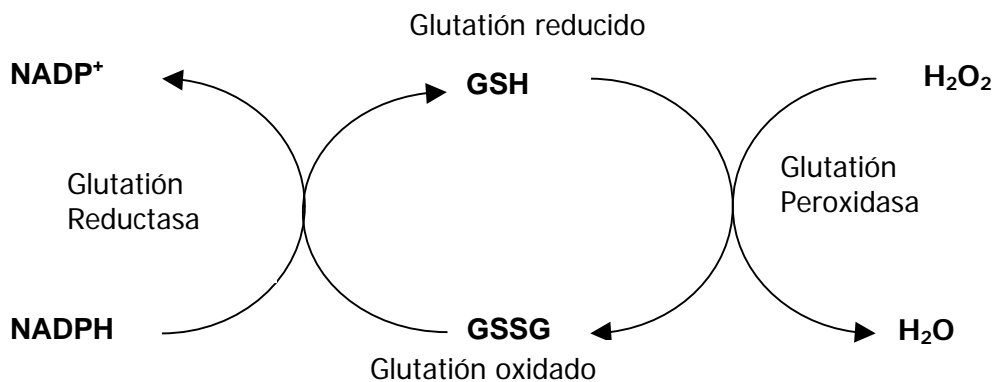
**Superóxido dismutasa (SOD):** Esta enzima cataliza la remoción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  al convertirlos en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual puede ser removido por glutatión o por catalasa (21).



La SOD es una enzima que abunda en una variedad de tejidos como hígado, riñón, corazón, estómago e intestino. Se han descrito diferentes tipos de SOD caracterizadas por su localización en las células y por el ión metálico que requieren para su función; la Cu/Zn-SOD se localiza en el citosol, tiene dos subunidades de 32 Kda. El cobre se reduce de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  y luego es oxidado a  $\text{Cu}^{2+}$ . La Mn-SOD se encuentra en la matriz mitocondrial, es un homotetrámero (96 Kda); el manganeso que contiene se oxida a  $\text{Mn}^{2+}$  y durante el proceso de dismutación regresa a  $\text{Mn}^{3+}$ . Se ha informado que la Mn-SOD es esencial para la vida celular (21).

**Sistema del glutatión:** Este compuesto por el tripéptido glutatión (formado por glutamato, cisteína y glicina), la enzima glutatión peroxidasa (GSHPx), la glutatión reductasa (GSHRx), y NADPH. Este sistema se localiza en la matriz mitocondrial y en el citosol; en su función antioxidante, el glutatión es capaz de actuar como atrapador de radicales  $O_2^{\cdot-}$ , o como cofactor de GSHPx para mediar la detoxificación de  $H_2O_2$  a través de reacciones enzimáticas, donde se oxida a glutatión disulfuro por la enzima GSHPx y el glutatión oxidado se recicla por la enzima GSHRx dependiente de NADPH (Fig. 2; 22).

La capacidad del glutatión para atrapar  $O_2^{\cdot-}$  está limitada por la acción de la SOD, que compite por este sustrato en el ambiente celular, por lo que la reacción directa de glutatión con  $O_2^{\cdot-}$  podría tener mayor importancia bajo condiciones de estrés oxidativo, donde el nivel de actividad de SOD es deficiente (22).



**Fig. 2. El ciclo de glutatión es una de las vías antioxidantes más importantes utilizadas por las células.** Bajo condiciones de estrés oxidativo (causado por  $H_2O_2$ ) el glutatión reducido (GSH) se oxida por la acción de la enzima glutatión peróxidasa (GSHPx) y forma GSSG. Para mantener los niveles adecuados de GSH, el GSSG se debe reducir a GSH por la enzima glutatión reductasa (GSHRx), esta reacción utiliza como equivalentes reductores a los hidrógenos de NADPH procedente de la vía metabólica de glucosa (22).

**Catalasa:** La catalasa es una enzima tetramérica que contiene hierro y se encuentra principalmente en los peroxisomas y en las mitocondrias; esta enzima cataliza la reacción entre dos moléculas de peróxido de hidrógeno para formar agua y oxígeno.



Esta función es compartida con la enzima GSHPx. En general, bajas concentraciones de  $H_2O_2$  estimulan la actividad de peroxidasas, mientras que altas concentraciones de peróxido son degradadas preferentemente por la catalasa (21).

**Antioxidantes no enzimáticos:**

Los antioxidantes no enzimáticos, en general, bloquean la formación de hidroperóxidos, interrumpen la propagación de la LP y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular. El mecanismo de acción involucra la donación de un electrón a un radical libre con el fin de estabilizarlo. Algunos de los compuestos no enzimáticos que actúan como antioxidantes son la vitamina C, carotenos, vitamina E y flavonoides.

**Carotenos:** Las plantas y los microorganismos tienen la capacidad de sintetizarlos mientras que los animales superiores los adquieren de los alimentos. Son compuestos liposolubles que pueden reaccionar con  $O_2^{\cdot-}$  y  $\cdot OH$  entre otros, durante su reacción forman el radical carotenilo el cual puede ser reciclado por ácido ascórbico o por el  $\alpha$ -tocoferol. Sin embargo, la principal función que se ha establecido para los carotenos es la de ser precursores de la vitamina A (23).

**Vitamina C (ácido ascórbico):** Es un compuesto hidrosoluble que se localiza en el citosol. Puede aceptar electrones y reaccionar directamente con el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $\cdot OH$ . Durante este proceso se forma el ácido dehidroascórbico, el cual puede ser reducido a ascorbato por el glutatión; puede actuar en forma sinérgica con el  $\beta$ -caroteno y el  $\alpha$ -tocoferol, regenerando a este último a partir del radical tocoferoxilo (24).

**Polifenoles:** Los compuestos fenólicos incluyen una gran cantidad de metabolitos contenidos en las plantas, entre los que se encuentran: los flavonoides (catequinas), ácidos fenólicos (ácido caféico) y estilbenos (resveratrol) (25). Estos compuestos pueden atrapar  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$  y radicales lipídicos; los polifenoles también son quelantes de iones metálicos como  $Cu^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  con los que forman complejos inactivos y previenen su participación en la reacción de Fenton y la generación de  $\cdot OH$ . La potencia antioxidante de los polifenoles está directamente relacionada con su estructura la cual contiene varios

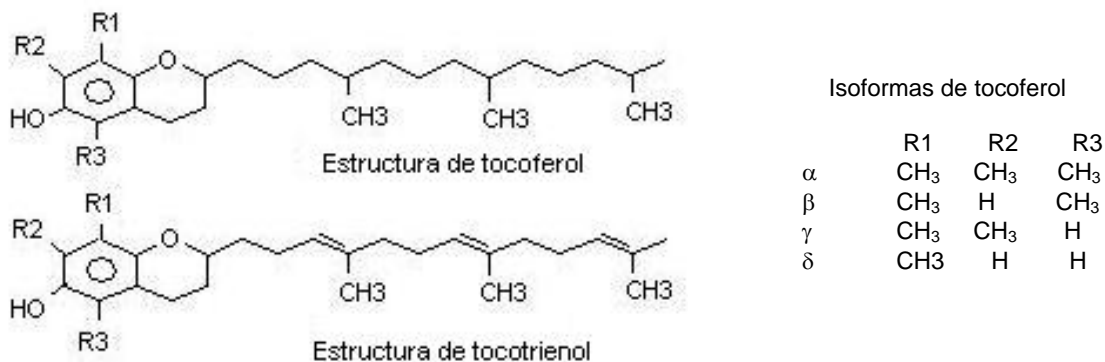
grupos hidroxilo en sus tres anillos (25). Los metabolitos generados por la oxidación de los polifenoles pueden formar dímeros que todavía tienen la capacidad de atrapar EROS.

También se ha reportado que los polifenoles favorecen el incremento de antioxidantes endógenos como GSHPx y GSHRx, SOD y catalasa; además de que pueden reducir la acumulación de EROS al inhibir enzimas como la XO (25, 26).

A pesar de todos estos efectos benéficos, los polifenoles en concentraciones elevadas pueden actuar como prooxidantes al inducir daño oxidativo por un exceso de  $H_2O_2$  (26).

Existe controversia sobre la eficacia de los polifenoles como antioxidantes *in vivo*, debido a que se ha reportado que la biodisponibilidad de algunos polifenoles es muy baja y que los tejidos no alcanzan las concentraciones necesarias para mostrar los mismos efectos que se presentan en modelos *in vitro* (25).

**Vitamina E:** La vitamina E está constituida por ocho compuestos liposolubles, cuatro de estos compuestos son tocoferoles y cuatro son tocotrienoles, su estructura está formada por un anillo aromático y una cadena hidrofóbica de 16 carbonos, donde el sitio activo es el grupo 6-hidroxilo (Fig.3).



**Fig. 3. Estructura de tocoferoles y tocotrienoles.** Vitamina E es el nombre común para los ocho tocoferoles y tocotrienoles. El grupo hidroxilo C-6 del anillo dona su hidrógeno para terminar las reacciones de oxidación (20).

La diferencia entre estos compuestos radica en que los tocoferoles tienen la cadena hidrocarbonada saturada y los tocotrienoles presentan tres insaturaciones en la cadena. Dependiendo del número y la posición de grupos metilo en el anillo de cromano hay 4 isoformas:  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -tocoferol y  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -tocotrienol.

El anillo está cerca de la superficie de las membranas y la cadena carbonada se localiza en paralelo con las colas de los ácidos grasos de las membranas y facilita la incorporación y la retención de la vitamina E en las membranas biológicas (20, 27).

Los tocoferoles se encuentran principalmente en plantas ricas en lípidos como el girasol, el cacahuate y las nueces (28). Como el organismo no cuenta con sitios especiales de reserva de vitamina E, ésta debe ser consumida continuamente (29).

Todas las isoformas de la vitamina E son igualmente absorbidas en la mucosa intestinal por difusión pasiva y se secretan al plasma, trasportándose en quilomicrones, y así llegan al hígado. Solamente el  $\alpha$ -tocoferol se transporta hacia los tejidos asociados a lipoproteínas, mientras que las otras isoformas son excretadas (20,30).

La vitamina E bloquea la reacción en cadena de lipoperoxidación y previene la propagación de los radicales libres; puede remover radicales lipídicos,  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y actúa de manera sinérgica con  $\beta$ -carotenos y vitamina C (27).

Al actuar como antioxidante, el  $\alpha$ -tocoferol se oxida y forma el radical  $\alpha$ -tocoferoxilo el cual puede reducirse a tocoferol por el ácido ascórbico o por el glutatión. De esta manera, la vitamina E no actúa de manera aislada, sino que junto con otros antioxidantes forma un sistema de defensa complejo (20). Si el radical tocoferoxilo no es reducido para regenerar a la vitamina E, dos radicales pueden reaccionar entre sí y formar un dímero estable. El  $\alpha$ -tocoferol puede sufrir una segunda oxidación y producir quinonas, que son productos de degradación que se excretan por heces, aunque, en general, los productos de oxidación de la vitamina E son escasos *in vivo*. La reacción predominante es la reducción del radical tocoferil por otros antioxidantes para regenerar a la vitamina E (30).

Otros metabolitos de la vitamina E son el ácido tocoferónico y su lactona y el  $\alpha$ -CEHC (2, 5, 7, 8-tetrametil-2(2'-carboxietil)-6-hidroxicromano), un metabolito no oxidado. Estas son estructuras con el anillo de cromano abierto y una cadena carbonada corta, que se excretan por orina en condiciones patológicas o cuando hay disminución de antioxidantes y la vitamina E no puede ser regenerada (29).

A pesar de que el exceso de vitamina E puede eliminarse y algunos autores no reportan toxicidad por el consumo de dosis elevadas de vitamina E (mas de 1000 UI), otros, han reportado que la ingesta continua de dosis altas de vitamina E (400- 800 UI/día) puede producir dolores de cabeza, nauseas, hipoglucemia y afectar el nivel de vitamina K en pacientes con terapias anticoagulantes (31, 32).

La deficiencia de vitamina E, se presenta como resultado de un problema en el metabolismo de grasas, o anormalidades genéticas en las proteínas de transporte (33) y, se manifiesta por pigmentación de los depósitos lipídicos, necrosis hepática, distrofia muscular (34) y síndromes neurológicos (31).

### **ESTRÉS OXIDATIVO**

Cuando aumenta de manera excesiva la producción de agentes oxidantes en el organismo y la capacidad de defensa antioxidante es insuficiente, se produce un estado denominado estrés oxidativo el cual puede generar daño celular.

El estrés oxidativo esta involucrado en diversas patologías como artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer y ulcerogénesis gastrointestinal (35).

### **PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.**

A pesar de que las EROS se han relacionado principalmente con la generación de daño celular, se tiene evidencia de que participan en algunos procesos fisiológicos normales como proliferación, diferenciación, envejecimiento y apoptosis (1,2). De hecho la exposición a bajos niveles de EROS puede incrementar la respuesta al crecimiento de muchos tipos de células de mamíferos incluyendo fibroblastos (4), células de músculo liso (5) y células endoteliales (3).

Las EROS pueden estimular la activación de moléculas de señalización celular por lo que han sido consideradas como segundos mensajeros fisiológicos en las señales de transducción involucradas con el crecimiento y la diferenciación celular (18, 36). Se ha reportado que la generación de EROS se incrementa con la interacción ligando-receptor entre diferentes factores de crecimiento y citocinas entre los que se encuentran receptores de citosina (TNF- $\alpha$ ), receptores de tirosin cinasa (EGF), receptores de serina/ treonina cinasa (TGF- $\beta$ ) (15, 18).

Las especies reactivas de oxígeno pueden activar las vías de proteín cinasas activadoras de mitógenos (MAPKs) como ERK, JNK y p38 MAPK; estas vías están involucradas en los procesos de carcinogénesis, proliferación celular, diferenciación y apoptosis (15, 18).

El concepto de que las EROS pueden modular la proliferación celular sugiere que tanto los oxidantes como los antioxidantes están involucrados en el control de los procesos celulares en condiciones fisiológicas y patológicas. Se ha demostrado que



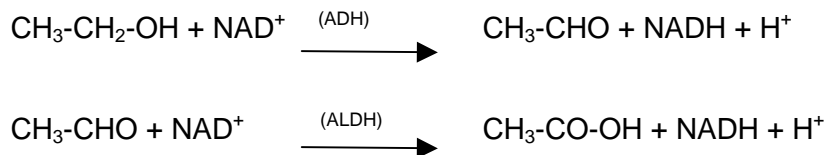
concentraciones elevadas de EROS producen daño oxidativo mientras que concentraciones moderadas están involucradas en los procesos de crecimiento celular.

Se ha publicado que el incremento en el nivel de antioxidantes (GSHPx, SOD,  $\beta$ -caroteno, vitamina E, flavonoides) inhibe la proliferación de muchos tipos de células incluyendo fibroblastos (4), células de músculo liso (5), células epiteliales (6) y líneas celulares cancerosas (7,8,37,38).

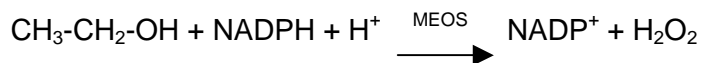
### ETANOL.

Se ha demostrado que el metabolismo del etanol está relacionado con su efecto dañino y con la producción de radicales libres (39).

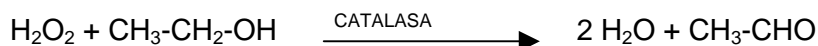
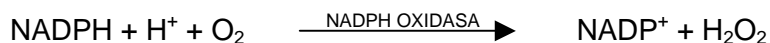
La mayor parte del etanol ingerido se oxida en el hígado, principalmente por la vía de alcohol deshidrogenasa (ADH). Esta enzima se encuentra en el citosol y cataliza la conversión de etanol a acetaldehído utilizando a  $\text{NAD}^+$  como cofactor. El acetaldehído producido es oxidado a acetato por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) que se encuentra en la mitocondria y utiliza  $\text{NAD}^+$ . El NADH producido se transporta al interior de la mitocondria y es oxidado por la cadena respiratoria (39, 40).



El etanol también puede metabolizarse por el sistema microsomal de oxidación de etanol (MEOS) localizado en el retículo endoplásmico, donde participan el CYP2E1 (perteneciente a la familia de citocromo P450) y el NADPH; solo una pequeña cantidad de etanol se metaboliza por esta vía, sin embargo, ésta se induce con el consumo crónico o la ingesta de altas concentraciones de alcohol (39,40).



Una tercera vía de oxidación de etanol es la de la catalasa que se encuentra en los peroxisomas donde participa un sistema generador de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; sin embargo, hay controversia sobre la importancia fisiológica de esta vía (39,40).



El exceso en la producción de NADH y el sistema MEOS pueden generar radicales  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que puede disminuir el nivel de antioxidantes endógenos como el glutatión y, como consecuencia, favorecer la oxidación de macromoléculas como proteínas y lípidos (41). El aumento de NADH también favorece el depósito de triglicéridos en el hígado y la síntesis de ácidos grasos. El acetaldehído incrementa la LP causando estrés oxidativo; también puede unirse a las proteínas de diferentes membranas celulares y activar mecanismos inmunológicos (42).

El aumento de los equivalentes reductores produce un cambio en el sistema redox del citosol, que se demuestra por un cambio en la relación lactato/piruvato que produce hiperlactacidemia y contribuye a la acidosis y reduce la capacidad del riñón para excretar ácido úrico produciendo hiperuricemia. La intoxicación por etanol también puede alterar el metabolismo de carbohidratos produciendo hipoglucemia o hiperglicemia (42).

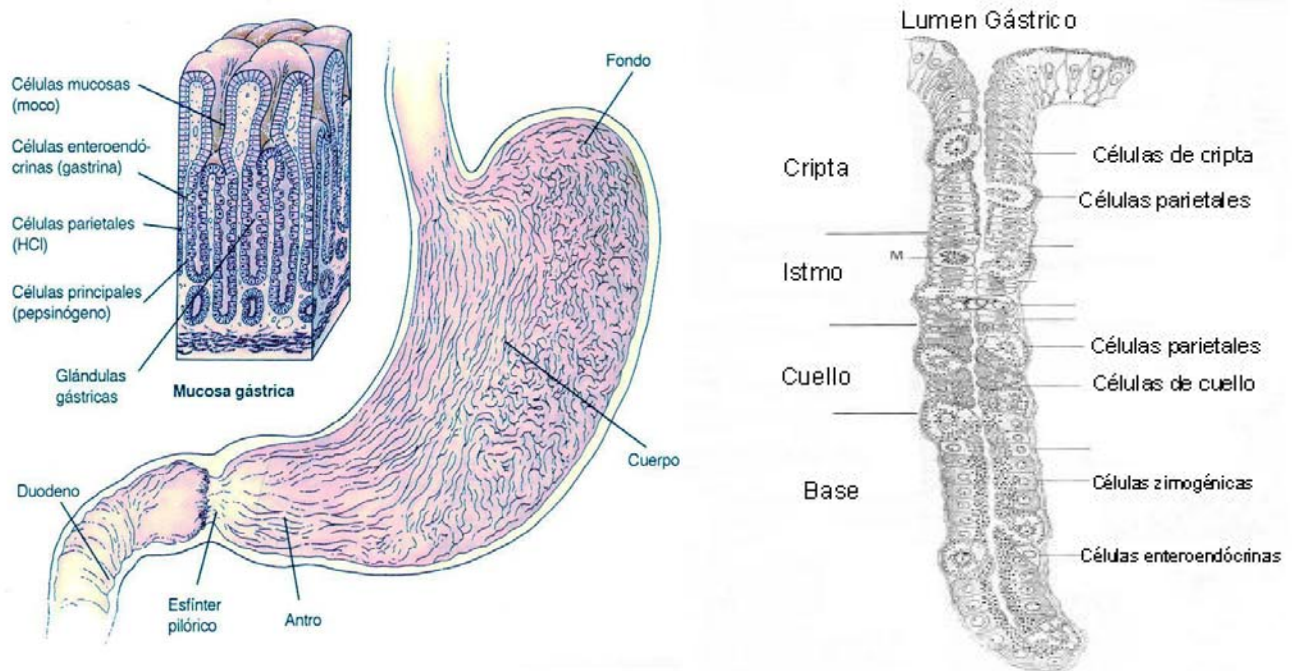
La concentración de etanol en el plasma, y por lo tanto su toxicidad, dependen de su absorción en el tracto gastrointestinal, su distribución en el organismo y su metabolismo hepático. Los metabolitos acetaldehído y acetato son responsables de la mayoría de los efectos metabólicos del etanol en el hígado y en otros órganos como el corazón y el cerebro (42).

El etanol también puede ser oxidado en el estómago a través de la vía de ADH o del sistema MEOS aunque en un porcentaje menor que en el hígado (40,43). El metabolismo gástrico de etanol se considera como el primer paso metabólico del alcohol y su importancia radica en que puede proteger al hígado y a otros órganos de sus efectos tóxicos al disminuir la concentración de etanol que entra al torrente sanguíneo (44).

## **EL ESTOMAGO.**

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

El epitelio gástrico está formado por células que se invaginan formando pliegues denominados glándulas (Fig. 4). Estas se dividen en cuatro regiones de acuerdo al tipo de células que contienen: la región más cercana al lumen gástrico es la cripta y está formada por células productoras de moco; le sigue la región del cuello que contiene células productoras de moco y células enteroendócrinas productoras de gastrina. Después se encuentra la zona proliferativa de la glándula denominada istmo y finalmente está la base, que contiene células zimogénicas productoras de pepsinógeno y células enteroendócrinas (45).



**Fig. 4.** Estómago, glándula gástrica y sus diferentes tipos de células (Karam, 1993).

El istmo produce células inmaduras, las cuales migran hacia la cripta o hacia la base diferenciándose en los diferentes tipos celulares. Durante el proceso de migración, las células normalmente pierden su capacidad de dividirse, aunque un porcentaje menor de células diferenciadas puede provenir de su propia mitosis (45).

Cada tipo celular tiene un tiempo de recambio diferente; se considera que la renovación del epitelio superficial dura de 2 a 7 días y la del epitelio glandular algunos meses (45, 46). Cuando las células cumplen su tiempo de vida, mueren y son lanzadas al lumen gástrico o pueden ser fagocitadas por células vecinas (45).

El epitelio gástrico se encuentra en renovación constante debido a que frecuentemente está expuesto a pequeños daños superficiales producidos por factores agresores como alimentos irritantes, ácidos, estrés y etanol. En condiciones normales, la integridad y la continuidad epitelial son restablecidas rápidamente (minutos u horas). Este proceso se denomina restitución y consiste en la migración de células epiteliales viables para cubrir la lámina basal desnuda producida por la exfoliación celular (46,47). La restitución permite mantener la integridad y las funciones de la mucosa gástrica, así como, el abastecimiento de células especializadas en el epitelio (46).

Para mantener la barrera celular epitelial en el tracto gastrointestinal hay otro proceso que es la proliferación celular. Ésta ocurre como resultado de la mitosis y es un proceso prolongado. La división celular mantiene la masa de la mucosa reemplazándola continuamente (46).

### **DAÑO GÁSTRICO INDUCIDO POR ETANOL**

El etanol se puede absorber en una 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. El resto del etanol se metaboliza por otros tejidos como riñón, músculo y pulmón, principalmente por la acción de la ADH (44,48).

Al metabolismo gástrico del alcohol se le considera 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.

La administración de etanol produce lesiones gástricas a través de mecanismos probablemente comunes a otros agentes agresores; aunque algunos mecanismos son específicos. Se ha reportado que la ingesta de soluciones concentradas de etanol (mayores del 35%) produce daño gástrico en la mucosa con una ruptura del 80% de las células epiteliales superficiales, áreas de marcada hiperemia en la mucosa gástrica, necrosis de las células epiteliales y hemorragia de la mucosa, alteración de las membranas plasmáticas, incremento en la permeabilidad de la mucosa, daño vascular, exfoliación epitelial, incremento en la generación de radicales libres y disminución de la capacidad antioxidante (10).

En 1988, Oates y Hakkinen (49) 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. Se dispara 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; esto además, previene la dilución del etanol. La presión y el volumen se elevan lo suficiente para crear una ampolla en el epitelio gástrico y si la administración de etanol concentrado continúa 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 (49).

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, lo que permite que la mucosa gástrica se regenere rápidamente (50).

## ANTECEDENTES

Se ha publicado un modelo de gastritis experimental en ratas inducida por la administración continua de etanol durante cinco días (12), que se caracteriza por un perfil histológico y se acompaña de 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. La suspensión de la administración de etanol revierte gradualmente estas alteraciones y produce la regeneración epitelial. Sin embargo, durante el periodo de recuperación se presenta un aumento adicional de lipoperoxidación el cual coincide en temporalidad con un incremento en la proliferación celular. Esto sugiere que un incremento en el nivel de lipoperoxidación de las membranas plasmáticas está relacionado con la proliferación celular compensatoria que se presenta en la mucosa gástrica después del daño (11).

Se ha propuesto que este aumento en el nivel de lipoperoxidación es un evento selectivo y controlado, necesario para la progresión de la proliferación celular más que reflejar un daño gástrico.

## **HIPÓTESIS**

Durante la fase de recuperación y de regeneración celular en una gastritis experimental producida por la ingesta crónica de etanol, la administración intragástrica de vitamina E durante esta fase reducirá de manera importante el nivel de lipoperoxidación y la respuesta proliferativa de la mucosa gástrica.

## **OBJETIVO**

Debido a que el nivel de antioxidantes puede tener un papel crítico en la regeneración celular al disminuir el nivel de lipoperoxidación, este trabajo esta dirigido a determinar si la administración oral de vitamina E modifica los patrones de lipoperoxidación y de proliferación celular que se presentan durante la recuperación de la mucosa gástrica dañada por la administración crónica de etanol.

---

## METODOLOGIA

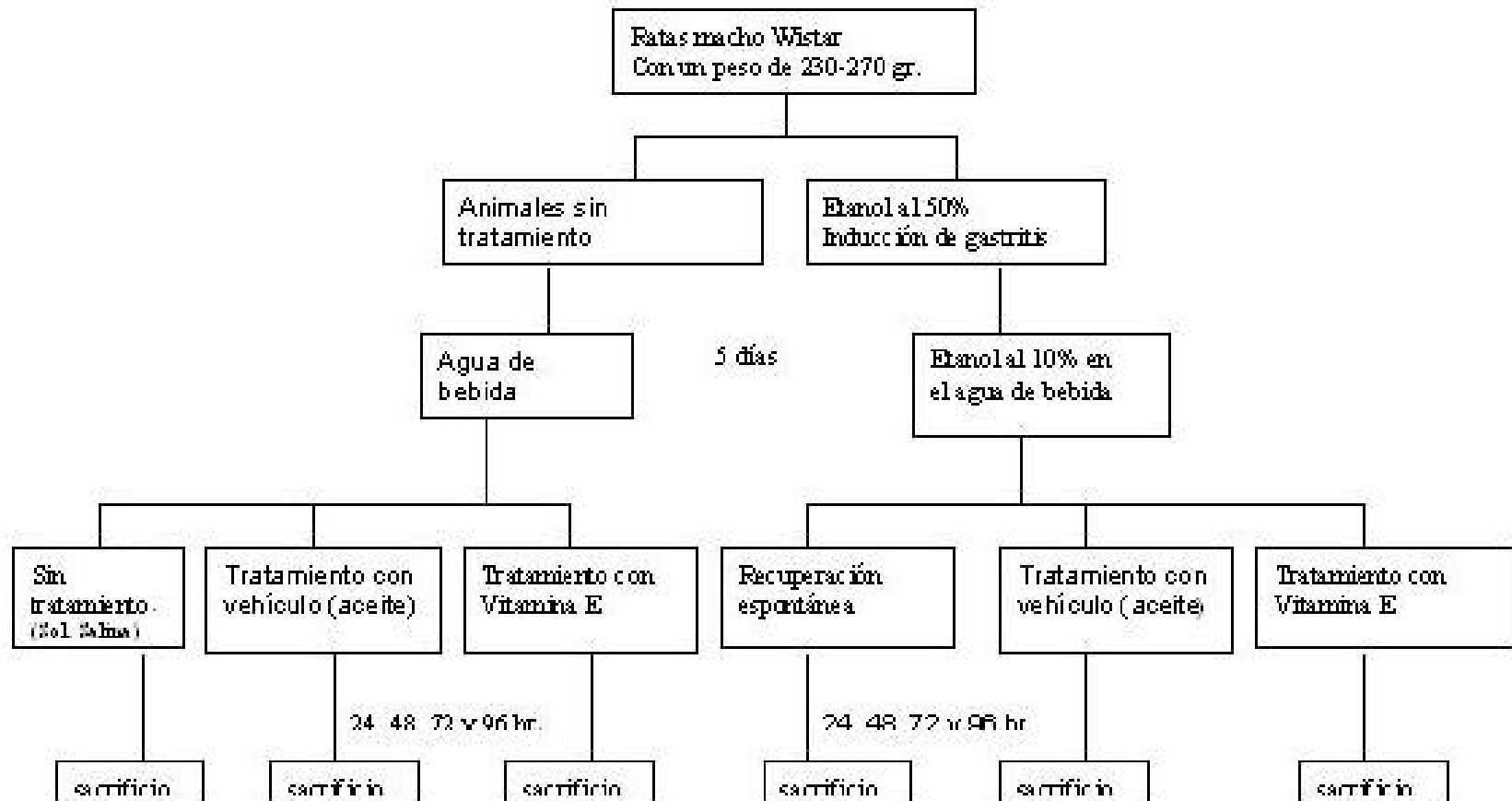
**Modelo animal.** El presente modelo se ha reportado en detalle (12) y consiste en el daño crónico a la mucosa gástrica inducido por etanol. Brevemente, se utilizaron ratas macho Wistar con un peso corporal de 230-270 g; los animales se alimentaron con una dieta estándar (lab chow) y agua *ad libitum* y se sometieron a un ayuno nocturno con libre acceso a agua. Después, recibieron 1 ml de solución salina o 1 ml de etanol al 50% por vía intragástrica (para inducir gastritis). Las ratas se mantuvieron en cajas individuales con acceso libre a comida y agua o a etanol al 10% como agua de bebida (en el grupo de animales con gastritis); el tratamiento continuó durante cinco días, y al quinto día se retiró el etanol (T0; tiempo cero). Otro grupo de ratas con gastritis recibió vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) diluida en aceite vegetal (1ml/rata), después de retirar el etanol; Los animales se dividieron en cuatro grupos como sigue: 1) Gastritis; animales tratados intragástricamente con 1ml de vehículo (aceite vegetal) por uno a cuatro días; 2) aquellos que recibieron una dosis diaria de 12 UI/kg de peso corporal de vitamina E durante cuatro días; 3) animales tratados con 24 UI/kg de peso corporal de vitamina E en la misma dosis y temporalidad y, 4) aquellos tratados con 100 UI/kg de peso/día de vitamina E en el mismo horario de tratamiento (Fig.5).

Simultáneamente, se corrieron grupos de animales que no se trataron con etanol, y que recibieron  $\alpha$ -tocoferol. El grupo control consistió en animales sin daño gástrico y tratados con el vehículo (aceite vegetal) en el mismo volumen y temporalidad que los anteriores. Los animales se sacrificaron por decapitación previa anestesia general con pentobarbital sódico. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la Ley Federal para la Cría y Uso de Animales de Laboratorio (SAGARPA).

**Aislamiento de fracciones subcelulares de mucosa gástrica.** El estómago se removió, y se disecó a lo largo de la curvatura menor y la mucosa gástrica se retiró totalmente. El fraccionamiento subcelular de la mucosa gástrica (membrana plasmática y citosol), se llevó a cabo por centrifugación diferencial (12). La fracción nuclear se obtuvo como está descrito por Aguilar-Delfín *et al.* (51). Se realizaron pruebas histológicas en tiras de la pared de la mucosa gástrica fijadas en formalina al 10% y teñidas con hematoxilina-eosina. Estas muestras se evaluaron por microscopía de luz a doble ciego, por un patólogo.



### MODELO EXPERIMENTAL



---

**Determinación de  $\alpha$ -tocoferol.** El  $\alpha$ -Tocoferol se extrajo de la mucosa gástrica y se analizó por HPLC utilizando un método descrito previamente (52.) el cual se adaptó para nuestros propósitos. Los extractos lipídicos se prepararon homogenizando 10 mg de proteína, con 50  $\mu$ l de hidroxitolueno butilado (BHT; 0.1mg/ml de metanol) para prevenir la autoxidación. Se agregaron 4 ml de metanol (-20 °C), y ésta mezcla se agitó, se adicionaron 3 ml de éter de petróleo helado, y se agito otra vez; después se centrifugó durante 5 min. a 1200 X g. La capa de éter de petróleo fue recolectada y secada con nitrógeno, y el residuo se reconstituyó en 0.5 ml de metanol/etanol (1:1 v/v) y se filtró a través de una membrana con un poro de 0.45  $\mu$ m. La medición cuantitativa de  $\alpha$ -tocoferol se hizo por HPLC utilizando, un equipo Waters modelo 600 (Waters, Associates, Milford, MA) con un sistema cuaternario de bombas y un detector electroquímico (Decade, Antec Leyden, Netherlands) equipado con un electrodo de carbono y un electrodo de referencia de hidrógeno. Las muestras (20 $\mu$ l) se separaron en una columna C18 de fase reversa (Alltech, 25 cm) utilizando como fase móvil una solución de metanol (95%), ácido acético (3.4%) y agua (1.6%); se utilizó una velocidad de flujo de 1ml/min. La detección electroquímica se realizó a 550mV. Las soluciones estándares de  $\alpha$ -tocoferol se prepararon disolviendo el compuesto en 100 ml de etanol:metanol (1:1 v/v)

**Ensayo para lipoperoxidación y grupos carbonilo en proteínas.** La cantidad de algunos productos aldehídicos generados por LP se determinó en diferentes fracciones celulares como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), por un método colorimétrico reportado previamente (53). Los dienos conjugados (CD) relacionados con la LP de las membranas plasmáticas se determinaron como se describió previamente (12), mientras que el contenido de grupos carbonilo en proteínas de membranas plasmáticas, como índice de daño oxidativo, se estimó de acuerdo a Levine y cols. (54).

**Estimación de la síntesis de DNA y proliferación celular compensatoria después de retirar el etanol.** La actividad citosólica de timidina cinasa (TK; EC 2.7.1.21) fue determinada por la técnica de Sauer y Wilmanns (55), utilizando [metil-<sup>3</sup>H] timidina (sp. act. 2 Ci/mmol; New England Nuclear Co., Boston MA). La actividad de ornitín descarboxilasa (ODC; EC 4.1.1.7) fue medida por una técnica radiométrica usando [1-<sup>14</sup>C]-ornitina (sp. act. 54 mCi/mmol; Dupont New England Nuclear Co., Boston, MA) como sustrato (56). La incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) dentro del DNA de la mucosa gástrica se midió por un kit de proliferación celular en placas de ELISA (Boehringer

---

Mannheim, Germany), como se ha descrito previamente (57). El índice mitótico se estimó en preparaciones histológicas basado en consideraciones previamente descritas (58).

**Morfometría.** La proporción relativa de la superficie del epitelio contra la mucosa gástrica total, fue cuantificada por microscopía de luz convencional en secciones de tejido teñidas con hematoxilina-eosina. Las imágenes obtenidas de estas piezas se sometieron a un análisis de imagen complementada con una evaluación histológica semicuantitativa (58). Una vez que se calcularon las áreas, la relación obtenida de la superficie epitelial/el estómago glandular representó el porcentaje de recuperación del epitelio de la mucosa gástrica.

**Determinación de antioxidantes endógenos.** Para estudiar si la vitamina E como antioxidante exógeno influye en las defensas antioxidantes endógenas, se determinaron las actividades de superóxido dismutasa citosólica (Cu/Zn-SOD) y mitocondrial (Mn-SOD) como describen Flohé y Ötting (59). Una unidad de actividad de SOD fue definida como la actividad que produce el 50% de inhibición en la reacción determinada en ausencia de SOD. La actividad de Mn-SOD se calculó restando la actividad de Cu/Zn-SOD de la actividad de la SOD total. El contenido total de glutatión (forma reducida y oxidada) se cuantificó en extractos ácidos de mucosa gástrica a través de la técnica reportada por Akerboom y Sies (60), midiendo la reducción de DTNB a 412 nm.

**Ensayo de eventos apoptóticos.** La proporción de apoptosis en las células de la mucosa gástrica se evaluó a través de varios procedimientos. La actividad de caspasas en la fracción citosólica (caspasa-3, -8, y -9) fue determinada con un kit colorimétrico (Chemicon Co. Temeluca, CA), basado en los principios descritos por Thonberry (61). La presencia de citocromo *c* en el citosol se midió por análisis de espectro diferencial de absorción. Para ello, de 8 a 10 mg de proteína citosólica se liofilizaron y resuspendieron en una solución de Tris-HCl 10 mM (pH 7.4); se colocó la muestra en celdas con un paso de luz de 1 cm, se corrió un espectro diferencial entre las muestras reducidas utilizando ditionita de sodio sólido, y las muestras oxidadas con persulfato de amonio sólido. El contenido de citocromo *c* citosólico se calculó utilizando su coeficiente de extinción de 550 a 540 nm (62). Posteriormente, la identidad de la proteína se confirmó usando geles de poliacrilamida SDS-PAGE; los geles se tiñeron con 3,3',5,5'-tetrametil benzidina, como lo describió García-Horsman *et al.* (63). Además, una sección ultrafina de mucosa gástrica

---

fue teñida con acetato de uranilo y citrato de plomo, las muestras se observaron con un microscopio electrónico de transmisión (JEOL 1200 EXII) para buscar la presencia de cromatina condensada, fragmentación nuclear, citoplasma compactado y cuerpos apoptóticos.

**Análisis de ciclina D1 por “western blot”:** Los núcleos fueron aislados de la mucosa gástrica y purificados a través de un gradiente de sacarosa y centrifugados a alta velocidad. La pastilla se resuspendió en una solución amortiguadora de HPES-sacarosa-MgCl<sub>2</sub> (64). Posteriormente la fracción nuclear se solubilizó con dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS; SIGMA Chemical Co., Saint Louis MO) y se separó en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE). Se cargaron 18.5 µg de la proteína nuclear en cada carril y después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Co., San Francisco CA) por 1 h a 350 mA/cm<sup>2</sup>. La membrana de nitrocelulosa se incubó con una solución al 5% de leche libre de grasas diluida en un amortiguador de fosfatos (PBS-tween 20). Posteriormente la membrana de nitrocelulosa se incubó toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal anti-ciclina D1 (0.2 µg/ml; Santa Cruz Biotech, CA). La membrana se lavó con una solución de PBS-tween 20 al 0.15%. Posteriormente se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal conjugado a peroxidasa (HRP, 0.2 µg/ml; Santa Cruz Biotech, CA). La membrana fue revelada con un kit ECL-Plus (Amersham Co.), y se expuso a una película fotográfica (Kodak). Para cuantificar la ciclina D1, las imágenes obtenidas fueron capturadas y se analizaron con el programa Quantity. One Software 4.6.0 (Bio-Rad Co., San Francisco CA). Como control de carga se utilizó un anticuerpo contra β-actina (Calbiochem, La Jolla, San Diego, CA) (57).

**Estadística.** Todos los resultados están expresados como promedio ± error estándar; la significancia estadística se determinó por ANOVA de dos vías, y se aplicó un análisis de post-hoc de Newman Keul.

---

## RESULTADOS

**Contenido de  $\alpha$ -tocoferol en la mucosa gástrica.** Al instalarse la gastritis (T0), el contenido de vitamina E en el homogenado de la mucosa gástrica se redujo significativamente respecto al grupo control y se recuperó a las 48 horas después de retirar el etanol (Tabla 1). La administración de vitamina E (excepto con 12 UI/kg; datos no mostrados) incrementó gradualmente el contenido de  $\alpha$ -tocoferol. En los animales no tratados con etanol, la administración de 24 o 100 UI/kg de vitamina E elevó el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en la mucosa gástrica con respecto al número de dosis administradas, mientras que una acumulación considerable de  $\alpha$ -tocoferol en la mucosa gástrica solo se llevó a cabo con la administración de 100 UI/kg de vitamina E en animales con gastritis (Tabla 1). Inesperadamente, la máxima elevación de  $\alpha$ -tocoferol se presentó a las 72 horas y disminuyó después, a pesar de que los animales continuaron recibiendo vitamina E. Debido a estos resultados, se seleccionó la dosis de 100 UI/kg de vitamina E para realizar los siguientes experimentos.

**Cambios en los parámetros oxidativos en la mucosa gástrica de animales con gastritis y tratados con vitamina E.** El nivel de TBARS y de DC como marcadores de lipoperoxidación, y la proporción de proteínas carboniladas (oxidadas) se determinaron en diferentes fracciones celulares de animales con gastritis y tratados con vitamina E. El contenido de TBARS en el homogenado de animales con gastritis se incrementó desde tiempos tempranos (T0) comparado con el grupo control (Fig. 6A); los TBARS disminuyeron gradualmente, pero a las 72 horas después de retirar el etanol se presentó una segunda elevación de este parámetro, la cual se mantuvo hasta las 96 horas del periodo de recuperación (Fig. 6A). El incremento temprano en el nivel de TBARS es atribuido principalmente a la peroxidación de las membranas plasmáticas (Fig 6B), y de la fracción citosólica (Fig. 6C). En contraste, el aumento a tiempos tardíos (72 hrs) en el contenido de TBARS se debió principalmente a oxidación de membranas plasmáticas, núcleos (Fig. 6A y D) y citosol (96 h de recuperación).

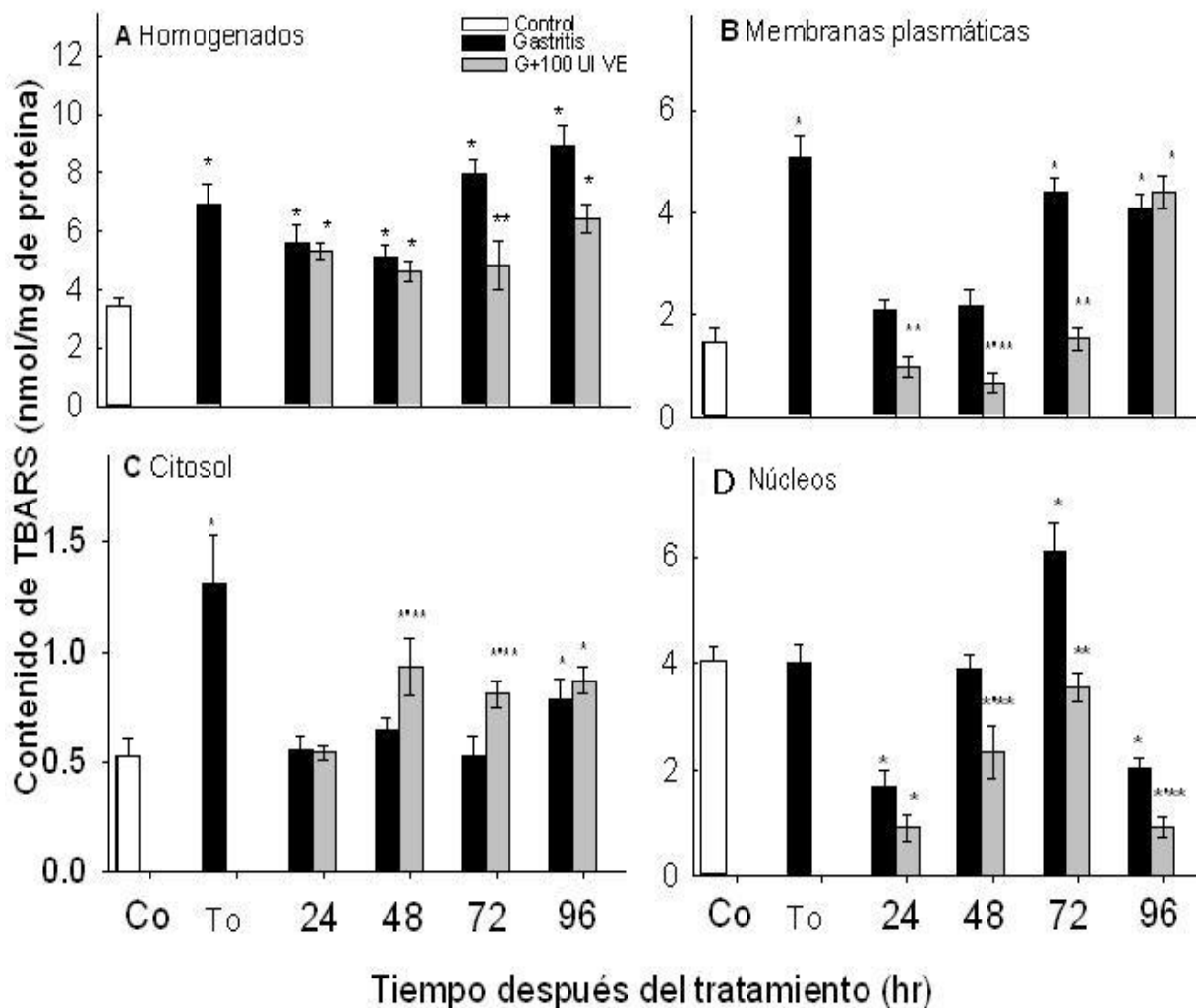
El tratamiento con vitamina E disminuyó significativamente el contenido de TBARS en el homogenado de la mucosa gástrica dañada (Fig. 6A), pero su efecto antioxidante dependió de la fracción celular estudiada. En las membranas plasmáticas de animales tratados con  $\alpha$ -tocoferol, el nivel de TBARS disminuyó drásticamente durante las primeras 72 horas de la recuperación, pero se presentó un incremento inesperado de TBARS en

**Tabla 1. Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la mucosa gástrica de animales sujetos a daño gástrico y tratados con vitamina E**

<b>Grupos experimentales</b>				
<b>Tiempo después del tratamiento</b>	<b>Control + salina</b>	<b>Control + vitamina E</b>	<b>Gastritis + salina</b>	<b>Gastritis+ vitamina E</b>
<b><math>\alpha</math>-tocoferol (<math>\mu\text{g}</math> / mg de proteína) después del tratamiento con 24 UI de vitamina E</b>				
Tiempo cero	212 $\pm$ 25	---	140 $\pm$ 13*	---
24 hr	---	224 $\pm$ 25	61 $\pm$ 6*	99 $\pm$ 14*,**
48 hr	---	281 $\pm$ 34	203 $\pm$ 24	224 $\pm$ 34
72 hr	---	365 $\pm$ 51*	175 $\pm$ 23	251 $\pm$ 18**
96 hr	---	285 $\pm$ 42	154 $\pm$ 22	109 $\pm$ 18*
<b><math>\alpha</math>-tocoferol (<math>\mu\text{g}</math> / mg de proteína) después del tratamiento con 100 UI de vitamina E</b>				
Tiempo cero	212 $\pm$ 25	---	140 $\pm$ 13*	---
24 hr	---	247 $\pm$ 34	61 $\pm$ 6*	141 $\pm$ 26*,**
48 hr	---	418 $\pm$ 63*	203 $\pm$ 24	288 $\pm$ 58
72 hr	---	672 $\pm$ 107*	175 $\pm$ 23	480 $\pm$ 100*,**
96 hr	---	432 $\pm$ 73*	154 $\pm$ 22	148 $\pm$ 32*

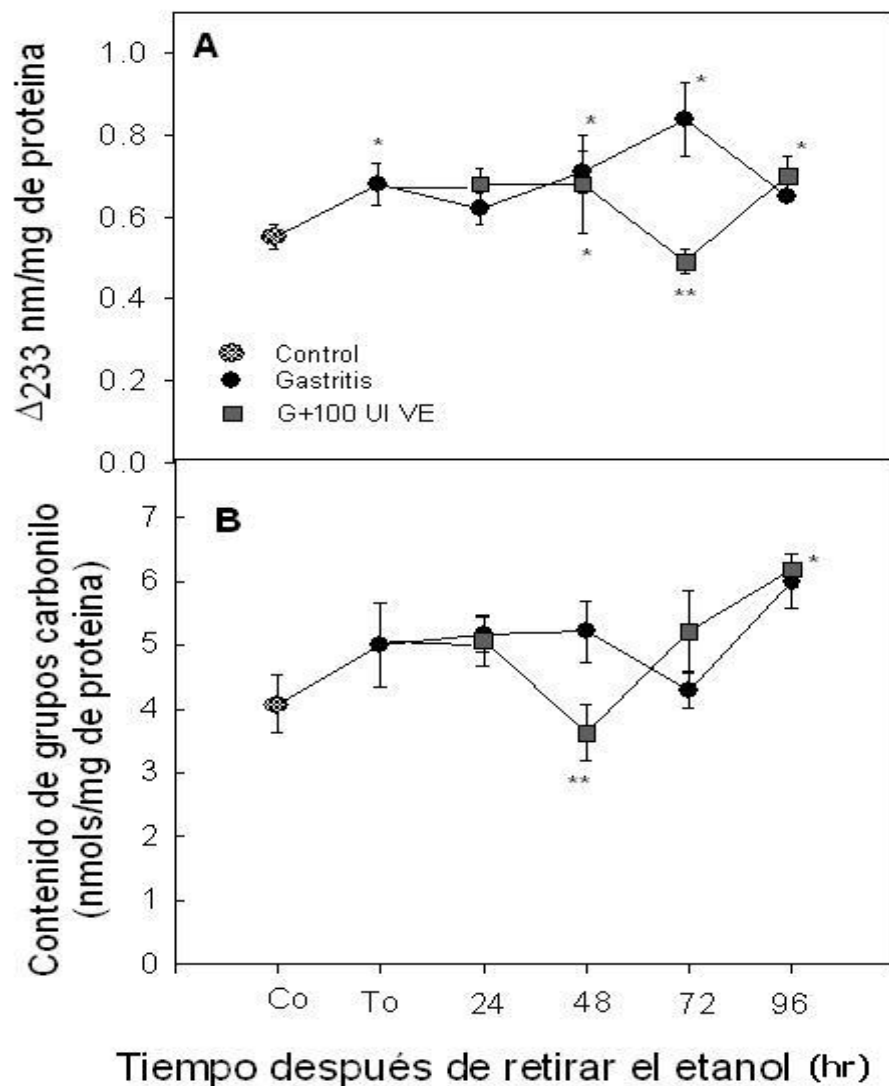
Los resultados están expresado como promedio  $\pm$  error estándar de cinco determinaciones individuales por grupo experimental. Estadística \* $p < 0.01$  vs control, \*\* $p < 0.01$  vs. gastritis.

estas membranas a las 96 h (Fig.6B); Así, dosis altas de vitamina E parecen retrasar el incremento en el nivel de LP inducido por la gastritis (Fig.6B). De hecho, la vitamina E produjo un aumento inesperado de TBARS citosólicos, que empezó a las 48 horas y se mantuvo elevado hasta las 96 horas después de retirar el etanol (Fig. 6C). Sin embargo, en la fracción nuclear, el tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol presentó un esperado efecto antioxidante significativo y prolongado (Fig. 6D).



**Fig. 6. Contenido de TBARS en las fracciones subcelulares de la mucosa gástrica de animales con gastritis y tratados con vitamina E.** Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar de cinco determinaciones individuales por grupo experimental. Co: animales control, los grupos experimentales están indicados por los símbolos en la parte superior del panel. Significancia estadística: \*  $p \leq 0.01$  vs control; \*\*  $p \leq 0.01$  vs gastritis.

El patrón de DC en las membranas plasmáticas (Fig. 7A) fue similar al encontrado para TBARS. El nivel de DC se incrementó al instalarse la gastritis (T0), y presentó una elevación máxima a las 72 horas de recuperación. La administración de vitamina E suprimió el aumento de DC a las 72 horas, retrasando el pico máximo de CD a las 96 horas después del tratamiento (Fig. 7A).



**Fig. 7. Dienes conjugados (A) y contenido de grupos carbonilo (B) en las membranas plasmáticas de la mucosa gástrica de animales con gastritis y tratados con  $\alpha$ -tocoferol.** Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar de cinco determinaciones individuales por grupo experimental. Los grupos están indicados por los símbolos en la parte inferior del panel A. La significancia estadística es como se indicó en la Fig. 6.

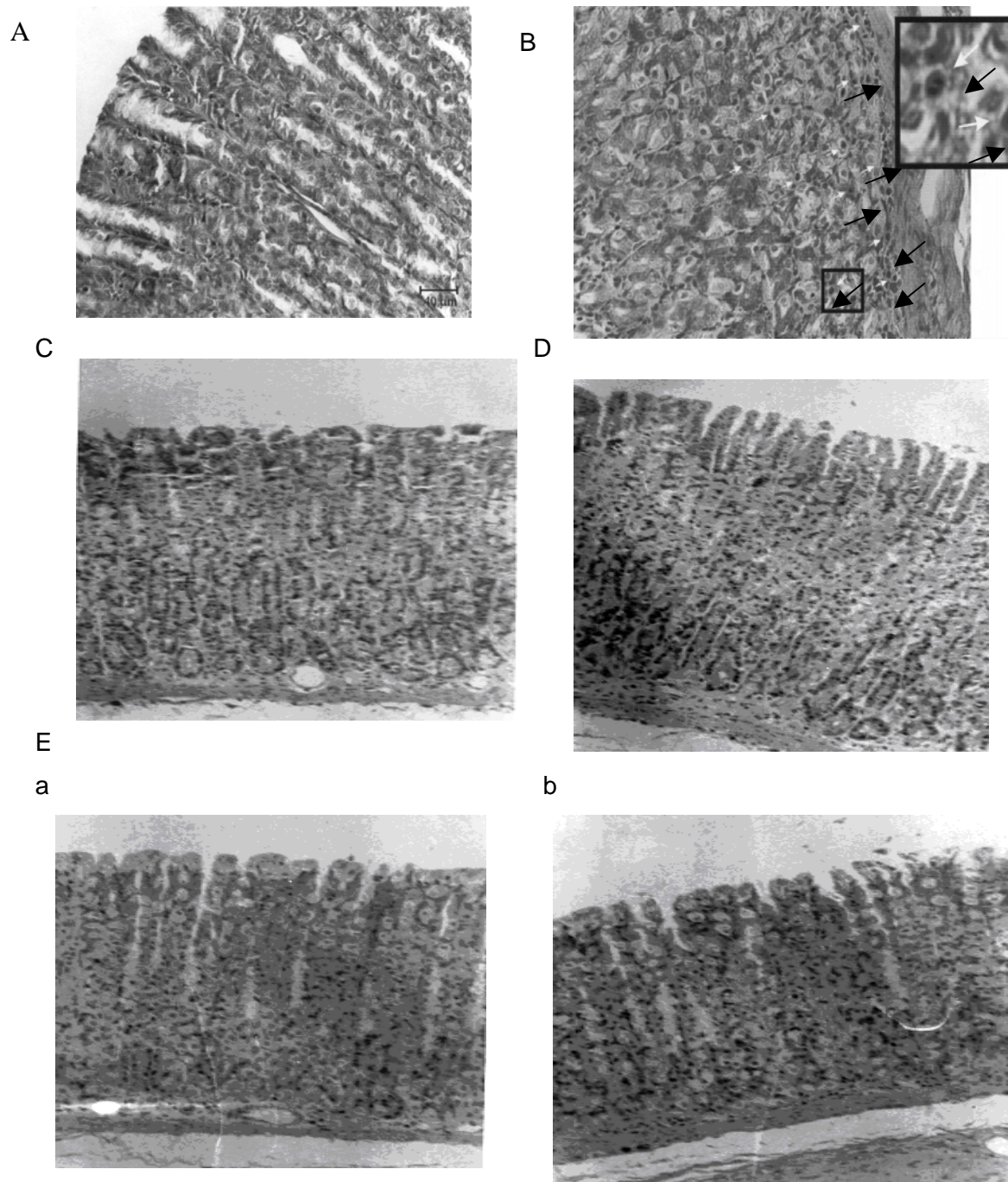


---

El contenido de grupos carbonilo en proteínas (Fig. 7B) se determinó en las membranas plasmáticas de animales con gastritis y solamente presentó un incremento a las 96 horas después de retirar el etanol, la vitamina E no evitó la elevación de proteínas oxidadas en animales con gastritis (Fig. 7B). Los parámetros indicativos de los eventos peroxidativos no se modificaron en la mucosa gástrica de animales sin gastritis y tratados con  $\alpha$ -tocoferol (datos no mostrados).

**Efecto de la vitamina E sobre la recuperación de la masa de la mucosa y sobre la capacidad proliferativa y de síntesis de DNA de las células gástricas.** La figura 8 muestra micrografías de la mucosa gástrica. Comparados con los animales control (Fig. 8A), los animales con daño gástrico (T0; Fig.8B y C) presentaron una mucosa caracterizada por la ruptura del epitelio superficial, pérdida de células especializadas, un ligero edema submucoso y, un claro infiltrado de leucocitos polimorfonucleares (PMN) (Fig. 8B, interior, indicado por flechas), lo que proporciona una clara evidencia del daño gástrico. Estas anormalidades histológicas generadas por el etanol disminuyeron de manera importante a las 96 horas de la recuperación espontánea (Fig. 8D). Aunque la administración de vitamina E a ratas con gastritis ejerce un efecto antiinflamatorio, como se observa por la disminución del infiltrado de PMN a tiempos tempranos, la vitamina no fue efectiva para mejorar la restauración del epitelio gástrico (Fig. 8Ea y b). Los efectos de la vitamina E fueron corroborados por el análisis de la proporción relativa del epitelio superficial con respecto al epitelio glandular del estómago, a través de una aproximación morfométrica (Tabla 2). Con esto, se confirmó el efecto inhibitorio de la proliferación celular producido por el  $\alpha$ -tocoferol. La relación epitelio superficial / epitelio glandular gástrico se redujo drásticamente en la instalación de la gastritis (T0), y prácticamente se restauró a las 96 horas después de haber retirado el etanol. Sin embargo, en los animales con gastritis tratados con vitamina E, esta relación no se recuperó durante todo el tiempo de estudio (96 horas; Fig. 8, Tabla 2).

Se exploró el papel de las EROS durante la progresión de la proliferación celular al examinar los efectos de la vitamina E sobre los parámetros proliferativos encontrados después del daño crónico a la mucosa gástrica (Fig. 9). Al T0, la actividad de TK de la mucosa gástrica se incrementó significativamente, alcanzando un máximo a las 72 horas y se mantuvo elevada las 96 horas después de retirar el etanol. (Fig. 9A). A pesar de que los animales con gastritis mostraron una disminución inicial en el índice mitótico (T0), este parámetro se incrementó gradualmente con un máximo a las 72 horas (Fig. 9B). Ambos



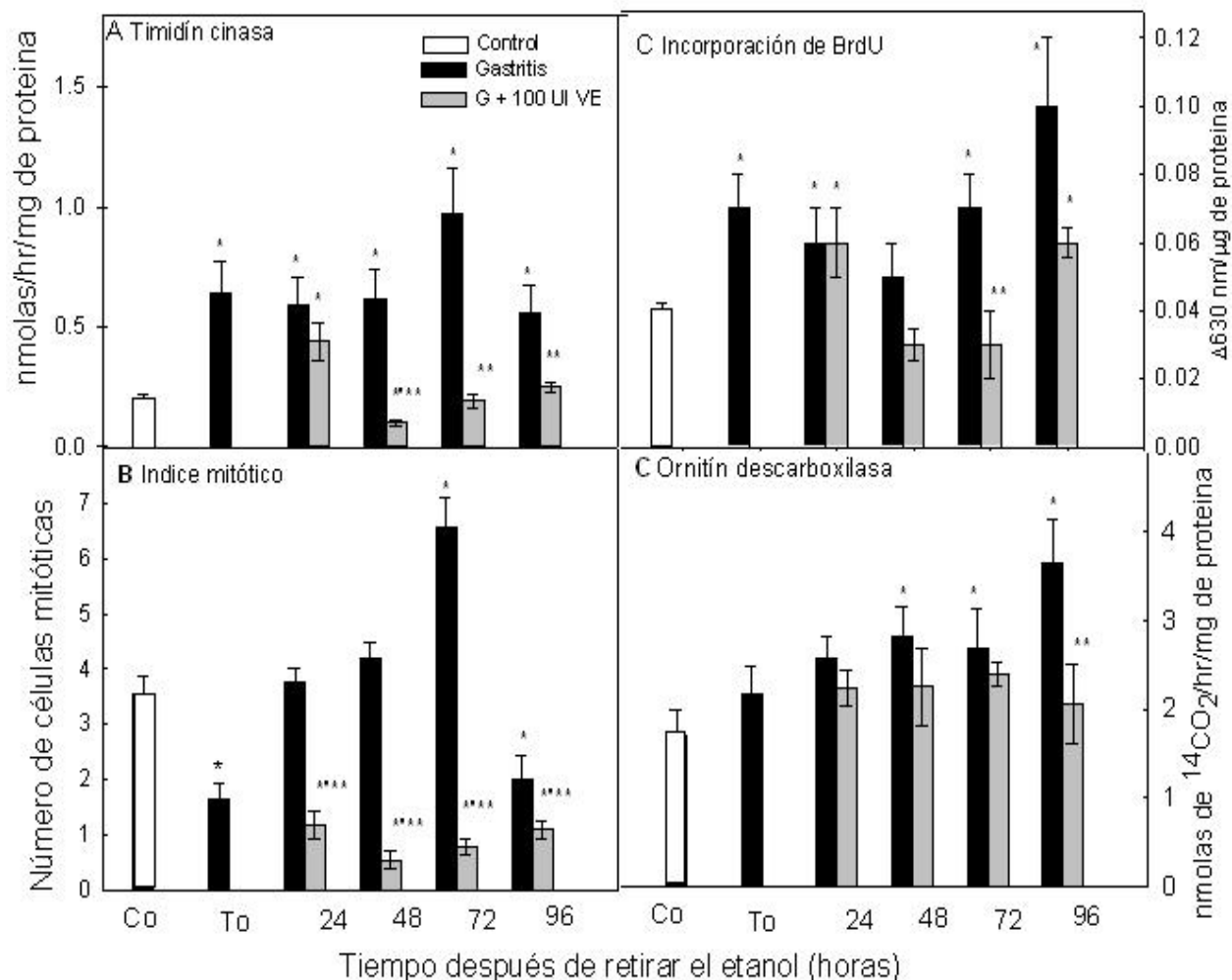
**Fig. 8. Proporción relativa del epitelio superficial y la capa glandular en la mucosa gástrica de animales con gastritis y tratados con  $\alpha$ -tocoferol.** Imágenes de microscopía (objetivo 40X) representativas de la mucosa gástrica de: **A**, animales control; con epitelio superficial y glandular conservados; **B**, Gastritis (T0), acompañada de infiltrado inflamatorio (PMN) marcado por flechas. La superficie epitelial disminuyó al instalarse la gastritis (panel **C**; objetivo 20X) y a las 96 hr se presenta una recuperación sustancial de la capa celular (**D**). En los animales que recibieron vitamina E, prácticamente no hubo restauración de la superficie de la mucosa gástrica durante todo el tiempo de estudio ( 96 hr; **Ea** y **Eb**)

**Tabla 2. Morfometría de la proporción relativa de la superficie del epitelio gástrico respecto al epitelio glandular en animales sujetos a daño gástrico inducido por etanol y tratados con vitamina E.**

<b>Tiempo después Del tratamiento</b>	<b>Control + vehiculo</b>	<b>Gastritis + vehiculo (aceite)</b>	<b>Gastritis + 100 UI de vitamin E</b>
Tiempo cero	0.38 ± 0.03	0.26 ± 0.02*	---
24 hr	---	0.27 ± 0.02*	0.22 ± 0.02*
48 hr	---	0.29 ± 0.03	0.23 ± 0.02*
72 hr	---	0.32 ± 0.03	0.23 ± 0.02***
96 hr	---	0.35 ± 0.03	0.26 ± 0.02***

Los resultados están expresado como promedio + error estándar de cinco determinaciones individuales por grupo experimental. Estadística: \*p<0.01 vs control, y \*\*p<0.01 vs. gastritis.

parámetros correlacionaron con la incorporación *in vivo* de BrdU dentro de la fracción nuclear. La incorporación de BrdU se incrementó a tiempos tempranos (T0) respecto al grupo control y se mantuvo elevada a lo largo de las 96 horas del periodo de recuperación (Fig. 9C). La actividad de ODC en la mucosa gástrica aumentó significativamente a las 48 horas en los animales con gastritis, y se mantuvo elevada respecto al grupo control durante las 96 horas (Fig. 9D).



**Fig. 9. Parámetros proliferativos: Actividad de timidín cinasa (A), Índice mitótico(B), Incorporación de BrdU (C), y actividad de ornitín descarboxilasa (D)** determinadas en fracciones subcelulares de la mucosa gástrica de animales con gastritis y tratados con  $\alpha$ -tocoferol. Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar de cinco determinaciones individuales por grupo experimental. Los grupos están indicados por los símbolos en la parte superior del panel A. La significancia estadística es como se indicó en la Fig. 6.

---

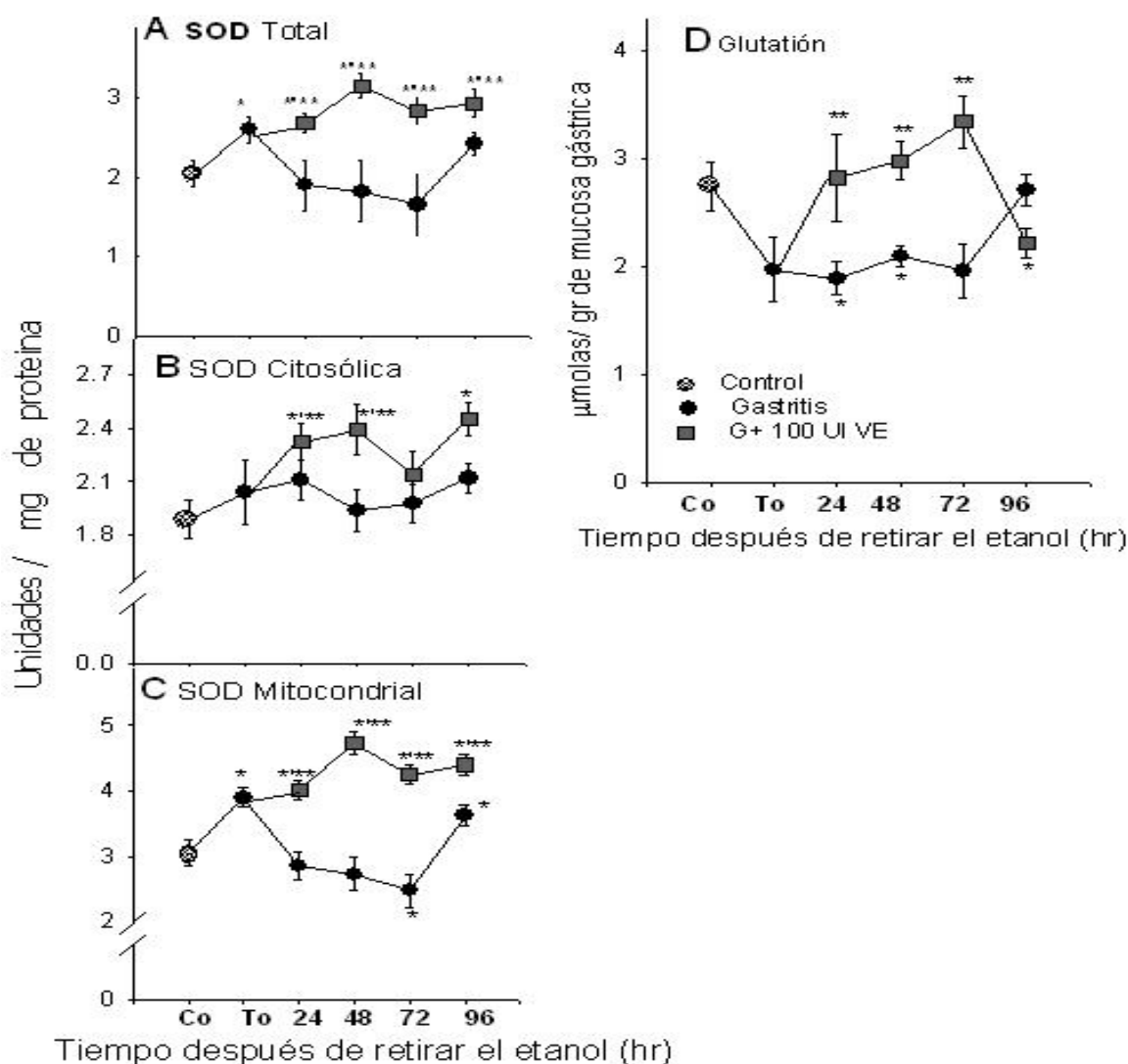
Los parámetros indicativos de proliferación celular fueron disminuidos progresivamente por la administración *in vivo* de  $\alpha$ -tocoferol (Fig. 9). El tratamiento con vitamina E solamente produjo una ligera elevación temprana (24 horas) en la actividad de TK, seguida por una disminución importante de esta actividad enzimática a las 48 horas, y regreso a los niveles basales a tiempos tardíos (Fig. 9A). Un patrón similar se presentó en la incorporación de BrdU (Fig. 9C).

El tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol disminuyó el aumento en la síntesis de DNA que se presentó en el grupo de gastritis, este efecto fue claro a las 72 y a las 96 horas del periodo de recuperación (Fig. 9A-C). La administración de vitamina E bloqueó totalmente el incremento en el índice mitótico durante todo el tiempo de estudio (respecto al grupo control; Fig. 9B). En los animales con gastritis, el tratamiento con vitamina E también evitó el aumento de la actividad de ODC (Fig. 9D). La vitamina E no afectó los indicadores proliferativos en animales no tratados con etanol (datos no mostrados).

**Defensas antioxidantes en la mucosa gástrica de animales control y de ratas con gastritis tratados o no con vitamina E.** La superóxido dismutasa (SOD) y el nivel de glutatión reducido en la mucosa gástrica actúan como los principales atrapadores de radicales libres y de especies reactivas de oxígeno, por lo que se buscaron los efectos de la gastritis y de la administración de vitamina E sobre estas defensas antioxidantes. Se encontró que tanto el daño gástrico como el tratamiento con vitamina E modificaron los sistemas antioxidantes.

En los animales con daño gástrico, la actividad de SOD total (homogenados; Fig. 10A) aumentó solo por la presencia de la gastritis (T0), mientras que la administración de vitamina E incrementó esta actividad. El tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol indujo un aumento sostenido de la actividad de SOD en la mucosa gástrica durante todo el tiempo de estudio (Fig. 10A). La actividad de SOD citosólica (Cu/Zn-SOD; Fig. 10B) no cambió en los animales con gastritis comparado con el grupo control, pero la administración de vitamina E presentó un aumento en la actividad de esta enzima, principalmente a las 48 y 96 horas del periodo de recuperación. Los cambios en la actividad de SOD total fueron reflejados principalmente en la actividad de SOD mitocondrial (Mn-SOD; Fig. 10C). El daño producido en la mucosa gástrica se acompañó de un incremento temprano (T0) en la actividad de Mn-SOD (Fig.10C), la cual disminuyó a las 72 horas y se volvió a elevar a las 96 horas. La administración de vitamina E produjo una elevación prolongada en la

actividad de Mn-SOD (Fig. 10C), siguiendo un patrón similar al que se presenta en la actividad de SOD de los homogenados de las mucosas (Fig. 10A).

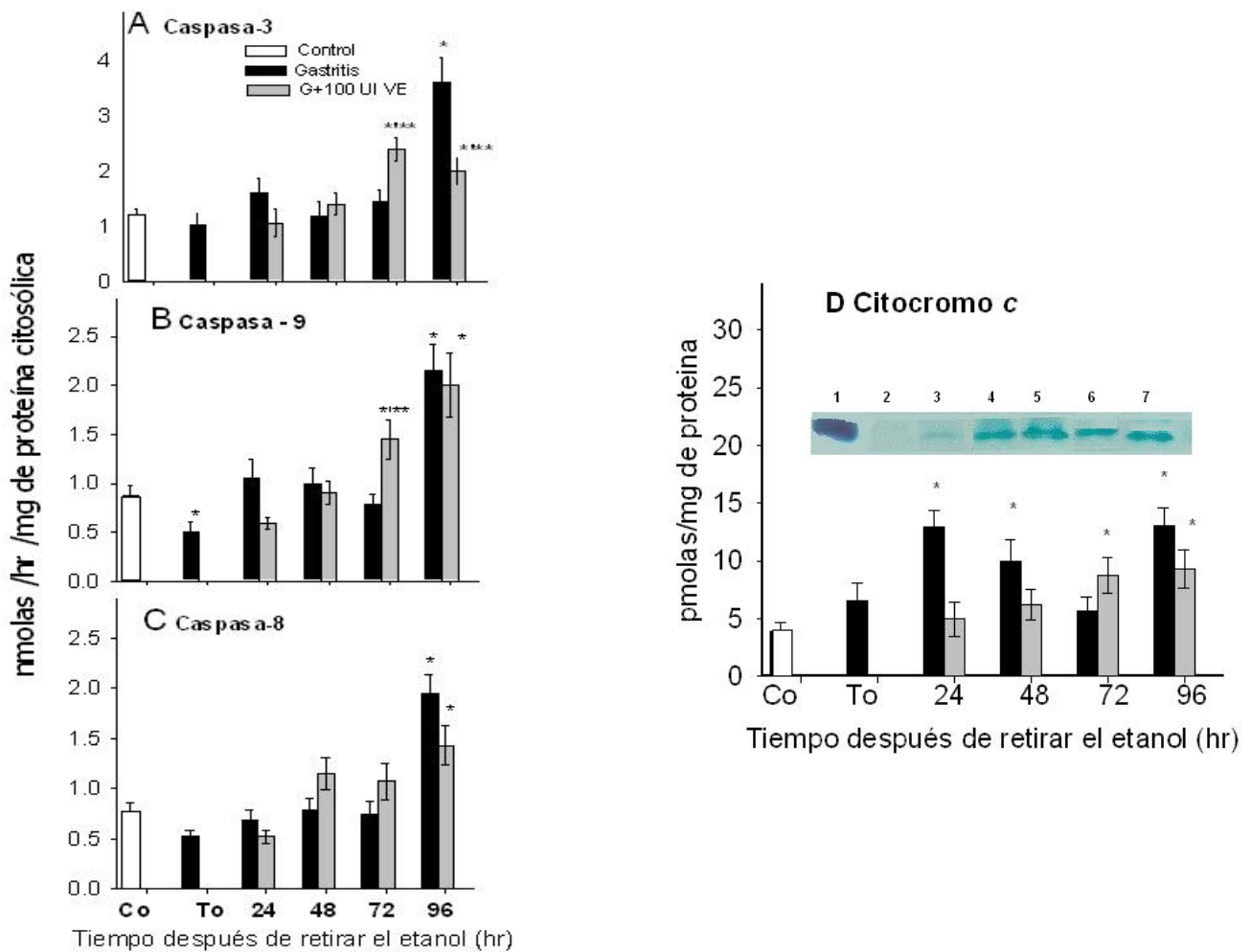


**Fig.10. Actividades de sistemas antioxidantes endógenos (superóxido dismutasa y glutatión total) en la mucosa gástrica de animales con gastritis y tratados con vitamina E.** Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar de cinco determinaciones individuales. Co: valores control. Los símbolos para los grupos experimentales están en la parte inferior del panel D. La significancia estadística es como se indicó en la Fig. 6.

El contenido de glutatión en la mucosa gástrica disminuyó en los animales con gastritis (T0), lo que correlacionó con el incremento en la generación de EROS; el nivel de éste antioxidante se normalizó a las 96 horas de haber retirado el etanol (Fig. 10D), a pesar de que la LP de las membranas plasmáticas estaba todavía aumentada (Fig. 1B).

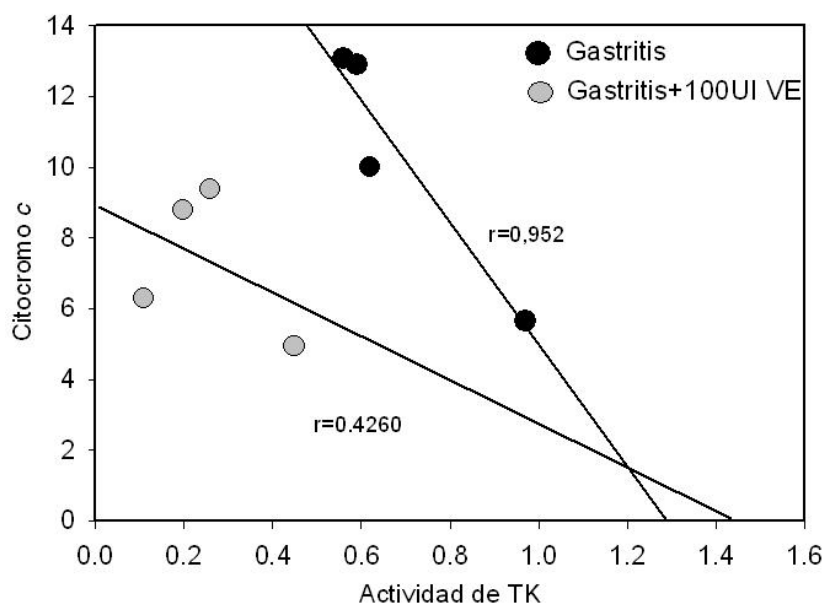
El  $\alpha$ -tocoferol produjo un incremento de glutatión desde tiempos tempranos, el cual persistió hasta las 72 horas y se redujo de manera significativa a las 96 horas (Fig. 10D). La vitamina E no cambió de forma significativa los sistemas antioxidantes en las mucosas gástricas normales (datos no mostrados)

**Eventos apoptóticos en las células de la mucosa gástrica de animales con gastritis y tratados con  $\alpha$ -tocoferol.** La inhibición del crecimiento celular puede ser transitoria o permanente y en el último caso puede terminar en apoptosis (18). Algunos índices apoptóticos se midieron en los grupos experimentales (Fig.11).



**Fig. 11. Eventos apoptóticos determinados a través de marcadores bioquímicos en la mucosa gástrica de animales con gastritis y tratados con vitamina E.** Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar de cinco determinaciones individuales. Panel D: bandas representativas de citocromo c. Líneas: 1) Estándar de citocromo c (12500 Da), 2) control, 3) gastritis T0, 4 y 5) Gastritis 24 y 96 hr; y, 6 y 7) Gastritis + vitamina E 72 y 96 hr respectivamente.

En los animales con gastritis, el nivel de actividad de caspasas citosólicas, caspasa-3 (Fig. 11A), caspasa-9 (Fig.11B) y caspasa-8 (Fig. 11C) se incrementó de manera importante a las 96 horas de haber retirado el etanol. En estos animales, la máxima actividad de caspasas coincidió con un aumento significativo de la liberación de citocromo *c* dentro de la fracción citosólica (96 horas; Fig. 11D). El contenido de citocromo *c* citosólico estuvo dentro de los niveles normales en el mismo tiempo donde se presentó la máxima LP de las membranas plasmáticas (Fig. 6B) y la máxima respuesta proliferativa (Fig. 9). El tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol incrementó gradualmente la actividad de caspasas y la liberación de citocromo *c*, principalmente de 72 a 96 horas (Fig. 11A-D). El aumento en la actividad de las caspasas y en la liberación del citocromo *c* se acompañaron del aumento en la cantidad de cuerpos apoptóticos (no mostrados).



**Fig.12. Correlación entre el nivel citosólico de citocromo *c* y actividad de timidín cinasa en la mucosa gástrica de animales con gastritis y tratados con  $\alpha$ -tocoferol.** Los datos se tomaron de las figuras 4 y 6, Se encontró una correlación entre la liberación de citocromo *c* en el citosol (indicador de apoptosis) y actividad de TK (parámetro de proliferación). El coeficiente de correlación (*r*) fue calculado para animales con gastritis ( $r = -0.95$ ,  $p < 0.001$ ) y para animales tratados con 100 UI/kg de vitamina E ( $r = -0.42$ ,  $p$ : no significativa).

Al graficar estos datos, se encontró una correlación directa entre el nivel de TBARS en las membranas plasmáticas y la proporción de proliferación celular (actividad de TK;  $r = 0.71$ ,  $p < 0.01$ ) y, una correlación inversa ( $r = -0.84$ ,  $p < 0.005$ ) entre la actividad de TK y la actividad de SOD citosólica y, entre la actividad de SOD y el contenido de

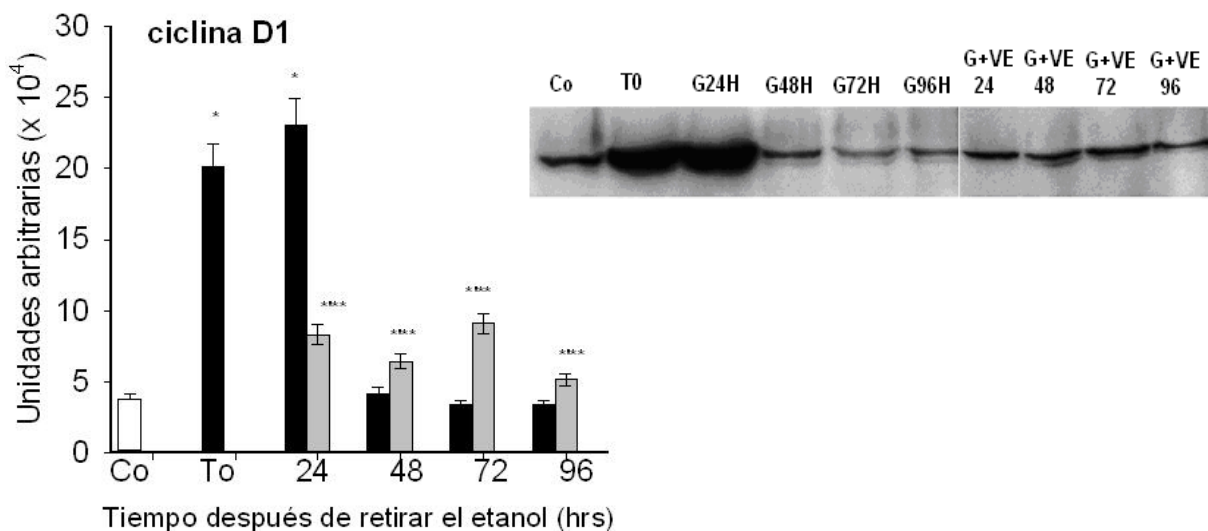


TBARS en las membranas plasmáticas ( $r = -0.70$ ,  $p < 0.01$ ). La proporción de LP correlaciona con la magnitud de la proliferación celular en la mucosa gástrica dañada.

Al buscar una correlación entre los parámetros proliferativos y apoptóticos, se encontró una correlación inversa significativa ( $r = -0.95$ ,  $p < 0.001$ ) entre la liberación de citocromo *c* y la actividad de TK (Fig. 12). Esta correlación podría significar una regulación recíproca entre estos dos procesos antagónicos, y parece alterarse drásticamente por la administración in vivo de vitamina E ( $r = -0.42$ , no significativa); lo que sugiere que la modificación del estado oxidativo celular puede distorsionar la regulación controlada entre estos dos procesos celulares (Fig. 12).

### Niveles de ciclina D1 en animales con gastritis, tratados o no con $\alpha$ -tocoferol.

Por medio de un análisis de "western-blot" en fracciones subcelulares de la mucosa gástrica de los grupos experimentales (Fig. 13), se encontró que la cantidad de ciclina D1 en los núcleos de las células gástricas se incrementó a T0, alcanzando valores aproximadamente siete veces mayores de los encontrados para el grupo control. El incremento en el nivel de ciclina D1 se mantuvo elevado durante las primeras 24 horas de la recuperación de la mucosa gástrica, después de este tiempo, se redujo hasta los valores basales (48-96 h; Fig. 13).



**Fig.13. Expresión de ciclina D1 en la mucosa gástrica detectada en núcleos aislados de animales con gastritis y tratados con vitamina E.** En la parte superior de la figura análisis por western blot de tres series independientes para ciclina D1, animales control (Co), Gastritis (G), gastritis y tratamiento con vitamina E (G+VE). Los números representan las horas después de haber retirado el etanol. En la parte inferior, análisis densitométrico de los blots. Significancia estadística: \* $p < 0.01$  vs control, \*\* $p > 0.01$  vs gastritis.

---

Por el contrario, en los animales con gastritis y tratados con vitamina E, el nivel de ciclina D1 nuclear se incrementó ligeramente a las 24 horas de retirar el etanol (2.5 veces sobre el control), y prácticamente se mantuvo en estos valores durante todo el tiempo de estudio, excepto por un pequeño aumento (comparado con el grupo de gastritis de recuperación espontánea) a las 72 horas (Fig. 13). El  $\alpha$ -tocoferol, no modificó de manera significativa los niveles citoplásmicos de ciclina D1 en ninguno de los grupos experimentales (datos no mostrados).

---

## DISCUSION

Diferentes estudios han demostrado que las especies reactivas de oxígeno (EROS) están relacionadas con el efecto tóxico de varios agentes en varios sistemas celulares. Las EROS son capaces de dañar a las células al interactuar con biomoléculas como lípidos, proteínas y DNA llegando a producir la muerte celular. Se tiene evidencia de que altas concentraciones de EROS son claramente perjudiciales, sin embargo, el efecto de de estas especies en concentraciones bajas no está muy claro. Recientemente, se ha involucrado a las EROS en los procesos biológicos normales como diferenciación y proliferación celular, participación en la contracción muscular, expresión de genes, envejecimiento y apoptosis, dándoles un nuevo papel como posibles factores de control en la homeóstasis celular (65).

Para entender el impacto de las EROS, es importante entender los efectos benéficos y perjudiciales de los antioxidantes. Estos pueden proteger a las células de los efectos tóxicos de las EROS pero también pueden inhibir el papel fisiológico de las especies reactivas (65). Esto puede estar basado en la observación de que la exposición a bajos niveles de EROS puede incrementar la respuesta al crecimiento de muchos tipos de células de mamíferos (2). Sin embargo, también se ha demostrado que los atrapadores de EROS pueden suprimir la proliferación de diferentes sistemas celulares *in vivo* e *in vitro* (7,66,67,68).

Como se ha reportado previamente (11), encontramos que el aumento en la proporción de lipoperoxidación (LP) que se presenta en las membranas plasmáticas durante el periodo de recuperación parece ser un evento selectivo y controlado (Fig.6), el cual claramente coincide en temporalidad con el incremento en los parámetros de proliferación celular durante el periodo de recuperación (Fig. 8 y 9). En este modelo de gastritis, los antioxidantes endógenos (SOD y glutatión) disminuyeron a tiempos tempranos (Fig. 10), probablemente como una respuesta al daño gástrico inducido por el etanol en ratas. Ambos antioxidantes, participan de manera importante en la destoxicación de oxiradicales y de sus subproductos (69), Sin embargo, a pesar de que las defensas antioxidantes fueron normalizadas durante la gastritis, un segundo pico de LP se presentó durante la restauración del epitelio gástrico. Estos resultados sugieren que la segunda elevación en los parámetros de LP está relacionada directamente con el proceso de recuperación y de proliferación de la mucosa gástrica previamente dañada, en

---

lugar de ser un reflejo del daño persistente inducido por el etanol. Esto coincide con la hipótesis de que el estado oxidativo, mediado por EROS, está unido a la recuperación y proliferación de la mucosa gástrica dañada.

La administración de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) cambio estos patrones. Después de su administración, se acumuló progresivamente en el tejido durante las primeras 72 horas. Después el contenido de  $\alpha$ -tocoferol empezó a disminuir a pesar de que los animales continuaron recibiendo el antioxidante. Después del tratamiento con vitamina E se presentó una reducción en los niveles de TBARS, acompañada del incremento en el nivel de glutatión y de actividad de SOD en la mucosa gástrica (Fig. 10). Entonces, es posible que el efecto antioxidante de la vitamina E esté asociado con el aumento de los antioxidantes endógenos, lo cual podría explicar porque el  $\alpha$ -tocoferol, un atrapador de EROS liposoluble, ejerce un efecto antioxidante en la célula completa. De esta manera, los antioxidantes intracelulares podrían tener un papel crucial en la regulación de la LP durante el proceso de proliferación compensatoria que ocurre en la mucosa gástrica dañada por la administración de etanol. La acción antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol (Fig. 6) coincidió en temporalidad con su efecto antiproliferativo (Fig. 9), lo cual se reflejó en una recuperación deficiente del epitelio gástrico y la escasa restauración de la mucosa gástrica (Fig. 8). De esta manera, la manipulación *in vivo* del estatus oxidativo y de la proporción de LP a través de la administración de elevadas dosis de  $\alpha$ -tocoferol permite demostrar que los cambios en el estado redox de la célula están relacionados con la capacidad proliferativa de la mucosa gástrica. Se ha demostrado que, la proliferación celular activa que ocurre en el hígado en regeneración esta cercanamente relacionado con modificaciones adaptativas en la proporción de LP y el estado oxidativo (51,57). Así como con la relación  $NAD^+/NADH$  en los compartimientos citosólicos y mitocondriales (70,71). En el mismo contexto, se ha mostrado que la producción de EROS correlaciona *in vitro* con la habilidad de las células aisladas para progresar a través del ciclo celular. Esto permite proponer que la modulación del estado redox puede proporcionar un mecanismo para explicar la acción antiproliferativa de los antioxidantes en células cancerosas (72). De esta manera los resultados de este estudio realizado *in vivo* soportan esta hipótesis.

El aumento en la actividad de SOD disminuye el crecimiento celular al convertir el anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (73,74). Se ha considerado que estas especies reactivas actúan como moléculas de señalización intracelular y que tienen

---

un papel importante en la proliferación y en la muerte celular dependiendo de su concentración (2). Entonces, el balance de las concentraciones de estos compuestos es crítico para la célula y probablemente la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por el incremento en la actividad de SOD sobrepasa la destoxificación mediada por el glutatión, lo que puede producir una disminución en el crecimiento celular (73). De acuerdo con estos reportes, los datos del presente estudio indican que la supresión de la proliferación celular gástrica por  $\alpha$ -tocoferol está relacionada con el efecto antioxidante de la vitamina E, lo que sugiere que el aumento en la LP y los cambios en el estado redox son necesarios para la progresión del ciclo celular durante la recuperación de la mucosa gástrica. En este contexto, nosotros encontramos una clara correlación entre los parámetros indicativos de LP y aquellos que representan un aumento en la síntesis de DNA y la proliferación celular (Fig.12).

Este estudio demuestra que los antioxidantes y el estrés oxidativo modulan la proliferación de la mucosa gástrica. Bajo nuestras condiciones experimentales, los antioxidantes ejercen un potente efecto inhibitorio de la proliferación de las células de la mucosa gástrica. De hecho, la generación continua de EROS parece ser necesaria para mantener la síntesis de DNA y, la reducción en el nivel de estas especies evita la recuperación del epitelio gástrico. Por otro lado, se ha publicado que la inhibición del crecimiento celular produce apoptosis (6), y que los efectos antiproliferativos de algunos antioxidantes parecen estar asociados con la inducción de la apoptosis (6, 74,75). A pesar de que se ha considerado que el  $\alpha$ -tocoferol ejerce un efecto antiapoptótico (75,76), también se ha aceptado que la vitamina E puede disminuir la proliferación de células cancerosas a través de la estimulación de la apoptosis (77). El presente estudio muestra que en condiciones *in vivo*, los eventos apoptóticos se llevan a cabo después de una proliferación celular activa, revelando un mecanismo coordinado durante la hiperplasia compensatoria de la mucosa gástrica dañada. El efecto antioxidante de la vitamina E en las membranas plasmáticas fue muy claro a las 72 horas; sin embargo, a las 96 horas el nivel de TBARS fue significativamente elevado, a pesar de que los animales estaban bajo un tratamiento antioxidante. Esta elevación de LP coincide con la reducción en el contenido de vitamina E en la mucosa gástrica, con la elevación en la actividad de Mn-SOD, con niveles reducidos de glutatión y con la aparición de los eventos apoptóticos. El  $\alpha$ -tocoferol parece desincronizar los eventos proliferativos y apoptóticos; la vitamina E aparentemente retrasa la vía apoptótica mitocondrial (caspasa-9), mientras que acelera la vía extrínseca (caspasa-8; Fig.11).

---

El hecho de que la vitamina E pueda ejercer un efecto dual *in vivo* al inhibir la proliferación o al estimular la muerte celular de la mucosa gástrica, es consistente con el concepto de que la respuesta al nivel de estrés oxidativo es bifásica. Dosis moderadas de EROS inducen la proliferación celular, mientras que dosis elevadas promoverán acciones citotóxicas (18). Aunque es conocido que enzimas antioxidantes como SOD (5), catalasa (78), o agentes no enzimáticos como el  $\beta$ -caroteno (79) y los flavonoides (80), disminuyen la proliferación de diferentes cultivos celulares, incluyendo la vitamina E que inhibe la proliferación en líneas celulares de músculo liso (81), el mecanismo que involucra al estrés oxidativo en la inducción de la proliferación celular y de los procesos apoptóticos todavía no es bien conocido.

La inhibición de la proliferación celular inducida por el  $\alpha$ -tocoferol en modelos *in vivo* (68) o *in vitro* en líneas celulares (82) parece estar asociado con la inhibición de la activación de PKC- $\alpha$  (81), como un efecto independiente de su propiedad antioxidante. Sin embargo, debido a que reportes recientes que muestran que varios antioxidantes estructuralmente diferentes son capaces de inhibir la proliferación en diferentes modelos celulares *in vivo* e *in Vitro*, existe controversia acerca de que el efecto antiproliferativo de la vitamina E sea o no mediado por su propiedad antioxidante.

Se ha reportado que el  $\alpha$ -tocoferol es capaz de disminuir la activación de NF $\kappa$ B (83,84); sin embargo, este factor transcripcional es activado por EROS como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (85). El NF $\kappa$ B regula la expresión de genes cuyos productos están involucrados en la tumorigénesis, tales como el gen antiapoptótico bcl-2 y la ciclina D1; sin embargo, la inhibición de la activación de NF $\kappa$ B también reduce la expresión de proteínas antiapoptóticas (85). De esta forma, el efecto antiproliferativo y la aceleración de la apoptosis encontrados en la mucosa gástrica dañada y tratada con  $\alpha$ -tocoferol, podrían estar mediados a través de la inhibición de NF $\kappa$ B y de la ciclina D1. De hecho, la ciclina D1 tiene un papel importante en la regulación de la progresión del ciclo celular y tiene propiedades oncogénicas (86). pRB puede constituir el mayor blanco del complejo ciclina D1/cdk4 y la fosforilación de pRB por este complejo libera el factor de transcripción E2F, habilitando genes blanco activos responsables de la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular (87). El  $\gamma$ -tocoferol inhibe la progresión del ciclo celular y la proliferación en células cancerosas humanas a través de la baja regulación de las ciclinas (80) y la deficiencia de vitamina E bajo regula la expresión de genes importantes para la inhibición de la apoptosis (bcl2) y del ciclo celular (ciclina D1) en el hígado de rata (88). Esto argumenta a

---

favor de que la vitamina E influye en la expresión de ciclina D1, probablemente entre otros factores de transcripción.

Los resultados de este estudio demuestran que la administración de vitamina E a ratas con daño gástrico inducen una disminución abrupta en los niveles de ciclina D1 (Fig. 8), y también sugieren que la traslocación y la activación en el núcleo (más que la expresión de la ciclina D1) fueron los blancos de la acción antiproliferativa de la vitamina E. Nosotros proponemos que la proporción de EROS generadas en la células puede sincronizar la traslocación de factores transcripcionales activos del citoplasma al interior del núcleo durante la progresión del ciclo celular.

El efecto de las EROS sobre la fisiología celular normal podría depender de la especificidad celular, la fuente y del tipo de radical, así como de la naturaleza del mecanismo molecular que regula la progresión del ciclo celular (7). A pesar de que los efectos antiproliferativos del  $\alpha$ -tocoferol podrían ser atribuidos al efecto sobre las vías de señales celulares independientemente de sus propiedades antioxidantes (6), la vitamina E fue una herramienta excelente para revelar el estricto balance que existe entre la proliferación celular y la apoptosis en nuestro modelo experimental de daño crónico a la mucosa gástrica inducido por etanol en ratas. Esto se demostró por la pérdida que produce la vitamina E en la correlación encontrada entre un parámetro proliferativo (actividad de TK) y un indicador apoptótico (liberación de citocromo c; Fig. 7). Incluso, aún reconociendo que una correlación no es evidencia de causalidad, la notable correlación encontrada en condiciones *in vivo* y el efecto del  $\alpha$ -tocoferol de dissociar estos parámetros, permite asumir que el balance entre la proliferación y los eventos apoptóticos pueden estar controlados por el estado oxidativo de la mucosa gástrica de rata.

El presente estudio podría ser el primer reporte que muestra, bajo condiciones experimentales *in vivo*, la existencia de un control recíproco de dos vías celulares antagónicas que comparten factores transcripcionales, la proliferación celular y la apoptosis. En este contexto, y a pesar de que todavía es difícil explicar la naturaleza de la segunda elevación de los eventos oxidativos en las membranas plasmáticas de los animales con gastritis después de retirar el etanol, se puede especular una hipótesis que supone que, la caída de LP y la aparición repentina de proteínas oxidadas en las membranas plasmáticas de estos animales es un tipo de interruptor que apaga la proliferación celular y estimula los eventos apoptóticos en tiempos tardíos del periodo de recuperación (72-96 horas); esta posibilidad requiere de mayor investigación.

---

## CONCLUSIÓN

Los resultados sugieren que el incremento selectivo de lipoperoxidación que resulta de los cambios controlados en el estado oxidativo celular, es un evento necesario relacionado con la progresión de la proliferación celular, lo que parece modular la magnitud y el curso temporal de la proliferación celular y los eventos apoptóticos. Por lo que se considera que un incremento “fisiológico” en la lipoperoxidación de las membranas plasmáticas parece controlar la sincronización de la proliferación celular y de la apoptosis que se presentan durante la restauración de las células epiteliales en la mucosa gástrica dañada. Por lo cual, la temporalidad, la localización y la magnitud de la producción de especies reactivas de oxígeno son factores importantes para determinar el destino de las células.



---

## REFERENCIAS

1. Thannickal VJ, Fanburg BL., 2000, Reactive oxygen species in cell signalling, AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY- LUNG CELL MOLECULAR AND PHYSIOLOGY, 279(6): L1005-1028.
2. Burdon RH.,1995, Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE, 18(4): 775-794.
3. Ruiz-Gines J., López-Ongil S., González-Rubio M., González-Santiago L, Rodríguez-Puyol M., Rodríguez-Puyol D., 2000, Reactive oxygen species induce proliferation of bovine aortic endothelial cells, JOURNAL OF CARDIOVASCULAR PHARMACOLOGY, 35(1):109-113.
4. Laurent C., Pouget JP., Voisin P., 2005, Modulation of DNA damage by pentoxifylline and  $\alpha$ -tocopherol in skin fibroblasts exposed to gamma rays. RADIATION RESEARCH,164(1):63-72.
5. Shi M., Yang H., Motley ED., Guo Z., 2004, Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase and/or catalase in mice inhibits aorta smooth muscle cell proliferation, AMERICAN JOURNAL OF HYPERTENSION, 17(5): 450-456.
6. McIntyre BS., Briski KP., Timenstein MA., Fariss MW., Gapor A., Sylvester Pw., 2000, Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tototrienols on normal mouse mammary epithelial cells, LIPIDS, 35(2):171-180.
7. Wang HP, Schafer FQ, Goswami PC., Oberley LW., Buettner GR., 2003, Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase induces a delay in G1 of the cell cycle, FREE RADICAL RESEARCH, 37(6):621-630.
8. Holian O., Wahid S., Atten M., Attar BM., 2002, Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide, AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY, 282(5):G809-G816.
9. La casa C., Villegas I., Alarcón de la Lastra C., Motilva V., Martín-Calero MJ, 2000, Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions, JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, 71(1-2):45-53.
10. Moghadasian M., Godin D., 1996, Ethanol- induced gastrointestinal damage influence of endogenous antioxidant components and gender, DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES, 41(4):791-797.
11. Hernández-Muñoz R., Montiel-Ruiz C., Vázquez-Martínez O., 2000, Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats, LABORATORY INVESTIGATION, 80(8): 1161-1169.

- 
12. Hernández-Muñoz R., Montiel-Ruiz F., 1996, Reversion by histamine H2-receptor antagonists of plasma membrane alterations in ethanol-induced gastritis, *DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES*, 41(11):2156-2165.
  13. Di Mascio P., Murphy ME, Sies H, 1991, Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and triols, *AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION*, 53 (1 supl.): 194S-200S.
  14. Grisham MB., 1992, *REACTIVE METABOLITES OF OXYGEN AND NITROGEN IN BIOLOGY AND MEDICINE*, Armstrong Printing Co., Austin, Texas, Estados Unidos, pp.1-33
  15. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MTD., Mazur M., Telser J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *THE INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY*, 39(1):44-84.
  16. Cederbaum A., 2006, CYP2E1-Biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury, *THE MOUNT SINAI JOURNAL OF MEDICINE*, 73(4):658-672.
  17. Zangar RC., Davydov DR., Verma S., 2004, Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450, *TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY*, 199 (3):316-331.
  18. Boonstra J., Post JA., 2004, Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progresión in mammalikan cells, *GENE*, 337:1-13.
  19. Bergamini CM., Gambetti S., Dondi A., Cervallati C., 2004, Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage, *CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN*, 10(14):1611-1626.
  20. Devron CA., 1991, Absorption, transport and metabolism of vitamin E, *FREE RADICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 14(4):229-246.
  21. Mates JM., 2000, Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology, *TOXICOLOGY*, 153(1-3):83-104.
  22. Jones D., 2002, Bioavailability of glutathione, *HANDBOOK OF ANTIOXIDANTS*, 2a. ed., Enrique Cadenas, Lester Packer ed. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos, pp.549-564.
  23. Burton GW., Ingold KU.,1984,  $\beta$ -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant, *SCIENCE*, 224(4649):569-573.
  24. May JM., 1999, Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?, *THE FASEB JOURNAL*, 13(9):995-1006.
  25. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL, 2001, Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *ANNUAL REVIEW OF NUTRITION*, 21:381-406

- 
26. Sutherland BA, Rahman RM, Appleton I., 2006, Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration, *JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY*, 17(5):291-306.
  27. Banks M., 1997, Vitamin E and polyunsaturated fats: antioxidant and pro-oxidant relationship, *OXIDANTS, ANTIOXIDANTS AND FREE RADICALS*, Steven Baskin, Harry Salem Taylor & Francis, Estados Unidos., pp.95-111.
  28. Weber S., Rimbach G., 2002, Biological Activity of Tocotrienols, *HANDBOOK OF ANTIOXIDANTS 2<sup>a</sup>ed.*, Enrique Cadenas Lester Packer, Estados Unidos, Marcel Dekker, Inc. pp.109-116
  29. Schultz M., leist M., Petrzika M., Gassmann B., Brigelius-Flohé R., 1995, Novel urinary metabolite of  $\alpha$ -tocopherol, 2,5,7,8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply?, *AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION*,62(Supl. 6):1527S-1534S.
  30. Traber M., 2002, Vitamin E bioavailability, biokinetics, and metabolism, *HANDBOOK OF ANTIOXIDANTS, 2<sup>a</sup>ed.*, Enrique Cadenas Lester Packer, Estados Unidos., Marcel Dekker, Inc., pp. 99-108.
  31. Landvik S., Diplock A., Packer L., 2002, Efficacy of vitamin E in human health and disease, *HANDBOOK OF ANTIOXIDANTS, 2a. ed.*, Enrique Cadenas, Lester Packer, ed. Marcel Dekker Inc., Estados Unidos, pp.75-97.
  32. Salem H., Baskin S., 1997, The toxicology of antioxidants, *OXIDANTS, ANTIOXIDANTS, AND FREE RADICALS*, Steven Baskin, Harry Salem, Taylor & Francis, Estados Unidos, pp.207-226.
  33. Brigelius-Flohé R., Traber MG., 1999, Vitamin E: function and metabolism, *THE FASEB JOURNAL*, 13(10):1145-1155.
  34. Badui S., 1990, *QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS, 2<sup>a</sup>. Ed.*, Alambra mexicana, México, pp. 380-385, 356-360.
  35. Bandyopadhyay U., Das D., Banerjee RK., 1999, Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis, *CURRENT SCIENCE*, 77(5):658-666.
  36. Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J., 2001, Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation, *CELLULAR PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY*,11(4):173-186.
  37. Schneider C., 2005, Chemistry and biology of vitamin E, *MOLECULAR NUTRITION & FOOD RESEARCH*, 49(1):7-30.
  38. Palozza P., Serini S., Torsello A., Di Nicuolo F., Piccioni E., Ubaldi V., Pioli C., Wolf FI., Calviello G., 2003,  $\beta$ -carotene regulates NF $\kappa$ B DNA-binding activity by a redox mechanism in human leukemia and colon adenocarcinoma cells, *JOURNAL OF NUTRITION*, 133(2):381-388.

- 
39. Lieber C., 1982, Chapter 1, "metabolism of ethanol", MEDICAL DISORDERS OF ALCOHOLISM PATHOGENESIS AND TREATMENT, vol, XXII, Canadá, W.B:Senders Company, pp. 1-42.
  40. Kitson KE., 1996, Etanol and acetaldehyde metabolism; past, present, and future, ALCOHOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH, 20(Supl. 8):82A-92A.
  41. Sun A., Ingelman-Sundberg M., Neve E., Matsumoto H., Nishitani Y., Minowa Y., Fukui Y., Bailey S., Pate V., Cunningham C., Zima T., Fialova L., Mikulikova L., Popov P., Malbohan I., Janebova M., Nespok K., Sun G., 2001, Ethanol and oxidative stress, ALCOHOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH, 25(supl 5):237S-243S.
  42. Caballería J., 2003, Current concepts in alcohol metabolism, ANNALS OF HEPATOLOGY, 2(2):60-68.
  43. Pronko P., Barina L., Satanovskaya V., Kuzmich A., Zimatkin S., 2002, Effect of chronic alcohol consumption on the ethanol-and acetaldehyde-metabolizing systems in the rat gastrointestinal tract, ALCOHOL & ALCOHOLISM, 37(3):229-235.
  44. Ammon E., Schafer C., Hofman U, Klotz U, 1996, Disposition and first pass metabolism of ethanol in humans: is it gastric or hepatic and does it depend on gender?, CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 59(5), 503-513.
  45. Karam SM., Leblond CP., 1993, Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach I. Identification of proliferative cell types and pinpointing of the stem cell, THE ANATOMICAL RECORD, 236(2):259-279.
  46. Eastwood GL., 1995, A review of gastrointestinal epithelial renewal and its relevance to the development of adenocarcinomas of the gastrointestinal tract, Journal Clinical GASTROENTEROLOGY, 21(supl.1):S1-S11.
  47. Paimela H., Goddard P., Silen W., 1995, Present views on restitution of gastrointestinal epithelium, DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES, 40 (11):2495-2496.
  48. Lee SL., Chau GY, Yao CT., Wu CW, Yin SJ., 2006, Functional assessment of human alcohol dehydrogenase family in ethanol metabolism: significance of first-pass metabolism, ALCOHOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH, 30(7):1132-1142.
  49. Oates P., Hakkinen J., 1988, Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats, GASTROENTEROLOGY, 94(1):10-21.
  50. Lacy ER., 1985, Prostaglandins and histological changes in the gastric mucosa, DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES, 30 (11 Supl.):83S-94S.
  51. Aguilar-Delfín 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(3):657-662.

- 
52. Junqueira V., Carrasquedo F., Azzalis L A., Giavarotti K., Giavarotti L., Rodríguez L., Fraga CG., Boveris A., Videla LA., 2000, Content of liver and brain ubiquinol-9 and ubiquinol-10 after chronic ethanol intake in rats subjected to two levels of dietary  $\alpha$ -tocopherol, *FREE RADICAL RESEARCH*, 33(3): 313-319.
  53. Hernández-Muñoz R., Glender W., Díaz-Muñoz M., García-Sáinz JA., Chagoya de Sánchez V., 1984, Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. *BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY*, 33(16): 2599-2604.
  54. Levine RL., Garland D., Oliver CN., Amici A., Climent I., Lenz AG., Lahn BW., Shaltiel S., Stadtman ER., 1990, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *METHODS OF ENZYMOLOGY*, 186: 464-485.
  55. Sauer H., Wilmanns W., 1985, Thymidine kinase. In: Bermeyer HU, editor, *METHODS OF ENZYMATIC ANALYSIS*, Vol.3, Deefield Beach: VCH Publishers, pp. 468-473.
  56. Diehl AM., Wells M., Brown ND., Thorgeirsson S., Steer C., 1990, Effect of ethanol on polyamine synthesis during liver regeneration in rats. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION*, 85(2): 385-390.
  57. Trejo-Solis C., Chagoya de Sánchez V., Aranda-Fraustro A., Sánchez-Sevilla L., Gomez-Ruiz C., Hernández-Muñoz R., 2003, Inhibitory effect of vitamin E administration on the progression of liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats, *LABORATORY INVESTIGATION*, 83(11): 1669-1679.
  58. Hernández-Muñoz R., Díaz-Muñoz M., Suárez-Cuenca JA., Trejo-Solis C., López V., Sánchez-Sevilla L., Yañez L., Chagoga de Sánchez V., 2001, Adenosine reverses a preestablished CCl<sub>4</sub>-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats, *HEPATOLOGY*, 34(4 pt 1):677-687.
  59. Flohé L, Ötting F, 1984, Superoxide dismutase assays, *METHODS OF ENZYMOLOGY*, 105: 93-104.
  60. Akerboom TPM, Sies H, 1981, Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples, *METHODS OF ENZYMOLOGY*, 77: 373-382.
  61. Thornberry NA, 1994, Interleukine-1 $\alpha$  converting enzyme, *METHODS OF ENZYMOLOGY*, 244: 615-631.
  62. Flores–Encarnación M, Contreras-Zentella M, Soto-Urzúa L, Aguilar GR, Baca BE, Escamilla JE, 1999, The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 181(22): 6987-6995.
  63. García-Horsman JA, Barqura B, González-Halphen D, Escamilla JE, 1991, Purification and characterization of two-subunit cytochrome aa<sub>3</sub> from *Bacillus cereus*, *MOLECULAR MICROBIOLOGY*, 5(1):197-205.

- 
64. Sindic A, Aleksandrova A, Fields AP, Volinia S, Banfic H, 2001, Presence and activation of nuclear phosphoinositide 3-kinase C2- $\beta$  during compensatory liver growth, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 276(21): 17754-17761.
  65. Martin KR., Barrett JC., 2002, Reactive oxygen species as double edged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity, HUMAN & EXPERIMENTAL TOXICOLOGY, 21(2): 71-75
  66. Chung TW, Moon SK, Chang YC, Ko JH, Lee YC, Cho G, Kim SH, Kim JG, Kim CH, 2004, Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism, THE FASEB JOURNAL. 18(14): 1670-1681.
  67. Neuzil J., Zhao M., Ostermann G., Sticha M., Gellert N., Weber C., Eaton JW., Brunk UT., 2002,  $\alpha$ -Tocopheryl succinate, an agent with *in vivo* anti-tumor activity, induces apoptosis by causing lysosomal instability, THE BIOCHEMICAL JOURNAL, 362(Pt.3):709-715.
  68. Cuppini, R., Ciaroni, S., Cecchini, T., Ambrogini, P., Ferri, P., Del Grande, P., Papa, S., 2001,  $\alpha$ -Tocopherol controls cell proliferation in the adult rat dentate gyrus, NEUROSCIENCE LETTERS, 303(3):198-200.
  69. Zaidi SM., Al-Qirim TM., Hoda N, Banu N., 2003, Modulation of restraint stress induced oxidative changes in rats by antioxidant vitamins. THE JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY, 14(11): 633-636.
  70. Gutierrez-Salinas J., Miranda-Garduño L., Trejo-Izquierdo E., Díaz-Muñoz M., Vidrio S., Morales-González JA., Hernández-Muñoz R., 1999, Redox state and energy metabolism during liver regeneration. Alterations produced by acute ethanol administration, BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, 58(11):1831-1839.
  71. Hernández-Muñoz R., Sánchez-Sevilla L., Martínez-Gómez A., Dent MA., 2003, Changes in mitochondrial adenine nucleotides and in permeability transition in two models of rat liver regeneration, HEPATOLOGY, 37(4):842-851.
  72. Irani K., Xia Y., Zweier JL, Sollot SJ, Der CJ., Fearon ER., Sudaresan M., Finkel T., Goldschmidt-Clermont PJ, 1997, Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts, SCIENCE, 275(5306):1649-1652.
  73. Ough M., Lewis A., Zhang Y., Hinkhouse MM., Ritchie JM., Oberley LW., Cullen JJ., 2004, Inhibition of cell growth by overexpression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in human pancreatic carcinoma, FREE RADICAL RESEARCH, 38(11):1223-1233.
  74. Zhang Y., Zhao W., Zhang HJ., Domann FE., Oberley L.W., 2002, Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. CANCER RESEARCH, 62(4):1205-1212.

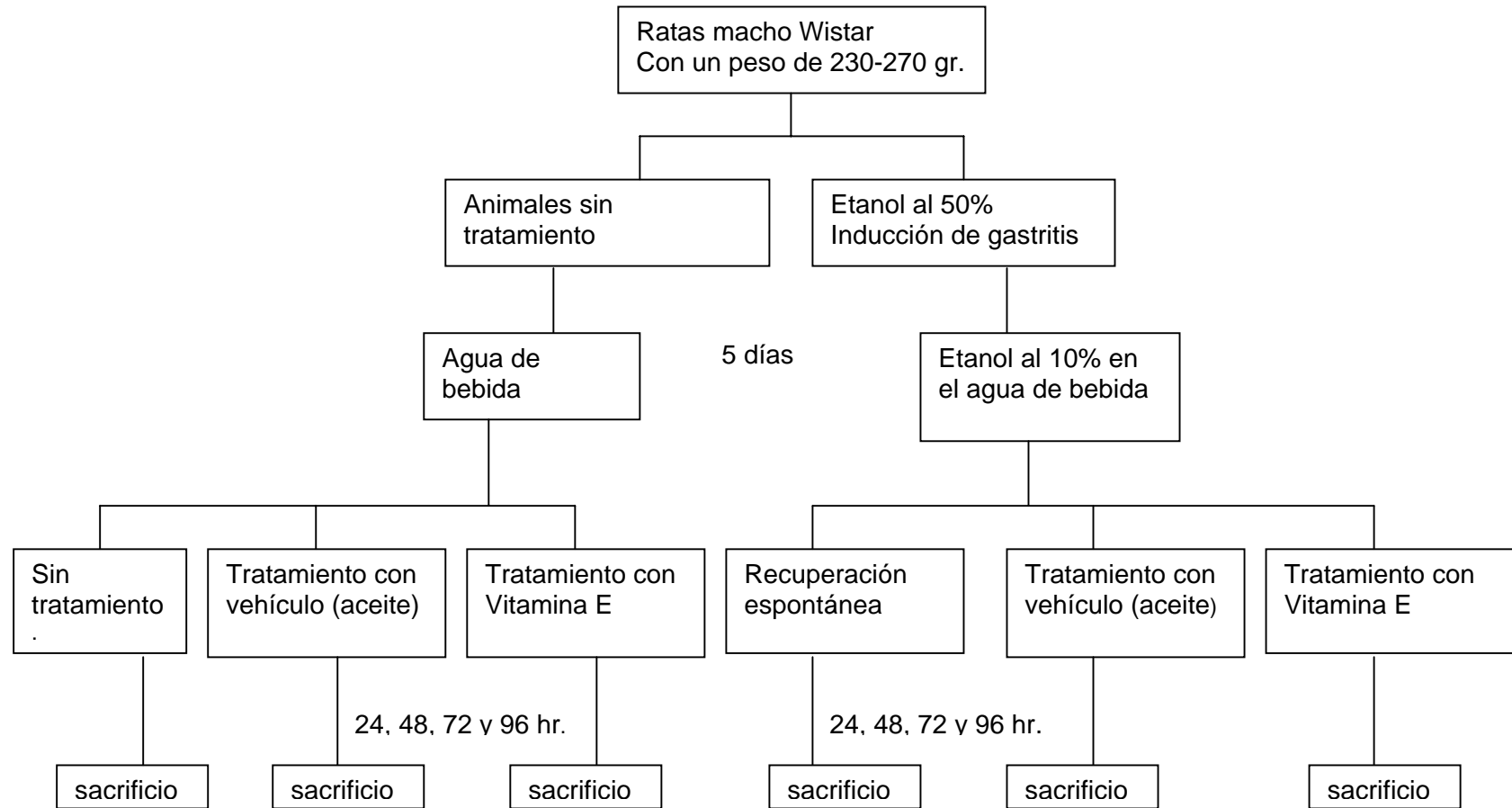
- 
75. Herrera B., Murillo MM., Alvarez-Barrientos A., Beltran J., Fernández M., Fabregat I., 2004, Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor- $\beta$  in fetal rat hepatocytes, *FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE*, 36(1):16-26.
  76. Heaton MB., Madorsky I., Paiva M., Siler-Marsiglio KI., 2004, Vitamin E amelioration of ethanol neurotoxicity involves modulation of apoptosis-related protein levels in neonatal rat cerebellar granule cell, *BRAIN RESEARCH, DEVELOPMENTAL BRAIN RESEARCH*, 150(2):117-124.
  77. Sigounas G., Anagnostou A., Steiner M., 1997, dl- $\alpha$ -tocopherol induces apoptosis in erythroleukemia, prostate, and breast cancer cells, *NUTRITION AND CANCER*, 28(1): 30-35.
  78. Policastro L., Molinari B., Larcher F., Blanco P., Podhajcer OL., Costa CS., Rojas P., Duran H., 2004, Imbalance of antioxidant enzymes in tumor cells and inhibition of proliferation and malignant features by scavenging hydrogen peroxide, *MOLECULAR CARCINOGENESIS*, 39(2):103-113.
  79. Klaunig JE., Kamendulis LM., 2004, The role of oxidative stress in carcinogenesis. *ANNUAL REVIEW OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY*, 44:239-267.
  80. Agarwal C., Singh RP., Dhanalakshmi S., Tyagi AK., Tecklengurg M., Sclafani RA., Agarwal R., 2003, Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. *ONCOGENE*, 22(51): 8271-8182.
  81. Chatelain E., Boscoboinik DO., Bartoli GM., Kagan VE., Gey FK., Packer L., Azzi, A., 1993, Inhibition of smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity by tocopherols and tocotrienols, *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA*, 1176(1-2): 83-89.
  82. Gysin R., Azzi A., Visarius T., 2002,  $\gamma$ -Tocopherol inhibits human cancer cells cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins, *THE FASEB JOURNAL*, 16(14):1952-1954.
  83. Hughes G., Murphy MP., Ledgerwood EC., 2005, Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor  $\kappa$ B to modulate tumor necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants, *THE BIOCHEMICAL JOURNAL*, 389(Pt. 1):83-89.
  84. Devaraj S., Jialal I., 2005,  $\alpha$ -Tocopherol decreases tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA and protein from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase, *FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE*, 38(9):1212-1220.
  85. Robbesyn F., Salvayre R., Negre-Salvayre A., 2004, Dual role of oxidized LDL on the NF- $\kappa$ B signaling pathway, *FREE RADICAL RESEARCH*, 38(6): 541-551.
  86. Nelsen CJ., Rickheim DG., Timchenko NA., Stanlay MW., Albrecht JH., 2001, Transient expression of cyclin D1 is sufficient to promote hepatocyte replication and liver growth in vivo, *CANCER RESEARCH*, 61(23):8564-8568.

- 
87. Pibiri M., Ledda-Columbano GM., Cossu C., Simbula G., Menegazzi M., Shinozuka H., Columbano A., 2001, Cyclin D1 is an early target in hepatocyte proliferation induced by thyroid hormone (T3), THE FASEB JOURNAL, 15(6):1006-1013.
  88. Fischer A., Pallauf J., Gohil K., Weber SU., Packer L., Rimbach G., 2001, Effect of selenium and vitamina E deficiency on differential gene expression in rat liver, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 285(2):470-475.



Fig.5 METODOLOGÍA

MODELO EXPERIMENTAL



**Tabla 1.** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la mucosa gástrica de animales sujetos a daño gástrico y tratados con vitamina E.

Grupos Experimentales	$\mu\text{g}$ de $\alpha$ -tocoferol / mg de proteína				
	Tiempo (hr)				
	0	24	48	72	96
Control (Salina)	212 $\pm$ 25	----	----	-----	----
Gastritis	140 $\pm$ 13*	61 $\pm$ 6*	203 $\pm$ 24	175 $\pm$ 23	154 $\pm$ 22
Salina + 24 UI Vit E		224 $\pm$ 25	281 $\pm$ 34	365 $\pm$ 51*	285 $\pm$ 42
Gatritis + 24 UI Vit E		99 $\pm$ 14 <sup>*,**</sup>	224 $\pm$ 34	251 $\pm$ 18 <sup>**</sup>	109 $\pm$ 18*
Salina + 100 UI Vit E		247 $\pm$ 34	418 $\pm$ 63*	672 $\pm$ 107*	432 $\pm$ 73*
Gastritis + 100 UI Vit E		141 $\pm$ 26 <sup>*,**</sup>	288 $\pm$ 58	480 $\pm$ 100 <sup>*,**</sup>	148 $\pm$ 32*

Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar de cinco determinaciones individuales por grupo experimental. \*  $p \leq 0.01$  vs control; \*\*  $p \leq 0.01$  vs gastritis.

**Tabla 2.** Morfometría de la proporción relativa de la superficie epitelial con respecto al epitelio glandular del estómago en animales sujetos a daño gástrico y tratados con vitamina E.

Grupos Experimentales	Proporción del epitelio superficial / epitelio glandular gástrico				
	Tiempo (hr)				
	0	24	48	72	96
Control	0.38± 0.03	----	----	-----	----
Gastritis	0.26 ± 0.02*	0.27 ± 0.02*	0.29 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.35 ± 0.03
Gatritis + 24 UI Vit E		0.29 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.03
Gastritis + 100 UI Vit E		0.22 ± 0.02*	0.23 ± 0.02*	0.23 ± 0.02*,**	0.26 ± 0.02*,**

Los datos están expresados como promedio ± error estándar de cinco determinaciones individuales por grupo experimental \*  $p \leq 0.05$  vs control; \*\*  $p \leq 0.05$  vs gastritis.