



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO GASTROPROTECTOR DE PROPARGILGLICINA EN RATAS:
PARTICIPACIÓN DE PROSTAGLANDINAS, GRUPOS SULFHIDRILO, ÓXIDO
NÍTRICO Y CANALES K^+_{ATP}

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

GABRIELA RUBI TAPIA ÁLVAREZ

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Andrés Navarrete Castro

VOCAL: Profesor: Mabel Clara Fragoso Serrano

SECRETARIO: Profesor: José Ignacio Páramo Ramírez

1er. SUPLENTE: Profesor: María Eva González Trujano

2° SUPLENTE: Profesor: Héctor Isaac Rocha González

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: EDIFICIO E DE LA FACULTAD

DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. ARACELY E. CHÁVEZ PIÑA

SUSTENTANTE (S): GABRIELA RUBI TAPIA ÁLVAREZ

Agradecimientos

En primera, deseo agradecer a mi madre, María de Lourdes Álvarez, y a mi hermana mayor, Liliana Tapia, por su cariño y su apoyo incondicional.

Luego, deseo dar las gracias al Dr. Andrés Navarrete Castro, por su invaluable guía para adentrarme en el campo de la Farmacología y por sus valiosas observaciones en la realización de este trabajo.

A mis abuelos, Ma. del Carmen y Fernando, por transmitirme la alegría de vivir, darme sabios consejos y por creer en mí. A mis tíos abuelos Rosario y Jesús, y a mis tíos Enrique, Elizabeth, Jorge, José Roberto, Ricardo, Víctor y Miguel por ser ejemplos de vida llenos de energía y de pasión por sus profesiones respectivas.

Le doy las gracias a mis compañeros de trabajo del laboratorio 126 del conjunto E de la Facultad de Química y colaboradores del laboratorio 111 por su buen trato, amistad, paciencia, apoyo y enseñanzas valiosas. En especial, quiero agradecer a Aracely E. Chávez Piña que supo guiarme a lo largo de mi trabajo de tesis y en quien encontré además una amiga valiosa.

A Valeria, Ingrid, Sharon, Diana, Rosalía, Carlos, Roxana, Karen, Gabriela, Blanca, Cynthia y Francisco, porque estuvieron conmigo a lo largo de mis estudios y sé que en ellos siempre puedo encontrar una amistad sincera.

También, me gustaría agradecer a mi segundo hogar, formado por las instalaciones y el personal de la Facultad de Química, donde crecí como persona y como profesionalista.

Finalmente agradezco el apoyo de la DGAPA IN205008, CONACYT 82613 y CONACYT 102337 para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

I.	Introducción	1
II.	Fundamento teórico	2
	2.1 Úlcera gástrica.....	2
	2.1.1 Definición.....	2
	2.1.2 Incidencia.....	3
	2.1.3 Manifestaciones clínicas.....	3
	2.1.4 Etiología.....	3
	2.1.5 Patogénesis.....	6
	2.1.6 Tratamiento.....	7
	2.2 Modelos de daño gástrico en animales de experimentación.....	10
	2.2.1Inducción de úlceras pépticas con etanol.....	11
	2.3 Mecanismos de gastroprotección.....	11
	2.3.1Factores funcionales.....	12
	a)Moco, bicarbonato y fosfolípidos.....	12
	b)Epitelio.....	12
	c)Microcirculación.....	14
	2.3.2Factores neuronales.....	14
	2.3.3 Factores humorales.....	15
	a) Sulfuro de hidrógeno.....	15
	b) Grupos sulfihidrilo no proteicos.....	19
	c) Óxido nítrico	19
	d) Prostaglandinas.....	22
	e) Otros mediadores.....	26

2.4 Propargilglicina.....	27
III. Planteamiento del problema.....	29
IV. Hipótesis.....	30
V. Objetivos.....	30
VI. Material y metodología.....	31
6.1 Compuestos y reactivos.....	31
6.2 Kit para la determinación de PGE ₂	31
6.3 Animales	31
6.4 Inducción de daño gástrico con etanol absoluto.....	32
6.5 Caracterización del efecto de Propargilglicina en el daño producido con etanol.....	32
6.6 Determinación de los niveles endógenos de sulfuro de hidrógeno en estómago de rata.....	33
6.6.1 Tratamiento a animales de experimentación.....	33
6.6.2 Curva patrón de sulfuro de hidrógeno.....	34
6.6.3 Determinación de sulfuro de hidrógeno en las muestras.....	35
6.6.4 Análisis de datos.....	35
6.7 Participación de grupos sulfihidrilo no proteícos y óxido nítrico en el efecto gastroprotector de PAG en el modelo de daño gástrico con etanol absoluto.....	36
6.8 Efecto de la inhibición y la activación de canales K ⁺ _{ATP} sobre el efecto gastroprotector de PAG en el modelo de daño gástrico con etanol absoluto.....	36
6.9 Participación de prostaglandinas en el efecto gastroprotector de PAG en el daño gástrico inducido por etanol absoluto.....	37
6.9.1 Efecto del pretratamiento con indometacina.....	37
6.9.2 Determinación de los niveles endógenos de PGE ₂ en estómago.....	38

6. 10 Análisis estadístico.....	42
VII. Resultados.....	43
7.1 Efecto gastroprotector de Propargilgicina en el daño gástrico inducido por etanol.....	43
7.2 Niveles endógenos de sulfuro de hidrógeno en estómago de rata.....	44
7.3 Participación de grupos sulfhidrilo no proteicos en el efecto gastroprotector de PAG en el modelo de daño gástrico con etanol absoluto.....	44
7.4 Participación de óxido nítrico en el efecto gastroprotector de PAG en el daño gástrico inducido por etanol absoluto.....	45
7.5 Efecto de la inhibición y la activación de canales K^+_{ATP} sobre el efecto gastroprotector de PAG en el modelo de daño gástrico con etanol absoluto.....	46
7.6 Participación de prostaglandinas en el efecto gastroprotector de PAG en el daño gástrico inducido por etanol.....	48
7.6.1 Efecto del pretratamiento con indometacina en el efecto gastroprotector de PAG.....	48
7.6.2 Niveles endógenos de prostaglandina E_2 en estómago.....	49
VII. Discusión.....	50
VIII. Conclusiones.....	59
IX. Perspectivas.....	59
X. Bibliografía.....	60
XI. Anexo A. Fundamento de la determinación de H_2S en una muestra.....	70
XII. Anexo B. Fundamento de la determinación de PGE_2.....	71

Resumen

El entendimiento de la enfermedad ácido péptica implica el conocimiento de los diversos factores involucrados en el mantenimiento de la homeostasis gástrica y de las relaciones existentes entre ellos. Entre esos factores se encuentre el sulfuro de hidrógeno (H_2S), un gas modulador endógeno que ha cobrado importancia en los últimos años y cuyos niveles parecen estar alterados en algunas enfermedades (Łowicka y Beltowski, 2007).

Debido que el papel del H_2S en el sistema gastrointestinal se conoce muy poco, en este trabajo se caracterizó el efecto gastroprotector de propargilglicina (PAG) en dosis de 3.12 a 75 mg/kg vía i.p., un inhibidor de la síntesis de H_2S , en el modelo de daño gástrico con etanol absoluto. Para determinar una posible relación entre los niveles de H_2S y el daño gástrico, se determinaron los niveles endógenos de éste compuesto en estómagos de rata sanos, tejidos con daño gástrico inducido con etanol y tejidos tratados con PAG antes de inducir el daño gástrico con etanol.

También se examinó la relación entre el efecto gastroprotector de PAG y diversos mediadores involucrados en gastroprotección diferentes al H_2S . Para ello, se determinó la participación de grupos sulfhidrilo no proteicos en el efecto gastroprotector de PAG, mediante el pretratamiento con N-etilmaleimida (NEM) (10 mg/kg s.c.); la participación de óxido nítrico en el efecto gastroprotector de PAG, mediante el pretratamiento con L-NAME (70 mg/kg i.p.); el efecto de los canales de potasio dependientes de ATP en el efecto gastroprotector de PAG, mediante el uso de los compuestos glibenclamida (1 mg/kg vía i.p.) y diazóxido (3mg/kg vía i.p.) y, finalmente, se evaluó la participación de prostaglandinas, mediante el pretratamiento con indometacina (10 mg/kg s.c.) y a través de la determinación de los niveles endógenos de prostaglandina E_2 en estómago.

Los resultados obtenidos mostraron que PAG tiene un efecto gastroprotector dosis dependiente a través de la prevención del incremento de los niveles de sulfuro de hidrógeno en el daño gástrico con etanol. Además, se determinó que el efecto gastroprotector de PAG se debe en parte a la participación de grupos sulfhidrilo no proteicos y no se relaciona con la participación de óxido nítrico, canales K^+_{ATP} , ni prostaglandinas.

I. Introducción

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es un factor humoral de gastroprotección cuyo estudio es relativamente reciente y limitado. Las investigaciones realizadas hasta el momento muestran que este mediador se encuentra alterado en diversas enfermedades y puede contribuir de forma benéfica o nociva en un mismo sistema. Recientemente se ha visto que el sulfuro de hidrógeno podría prevenir la formación de úlceras en el sistema gastrointestinal.

Debido al posible papel dual del H_2S , este trabajo experimental se basa en la hipótesis de que el daño gástrico inducido con etanol afecta los niveles de H_2S endógeno. Con la finalidad de esclarecer la participación del sulfuro de hidrógeno, esta tesis se enfoca principalmente en la determinación del efecto gastroprotector de propargilglicina (PAG), un inhibidor de la síntesis de sulfuro de hidrógeno, en el daño gástrico inducido con etanol absoluto; así como en la obtención de las bases científicas que permitan comprender su mecanismo de acción.

Es importante aclarar que este trabajo se limita al estudio desde el punto de vista farmacológico preclínico; sin embargo, hace referencia a la importancia de la regulación de los factores humorales, sobre todo el sulfuro de hidrógeno, con fines terapéuticos en patologías como la enfermedad ácido péptica, donde existe un desbalance de los componentes celulares y humorales esenciales del sistema gastrointestinal.

En los experimentos de este trabajo se emplearon ratas como animales de experimentación y las estrategias empleadas fueron la caracterización dosis respuesta del efecto de PAG en el modelo de daño gástrico con etanol absoluto, la determinación de los niveles endógenos de sulfuro de H_2S en estómago, el estudio de la relación entre el efecto gastroprotector de PAG y algunos mediadores involucrados en gastroprotección; así como la evaluación de los canales K^+_{ATP} en el mecanismo de acción de PAG.

I. Fundamento Teórico

1.1 Úlcera péptica

2.1.1 Definición

Las formas de daño gastroduodenal incluyen necrosis difusa de la mucosa, erosiones localizadas o úlceras; estas lesiones pueden o no tener hemorragia sustancial y la inflamación presente en la zona podrá ser aguda o crónica. Las erosiones son regiones bien delimitadas de necrosis presentes en la parte superficial de la mucosa y si la necrosis abarca la *muscularis mucosae*, la lesión es llamada úlcera (Szabo , 1991a).

La úlcera péptica es una zona localizada en el sistema gastrointestinal con pérdida circunstancial de la mucosa epitelial por la acción digestiva del jugo gástrico, desprovista de moco y susceptible a la posterior digestión. Las úlceras pépticas comprenden las úlceras gástricas y las úlceras duodenales.

La localización más frecuente de este tipo de úlcera es a nivel del cuerpo del estómago o en los primeros centímetros del duodeno (Figura 1), aunque se pueden encontrar úlceras pépticas en el extremo inferior del esófago donde se produce reflujo (Sodeman y Sodeman, 1984).

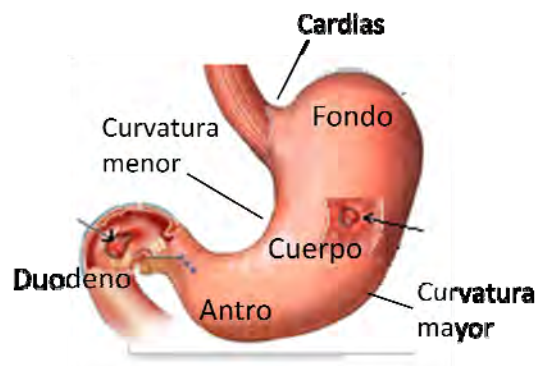


Figura 1. Localización frecuente de úlceras pépticas

2.1.2 Incidencia

A nivel mundial las úlceras gástricas y duodenales representan un importante problema de salud con una frecuencia de hasta el 70% y que ocupa el lugar 18° como causa de muerte. La úlcera péptica se presenta con mayor frecuencia en individuos entre 50 y 65 años de edad, sin un predominio claro entre hombres y mujeres (López-Bárcena, 2009).

En México alrededor de 15 mil individuos al año mueren a causa de úlcera péptica, debido a complicaciones como: hemorragias, perforaciones y obstrucción en el estómago. Se calcula que una de cada 10 personas padecerá, en algún momento de su vida, úlcera gástrica o duodenal (IMSS, 2007).

2.1.3 Manifestaciones clínicas

La úlcera gástrica puede cursar sin síntomas, aunque puede presentarse anorexia y dolor en epigastrio de leve a moderado, de tipo agudo o sordo y que se describe como una sensación de ardor, vacío o como hambre (Smith y Thier, 1989).

Debido a úlceras con hemorragia, pueden observarse evacuaciones intestinales melénicas y aparecer hematemesis. La úlcera duodenal se manifiesta con dolor en epigastrio de intensidad variable que puede tornarse intenso. Sus síntomas parecen ser dependientes de la ingesta de alimento, observándose una mejora con la ingesta de alimentos y la exacerbación de los síntomas durante la noche y el amanecer, cuando el estómago ha permanecido varias horas sin ellos. Además, la enfermedad puede desarrollarse con periodicidad de los síntomas, habitualmente con su aparición dos veces al año. (López-Bárcena, 2009).

2.1.4 Etiología

La causa ordinaria de la ulceración es el desequilibrio entre la secreción de jugo gástrico, el grado de protección producido por la barrera mucosa gastroduodenal y la neutralización del ácido gástrico por los jugos duodenales (Sodeman y Sodeman, 1984).

La mayoría del daño en células y tejidos de la mucosa gastroduodenal es producido por hipoxia, agentes químicos de tipo exógeno como fármacos o mediadores endógenos, agentes biológicos que incluyen bacterias y virus, así como reacciones inflamatorias e inmunes. Agentes físicos y factores genéticos son considerados agentes etiológicos con menor importancia en el daño a la mucosa gastroduodenal (Szabo, 1991a).

El tabaco y el grupo sanguíneo O se consideran factores de riesgo para desarrollar una enfermedad ulcerosa. Asimismo, en situación de estrés por estado general grave se pueden desarrollar múltiples úlceras agudas en la mucosa gástrica (Accarino, *et al.*, 2003). También se han descrito factores genéticos con una agregación familiar de la enfermedad ulcerosa péptica. En un estudio reciente, realizado en población japonesa, se determinó que el polimorfismo G1612A (rs10434) del gen del factor de crecimiento endotelial (VEGF) está asociado con susceptibilidad a desarrollar úlceras pépticas, ya que esta modificación del gen ocasiona una menor producción de este factor angiogénico (Tahara, *et al.*, 2009).

Diversas enfermedades se asocian con más frecuencia a la incidencia de úlcera péptica (enfermedad por reflujo gastroesofágico, esófago de Barrett, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cirrosis e insuficiencia renal), mientras que en otras situaciones la incidencia de esta enfermedad es menor (gastritis atrófica tipo A, enfermedad de Addison, tiroiditis autoinmune e hipoparatiroidismo).

Las dos causas más frecuentemente relacionadas con la etiología de esta enfermedad son la infección por *Helicobacter pylori* y el consumo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Accarino, *et al.*, 2003).

Helicobacter pilory se ha encontrado en más del 90% de pacientes con úlcera duodenal y en cerca de 70% de quienes tienen úlcera gástrica (López-Bárcena, 2009). Este microorganismo es capaz de evitar los factores de defensa del hospedero, facilitar su residencia y proliferación debido a su movilidad y la producción de ureasa. La bacteria puede inducir lesión en la mucosa mediante la secreción de lipasas y proteasas; además, lesiona las células epiteliales al causar una respuesta humoral de la mucosa y la liberación

de factores quimiotácticos que desencadenan una respuesta inflamatoria (Del Valle, 2006).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento del dolor, inflamación y fiebre, a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX). Los efectos terapéuticos se relacionan con la inhibición de la isoforma COX-2 cuya expresión se induce por estímulos inflamatorios; mientras que la úlcera de la mucosa está relacionada con la inhibición de ambas isoformas de COX, pero principalmente con la inhibición de la isoforma COX-1 que se expresa en el estómago de manera constitutiva y tiene un papel importante en la conservación de la integridad de la mucosa gastrointestinal (Del Valle, 2006).

Dependiendo de la concentración de ácido en el estómago, AINEs como la aspirina pueden causar daño directo o indirecto sobre la mucosa gástrica. Si el pH gástrico es igual o mayor al pKa del fármaco, el compuesto AINE estará disociado, por lo que dañará el epitelio superficial de forma directa (Szabo, 1991b), permitiendo la retrodifusión de H⁺ y pepsina (Del Valle, 2006).

Por otra parte, el daño será causado indirectamente si la acidez gástrica es de un pH menor al pKa del fármaco, debido a que el compuesto es absorbido por el estómago al estar en forma no disociada. Entonces ejercerá un efecto inhibitorio sobre la síntesis de prostaglandinas (Szabo, 1991b) que inducirá hipermotilidad gástrica, problemas microvasculares, inhibición de la secreción de moco y bicarbonato y la activación de neutrófilos. Además, el decremento del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de COX resultará en un incremento en la producción de leucotrienos (Laine, *et al.*, 2008).

La presencia de *H. pylori* parece agravar las úlceras producidas por la administración crónica de fármacos antiinflamatorios no esteroideos y favorecer mayormente la localización de erosiones y úlceras en duodeno en comparación con lesiones en estómago (Hawkey, *et al.*, 2002).

Estudios endoscópicos de pacientes que toman AINEs de forma crónica han mostrado un porcentaje de prevalencia de úlcera péptica aproximado del 20% y datos epidemiológicos sugieren que éstos fármacos incrementan el riesgo de complicaciones, que incluyen sangrado gastrointestinal y úlcera perforada; así como el riesgo de muerte (Hawkey, *et al.*, 2002).

En la búsqueda de disminuir los efectos negativos de los AINEs en el sistema gastrointestinal se desarrollaron inhibidores de COX-2 como el celecoxib y rofecoxib, los cuales disminuyen en un 50-60% el riesgo de complicaciones en úlceras gástricas. Sin embargo, el rofecoxib ha sido retirado del mercado porque favorece el desarrollo de complicaciones cardiovasculares severas (Targownik, *et al.*, 2006).

2.1.5 Patogénesis

La secuencia de eventos involucrados en la formación lesiones gástricas involucran el daño químico por contacto directo; el daño químico indirecto mediante activación, liberación o inhibición de enzimas; el daño vascular indirecto; procesos inflamatorios celulares, y la liberación de factores agresivos y de defensa frente a reparación o regeneración insuficientes (Szabo, 1991a).

El ácido clorhídrico y la pepsina serán determinantes en el desarrollo de una úlcera péptica, sin embargo, existen otros factores internos como la isquemia tisular o el reflujo biliar que pueden contribuir a su patogénesis (López-Bárcena, 2009).

La transición del daño celular reversible al daño irreversible es el momento más importante en la secuencia patogénica y al parecer, el paso limitante entre estos dos estados es la extensión del daño en la mitocondria y la membrana plasmática (Szabo, 1991a).

En la hipoxia, el daño a células y tejidos puede ocurrir a través de tres vías: a) el decremento en el abastecimiento de sangre (isquemia), b) la disminución en la capacidad transportadora de oxígeno de la sangre y c) la inhibición de enzimas oxidativas. El

resultado de cualquiera de estos tres factores es la disminución del metabolismo mitocondrial (Szabo, 1991b).

Algunas especies reactivas de oxígeno causan daño celular o contribuyen a él indirectamente, al causar la contracción del músculo liso vascular o a través de la interacción con óxido nítrico (Szabo, 1991a). Radicales hidroxilo solos y principalmente en presencia de iones Fe^{3+} inician la peroxidación de lípidos o la formación de disulfuros en proteínas de membrana, causando daño en la membrana e incrementando la permeabilidad (Szabo, 1991b).

2.1.6 Tratamiento

La secreción ácida gástrica es estimulada por diversos agonistas en las células parietales. La gastrina, liberada por las células G en el antro, interacciona con receptores de gastrina para promover la liberación de ácido (estimulación vía endócrina); la acetilcolina interacciona con receptores muscarínicos tipo M3 (forma neuroendocrina a través del nervio vago) y la histamina estimula la secreción de ácido a través de los receptores H_2 (estimulación vía paracrina) (Blecker, 1999). La célula parietal también tiene receptores para prostaglandinas E_2 , cuya estimulación inhibe la secreción ácida (Figura 2).

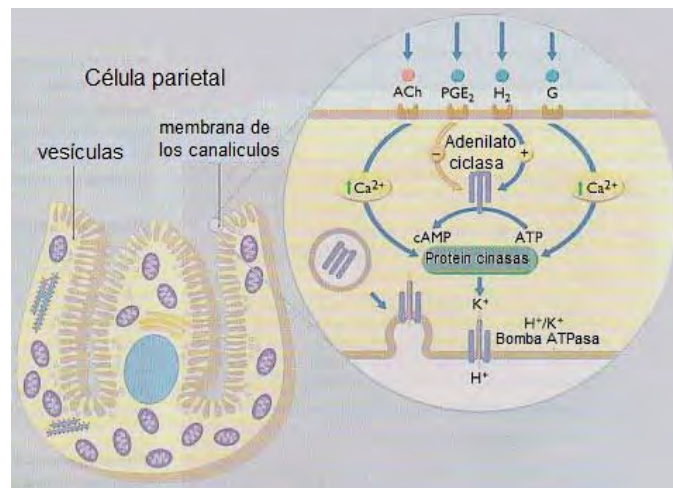


Figura 2. Promoción de la secreción de HCl en células parietales por Acetilcolina (ACh), Gastrina (G), Prostaglandina E_2 (PGE_2) e Histamina (H_2)

La unión de la histamina estimula el sistema adenilato ciclasa, mientras que gastrina y acetilcolina activan una vía de señalización que incrementan el Ca^{2+} intracelular (Page, *et al.*, 1998). Cada una de esas vías a su vez regula una serie de cascadas de cinasas que activa la bomba H^+/K^+ -ATPasa.

La H^+/K^+ -ATPasa es una proteína de membrana que utiliza la energía química del ATP para transferir iones H^+ del citoplasma de las células parietales a los canalículos secretorios, intercambiándolos por K^+ (Del Valle, 2006).

Los objetivos principales del tratamiento de las úlceras pépticas son la reducción de la secreción gástrica, la neutralización del ácido generado, la protección de la mucosa y en ciertos casos la erradicación de *Helicobacter pilory* a través de la administración de diversos antibióticos.

Por ello, los fármacos empleados en el tratamiento de las úlceras pépticas suelen clasificarse en tres grupos: antisecretores, antiácidos y citoprotectores (Cuadro 1).

Antisecretores		
Tipo de fármacos	Descripción	Ejemplos de fármacos
Antihistamínicos H_2	Fármacos que compiten con la histamina por los receptores tipo H_2 en las células parietales de la mucosa gástrica, lo cual se traduce la reducción de la secreción ácido gástrico basal y la promoción de la cicatrización de las úlceras.	Entre estos compuestos se encuentran la cimetidina, la ranitidina, la famotidina y la nizatidina (López-Bárcena, 2009).
Inhibidores de la bomba H^+/K^+ -ATPasa	Grupo de fármacos que reduce tanto la secreción ácida basal como la inducida, al inhibir de manera irreversible la bomba de protones H^+/K^+ -ATPasa de la superficie de las células parietales del estómago.	Forman parte de este grupo de fármacos el omeprazol, lansoprazol y pantoprazol (Del Valle, 2006).

Cuadro 1. Descripción y ejemplos de los fármacos antisecretores, antiácidos y citoprotectores empleados para el tratamiento de úlceras pépticas.

Anticolinérgicos	Fármacos antagonistas competitivos a acetilcolina en los receptores colinérgicos muscarínicos presentes en las vísceras que no se emplean actualmente en la clínica, ya que sólo reducen la secreción ácida en un 30% y producen efectos anticolinérgicos generalizados.	Destacan la atropina y la pirenzepina (López-Bárcena, 2009).
Antagonistas de gastrina	Compuestos que impiden en menor o mayor medida la interacción de la gastrina con su receptor, presentan gran similitud con la colecistoquinina y poseen menor potencia antisecretora que los antagonistas H ₂ .	Entre ellos están: derivados del ácido glutarámico (proglumida), análogos del triptófano (benzotript) y análogos de benzodiazepinas (Beauchamp, <i>et al.</i> , 1985; Hahne, <i>et al.</i> , 1981).
Antiácidos		
Descripción		Ejemplos de Fármacos
Son bases débiles que neutralizan el ácido clorhídrico secretado por las células parietales, pero la duración de su efecto es corta y pueden ocasionar diarrea, hipercalcemia, bloqueo intestinal para la absorción de fósforo, hipercalcemia, hiperfosfatemia o alcalosis diseminada.		Mezcla de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio; carbonato de calcio y bicarbonato de sodio. (López-Bárcena, 2009; Bettarello, 1985; Del Valle, 2006).
Citoprotectores		
Descripción		Ejemplos de Fármacos
Actúan aumentando los mecanismos de protección de la mucosa gástrica y/o proporcionando una barrera física sobre la superficie de la úlcera.		Misoprostol, un análogo sintético de PGE ₁ y sucralfato, un compuesto que se une a la superficie de la mucosa gástrica e impide su erosión debida a la hidrólisis de proteínas mediada por pepsina.

Cuadro 1. Descripción y ejemplos de los fármacos antisecretores, antiácidos y citoprotectores empleados para el tratamiento de úlceras pépticas (continuación).

Por otra parte, la erradicación del microorganismo *Helicobacter pilory* se realiza generalmente a través de una combinación triple: un inhibidor de la bomba de protones, claritromicina y amoxicilina o metronidazol; sin embargo, también suele optarse por una combinación cuádruple constituida por un inhibidor de la bomba de protones, metronidazol, tetraciclina y subsalicilato de bismuto (López-Bárcena, 2009).

Además del tratamiento farmacológico, el enfermo debe cambiar su estilo de vida, modificando sus hábitos alimenticios, eliminando la ingesta de alcohol y de ciertos medicamentos, así como el consumo de tabaco (López-Bárcena, 2009).

1.2 Modelos experimentales para generar lesiones gástricas

Los modelos experimentales de inducción de úlcera son diversos; todos ellos pretenden reproducir adecuadamente el padecimiento en animales de experimentación, con el propósito final de lograr la evaluación de posibles tratamientos terapéuticos.

Las estrategias empleadas para la inducción de úlceras pépticas en animales de experimentación más empleados son la ligadura de píloro (Shay, *et al.*, 1954); el sometimiento de los animales de experimentación a condiciones estresantes (Nirmal, *et al.*, 2008) como son: temperaturas extremas, shock séptico (Glavin y Szabo, 1992), inmovilización, ejercicio muscular forzado, choques eléctricos (Overmier, *et al.*, 1994); la inducción de úlceras por la administración oral de AINEs (Wallace y McKnight, 1990); o la aplicación directa a nivel de serosa o la administración intragástrica de reactivos irritantes tales como ácido acético, etanol, ácido clorhídrico 0.6M, hidróxido de sodio 0.2M o una solución hipertónica de cloruro de sodio al 25% (Okabe, *et al.*, 1971; Robert, *et al.*, 1983).

2.2.1 Inducción de úlceras pépticas con etanol

La generación de lesiones gástricas pueden inducirse por la administración intragástrica de un volumen que va de 0.5 a 2 mL de etanol en concentraciones del 50 al 100% y las úlceras suelen examinarse después de 1 a 2 horas (Glavin y Szabo, 1992).

El daño gástrico inducido por la administración intragástrica de etanol genera áreas de hiperemia focal y hemorragia, produce un marcado incremento en la permeabilidad vascular en los primeros 3 minutos y después, el daño máximo ocurre en capilares cerca de la superficie luminal (Glavin y Szabo, 1992). Además, el etanol a altas concentraciones promueve la solubilización de la superficie de la mucosa gástrica, el agotamiento de la mucina intracelular, la difusión luminal de microsustancias y el escape de electrolitos a través del lumen (Szabo y Goldber, 1990).

En el daño gástrico con etanol se modifican diversos factores. Por una parte, hay una disminución en la motilidad gástrica, en la producción de moco gástrico, en la producción de glutatión (GSH) endógeno, en el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica y en la producción de prostaglandinas. Por otra parte, el daño con etanol se relaciona con isquemia; el incremento en la generación de radicales libres, en la producción de leucotrienos y en la liberación de serotonina e histamina; así como el aumento de la permeabilidad vascular gástrica y del eflujo de sodio, potasio y calcio (Glavin y Szabo, 1992).

1.3 Mecanismos de gastroprotección

La protección en el tracto gastrointestinal se basa en la preservación de células y el reemplazo de tejido perdido. La penetración de agentes dañinos puede evitarse a través de la formación de barreras, dilución u otros procesos fisicoquímicos inducidos por agentes citoprotectores (Szabo, 1991b).

En general, los mecanismos para proteger la mucosa gástrica de los agentes agresivos consisten en factores funcionales, neuronales y humorales. La barrera formada por moco, bicarbonato y fosfolípidos, el epitelio y la microcirculación son acciones funcionales; la síntesis y secreción de diversos mediadores como son el sulfuro de hidrógeno, las prostaglandinas, el óxido nítrico, las lipoxinas, las citocinas y la presencia de grupos sulfhidrilo no proteicos constituyen factores humorales; y las neuronas sensibles a capsaicina son factores neuronales (Tsukimi y Okabe, 2001).

2.3.1 Factores funcionales

a) Moco, bicarbonato y fosfolípidos

Como primera línea de defensa, moco, bicarbonato y fosfolípidos son secretados de forma regular por las células epiteliales de la superficie gastroduodenal y funcionan como una barrera preepitelial (Laine, *et al.*, 2008) fisicoquímica contra la irritación mecánica producida por la comida y los agentes dañinos hidrosolubles (Szabo, 1991b).

El gel mucoso es una mezcla de aproximadamente 95% de agua y 5% de glucoproteínas mucina (MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6) (Laine, *et al.*, 2008), que impide la difusión de iones y moléculas como la pepsina, y es capaz de evitar infecciones, ya que atrapa bacterias y permite su eventual excreción en heces. Además, el moco puede actuar como un antioxidante y reducir el daño de la mucosa mediado por factores producidos por bacterias y por inmunocitos (Wallace y Granger, 1996).

El bicarbonato secretado da origen a un gradiente de pH en la superficie celular y el gel mucoso minimiza la pérdida de bicarbonato, por lo que la superficie celular apical mantiene un pH neutro (Laine, *et al.*, 2008). El fluido constituido por moco y bicarbonato también puede contribuir a la dilución luminal de agentes dañinos.

Los fosfolípidos pueden excluir o retardar la absorción de agentes hidrosolubles, pero difícilmente influyen en la absorción de compuestos liposolubles (Szabo, 1991b).

b) El epitelio

Las membranas apicales de las células gástricas epiteliales son capaces de resistir el daño ocasionado por altas concentraciones de ácido, independientemente de la contribución de moco, bicarbonato o flujo sanguíneo mucosal (Wallace y Granger, 1996).

La acción y acceso de agentes dañinos exógenos y endógenos está limitada por la permeabilidad de la membrana plasmática y los diversos organelos. Las uniones estrechas

y otras barreras intracelulares también controlan el paso de agentes dañinos a la mucosa gástrica y a los espacios intersticial y submucosal (Szabo, 1991b).

Constantemente las células se renuevan a partir de células progenitoras y el completo reemplazo del epitelio toma usualmente 3- 7 días (Laine, *et al.*, 2008).

Ante una lesión en la mucosa, las células epiteliales responden y migran para cubrir el defecto epitelial (Figura 3)(Szabo, 1991b; Allen, *et al.*, 1993). *In vivo*, la reparación de la mucosa es dependiente del flujo sanguíneo y el proceso dura 15 a 60 minutos (Wallace y Granger, 1996).

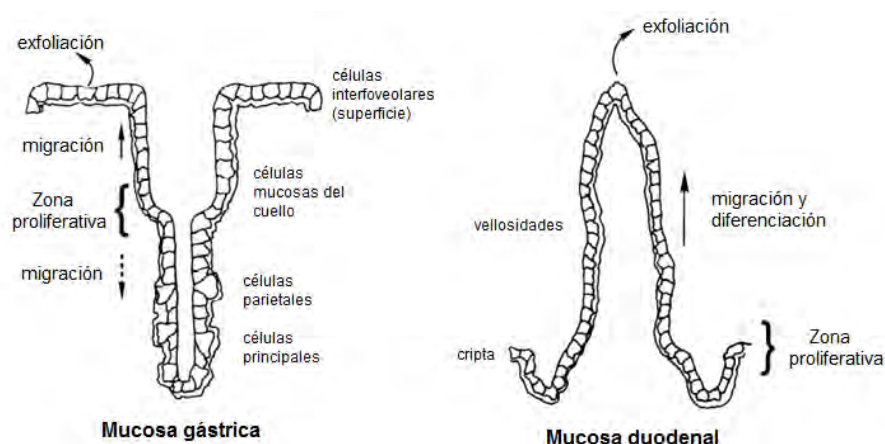


Figura 3. Proliferación y restitución epitelial en la mucosa gástrica y la duodenal. Debido a la fisiología propia de la mucosa gástrica, la proliferación sucede en la zona del cuello y la migración celular ocurre en dos sentidos; mientras que la proliferación celular en el duodeno ocurre en las criptas y las células migran hacia la superficie.

La proliferación celular de células progenitoras es controlada por factores de crecimiento. El mayor receptor expresado en las células progenitoras es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) y los factores mitogénicos más importantes son el factor de crecimiento transformante α (TGF- α) y el factor de crecimiento 1 similar a insulina (Laine, *et al.*, 2008).

c) Microcirculación

El flujo sanguíneo a través de capilares, arteriolas y vénulas colectoras es crucial para el mantenimiento de la estructura y las funciones de la mucosa gástrica. La microcirculación se encarga de proveer oxígeno y nutrimentos, remueve los metabolitos tóxicos (Tarnawski, *et al.*, 2005) y permite la restitución rápida de la energía requerida para reparar el daño superficial epitelial (Szabo, 1991b).

Cuando la mucosa gástrica es expuesta a un irritante o cuando la difusión inversa de ácido ocurre, existe, en respuesta, un marcado y rápido incremento del flujo sanguíneo, el cual permite la remoción y dilución de ácido o agentes nocivos. Esta respuesta es esencial para la defensa de la mucosa porque el bloqueo mecánico del flujo sanguíneo favorece el desarrollo de necrosis hemorrágica (Tarnawski, *et al.*, 2005).

La regulación de la liberación de sustancias vasoactivas y de la liberación o activación de enzimas disponibles constituyen parte de este mecanismo de protección mucosal. Algunas proteínas plasmáticas, especialmente albúmina y ceruloplasmina, ejercen un efecto gastroprotector al atrapar radicales libres (Szabo, 1991b).

2.3.2 Factores neuronales

Los vasos sanguíneos de la mucosa y submucosa gástrica están inervados por neuronas sensoriales aferentes primarias y nervios, formando un plexo denso en la base de la mucosa. Las fibras nerviosas de este plexo entran en la lámina propia acompañando los vasos sanguíneos y terminan justo debajo de las células epiteliales superficiales. Estas terminaciones pueden censar el contenido luminal y la entrada de ácido a la mucosa (Laine, *et al.*, 2008). Estos nervios están bifurcados; además de transmitir impulsos de regreso al sistema nervioso pueden afectar el tono de las arteriolas submucosales, por lo que regulan la afluencia sanguínea en la mucosa (Wallace y Granger, 1996).

Las neuronas sensoriales sensibles a capsaicina contribuyen a la protección de la mucosa. Se ha demostrado que la aplicación local de capsaicina produce la activación neuronal,

liberación de péptidos como la sustancia P, calcitonina y neuroquinina. (Arrieta, *et al.*, 2003; Tsukimi y Okabe, 2001). Además, la activación de los nervios sensoriales aferentes con capsaicina resulta en liberación antral de somatostatina, la inhibición de la liberación de gastrina y de acetilcolina (Wallace y Granger, 1996).

2.3.3 Factores humorales

a) Sulfuro de hidrógeno

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es un mediador gaseoso altamente difusible, cuya participación en diversos sistemas ha cobrado interés recientemente. La presencia del H_2S es detectable en suero y en la mayoría de los tejidos en una concentración cercana a $50 \mu M$; los mayores rangos de producción de H_2S se han observado en cerebro, sistema cardiovascular, hígado y riñón (Li, *et al.*, 2005; Doeller, *et al.*, 2005).

La producción de H_2S endógeno esta alterado en diversas enfermedades como son: diabetes mellitus, colitis, hipoxia inducida por hipertensión pulmonar, cirrosis y la enfermedad de Alzheimer. Una excesiva producción de H_2S puede contribuir a la patogénesis de enfermedades inflamatorias, shock séptico, daño cerebral y retraso mental en pacientes con síndrome de Down (Lowicka y Beltowski, 2007).

La síntesis de H_2S corresponde a una de las formas de catabolismo de cisteína en la llamada vía de la desulfihidración. Esta vía ha demostrado ser responsable del metabolismo de más del 50% de la cisteína en estudios *in vitro* en algunos tejidos como las células tubulares renales (Stipanuk, *et al.*, 1990).

La síntesis del H_2S a partir de cisteína ocurre naturalmente en diversos tejidos de mamíferos, principalmente a través de la actividad de enzimas dependientes de 2-piridoxal-5'-fosfato: cistationina- γ -liasa (CSE) y cistationina- β -sintetasa (CBS), sin embargo existen fuentes alternativas a través de la enzima cisteína aminotransferasa o de la 3-mercaptosulfurotransferasa (Fiorucci, *et al.*, 2005).

La enzima CSE cataliza la conversión de cistina a tiocisteína, piruvato y amoniaco; la tiocisteína se descompone de forma no enzimática a cisteína y sulfuro de hidrógeno (Figura 4). Por otra parte, el principal mecanismo de producción de producción de H₂S por la CBS involucra probablemente la condensación de homocisteína con cisteína para la formación de cistationina y la liberación de H₂S (Chen, *et al.*, 2004).

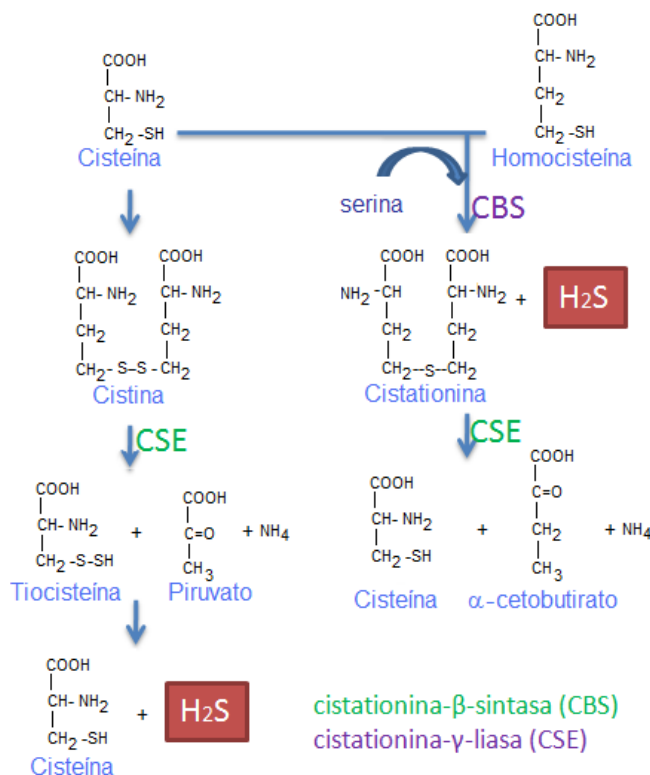


Figura 4. Biosíntesis del sulfuro de hidrógeno

En algunos tejidos, tanto la CBS como la CSE son requeridas para la generación de H₂S, pero en otros, una de las dos enzimas es suficiente. El H₂S derivado de la actividad de CBS es fisiológicamente relevante a nivel sistema nervioso, donde participa en la activación de canales de potasio sensibles a adenosin trifosfato (canales K⁺_{ATP}). En el sistema cardiovascular, el H₂S, en su mayoría derivado de la actividad de CSE, modula la vasodilatación dependiente e independiente del endotelio (Fiorucci, *et al.*, 2005). Sin embargo, la enzima CBS puede ser inducida en tejido cardiovascular bajo ciertas condiciones (Lowicka y Beltowski, 2007).

En roedores, la deficiencia de CBS/CSE se logra por delección genética o tratamiento crónico con el inhibidor *D,L*-propargilglicina (Fiorucci, *et al.*, 2005).

En estudios *in vitro*, el sulfhidrato de sodio (NaHS) es comúnmente empleado como un donador de H₂S (Lowicka y Beltowski, 2007).

Por otra parte, algunos agentes comerciales como el compuesto de Lawesson y la 4-hidroxitiobenzamida (4-HTB) funcionan como donadores de H₂S a dosis de 30 μmol/kg en un tratamiento de siete días consecutivos. La 4-HTB incrementa la síntesis de H₂S hasta alcanzar un máximo (500 mmol/g/h) luego del tercer día de administración, por lo que favorece la sanación de úlceras gástricas inducidas con indometacina (Wallace, *et al.*, 2007).

4-hidroxitiobenzamida (4HTB)

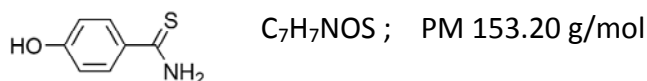


Figura 5. 4-HTB , agente donador de H₂S

El sulfuro de hidrógeno es metabolizado por diversos mecanismos, incluyendo oxidación mitocondrial, metilación en el citoplasma, oxidación por glutatión o reacción con meta-hemoglobina antes de ser excretada por el riñón (Kasperek, *et al.*, 2008).

El H₂S es una molécula altamente reactiva que puede fácilmente reaccionar con especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, limitando sus efectos tóxicos y atenuando sus funciones fisiológicas. Además, tiene un efecto antioxidante a través de la estimulación del transporte de cisteína, la síntesis de glutatión, la expresión de la hemo oxigenasa (HO) y la producción de monóxido de carbono (CO) (Lowicka y Beltowski, 2007).

Este mediador, es un agente reductor fuerte, por lo que se sugiere que algunos de sus efectos podrían deberse a la protección de grupos tiol (-SH) proteicos de la oxidación (Abe y Kimura, 1996).

El H₂S actúa como un mediador proinflamatorio en sepsis abdominal, endotoxemia y pancreatitis, en contraste con sus efectos antiinflamatorios en modelos animales de gastritis y colitis (Kasperek, *et al.*, 2008). Además, se ha observado que el sulfuro de hidrógeno puede estimular o inhibir la proliferación celular, activar o bloquear apoptosis y sobre producir o disminuir la isquemia miocardial (Lowicka y Beltowski, 2007). El principal mecanismo de su toxicidad es la potente inhibición de la citocromo oxidasa mitocondrial (Reiffenstein, *et al.*, 1992).

En músculo liso vascular, el H₂S tiene un efecto relajante por acción directa al estimular canales K⁺_{ATP} (Kasperek, *et al.*, 2008). El sulfuro de hidrógeno también estimula canales K⁺_{ATP} en neuronas, cardiomiocitos y células pancreáticas; sin embargo, el H₂S no estimula la guanilato ciclasa soluble como lo hacen el óxido nítrico y el monóxido de carbono (Lowicka y Beltowski, 2007).

En el sistema gastrointestinal, los estudios existentes muestran que H₂S es un mediador que inhibe la adherencia de leucocitos al endotelio vascular, contribuye a la resistencia de la mucosa gástrica (Wallace, *et al.*, 2007) y favorece la vascularización a través de la regulación positiva de la expresión del potente factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Lowicka y Beltowski, 2007).

Al parecer, el sulfuro de hidrógeno inhibe la quimiotaxis, la degranulación y la adhesión de leucocitos al endotelio de vénulas mesentéricas; inhibe la apoptosis de neutrófilos, no tiene efectos en la viabilidad de eosinófilos y favorece la apoptosis de linfocitos (Lowicka y Beltowski, 2007).

El H₂S generado en el sistema nervioso entérico regula la secreción ácida, la secreción de bilis y la motilidad probablemente de forma indirecta (Kasperek, *et al.*, 2008), al actuar sobre nervios sensoriales terminales con receptores transitorios con potencial vainilloide tipo I (TRPV1). El H₂S estimula los nervios sensoriales sensibles a capsaicina y evoca la liberación de taquicininas como la sustancia P y neuroquinina A (Lowicka y Beltowski, 2007).

Es posible una relación cercana entre H₂S y el NO (Kasperek, *et al.*, 2008). Compuestos donadores NO incrementa la generación de H₂S dependiente de CSE en una forma dependiente de GMP_c en el sistema cardiovascular y estudios *in vitro* indican que la presencia de NO actuará induciendo un incremento del CSE RNA_m y los niveles de proteína. Por el contrario, el H₂S también puede reaccionar con el NO para formar un nitrosotiol inactivo, por lo que podría neutralizar el exceso de NO producido en un estado inflamatorio (Lowicka y Beltowski, 2007).

Finalmente, se ha observado que inhibidores de COX como son los AINEs tienen un efecto inhibitorio sobre la vía CSE-H₂S en la mucosa gastrointestinal (Lowicka y Beltowski, 2007).

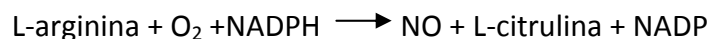
b) Grupos sulfhidrilo no proteicos

Los grupos sulfhidrilo no proteicos (GS-NP) tienen la capacidad de atrapar y neutralizar directamente las especies reactivas de oxígeno; la molécula representante que contiene estos grupos es el glutatión. El glutatión (GSH), un tiol ubiquitino, está relacionado en diversas funciones celulares y se considera que está involucrado en el mantenimiento de la integridad de la mucosa. El glutatión permite la resistencia contra el estrés oxidativo, removiendo el peróxido y previniendo la auto-oxidación irreversible de grupos sulfhidrilo no proteicos (Schulz, *et al.*, 2000).

La N-etilmaleimida (NEM) es un bloqueador del sistema tioxidante dependiente de grupos sulfhidrilo no proteicos, principalmente glutatión (GSH) y se ha reportado que la administración de este compuesto atenúa la acción citoprotectora de ciertos fármacos (Tsukimi y Okabe, 2001). La mayoría de los reportes de toxicidad de NEM se han enfocado en el efecto de este compuesto sobre la mucosa gástrica (Ali, 1995).

c) Óxido nítrico

El óxido nítrico es un importante mensajero intracelular e intercelular que se genera en una reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), en la cual, a partir de L-arginina y oxígeno molecular se sintetiza óxido nítrico y L-citrulina.



El dominio de actividad oxidasa está compuesto por un grupo hemo ubicado. La NOS posee dos dominios catalíticos. El dominio de actividad reductasa está ubicado en la mitad C-terminal de la enzima y presenta los sitios de unión para los cofactores nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), flavín adenin dinucleótido (FAD) y flavín mononucleótido (FMN). Las flavinas FAD y FMN están encargadas del traslado de electrones desde el cofactor NADPH al grupo en la mitad N-terminal de la proteína, y determina la oxidación de L-arginina.

Se han sintetizado análogos de la L-arginina, como el *N_w*-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), compuesto que fue identificado como un inhibidor competitivo de la NOS no selectivo para alguna isoforma en particular (Muscará y Wallace, 1999).

Existen tres isoenzimas conocidas como NOS: una forma inducible (NOSi) y dos formas constitutivas, la óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe) y la óxido nítrico sintasa neuronal (NOSn), las cuales requieren la presencia de Ca^{2+} intracelular y calmodulina (Fernández, *et al.*, 1999).

Las enzimas NOSn y NOSi se encuentran solubles en el citoplasma, mientras que la NOSe se encuentra asociada a membranas del aparato de Golgi y a caveolas, dominios especializados en la membrana plasmática que derivan del aparato de Golgi.

Las enzimas constitutivas generan cantidades pequeñas de óxido nítrico; mientras que la isoforma NOSi, que se expresa en macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular y células endoteliales, es capaz de sintetizar cantidades mucho mayores en respuesta a estímulos patológicos debido a su abundancia y a la intensidad de su actividad enzimática (Rang, *et al.*, 2008).

La NOSe, se expresa en endotelio, miocitos cardiacos, células mesangiales renales, osteoblastos, osteoclastos y en plaquetas, en baja proporción. Esta enzima regula una variedad de funciones como la inhibición leucocitaria, la adhesión mastocitaria y

plaquetaria, el aumento del flujo sanguíneo y la permeabilidad de la barrera mucosa protectora gástrica.

La actividad biológica del óxido nítrico se debe a que, al ser un radical libre, puede interactuar electroquímicamente con metales; además, por su reactividad pobre y alta liposolubilidad es una molécula gaseosa altamente difusible. El óxido nítrico ejerce una acción biológica al reaccionar con el Fe^{2+} de grupos prostéticos hemo de distintas metaloproteínas, al combinarse con grupos ferrosulfuros (Fe-S, formando Fe-S-NO en forma irreversible), mediante la nitrosilación de grupos tioles de moléculas proteicas tales como receptores para neurotransmisores y/o enzimas, al activar la ADP-ribosilación de proteínas solubles usando como cofactor NADPH, o bien, al reaccionar con el anión superóxido formando el anión peroxinitrito citotóxico .

La vía metabólica más caracterizada es la que relaciona al óxido nítrico con las formas solubles de la guanilato ciclasa, por lo que promueve la formación de GMPc (Fernández, *et al.*, 1999). De hecho, el óxido nítrico induce la relajación del músculo liso arterial a través de la estimulación de la guanilato ciclasa soluble (Medeiros, *et al.*, 2008).

El óxido nítrico endógeno tiene un papel dual en la mucosa gástrica. El óxido nítrico producido por la NOS constitutiva es gastroprotector, mientras que el óxido nítrico producido por la NOS inducible es proulcerogénico. La enzima iNOS podría ser responsable de daño en tejido vía la formación de peroxinitrito (Laine, *et al.*, 2008).

El óxido nítrico ha probado ser un neurotransmisor no adrenérgico no colinérgico en el tracto gastrointestinal (Laine, *et al.*, 2008).

Dentro de sus propiedades gastroprotectoras, el óxido nítrico regula la liberación de moco y bicarbonato, la motilidad gástrica, la microcirculación y mantiene la integridad de la mucosa (Wallace y Granger, 1996).

En condiciones normales, la perfusión de la mucosa gastrointestinal es regulada por el óxido nítrico producido en el endotelio vascular del territorio mesentérico. Fisiológicamente, el óxido nítrico mantiene una perfusión adecuada, inhibiendo la

adhesión de los neutrófilos en el endotelio, bloqueando la adhesión de las plaquetas, previniendo la activación de los macrófagos y modulando la regulación de la musculatura lisa intestinal (Brown, *et al.*, 1993; Pique, *et al.*, 1992).

La vía NO/GMPc protege las células endoteliales contra el daño celular en diversos tejidos; además, puede activar diversos sitios diana, incluyendo diferentes tipos de canales de K⁺. Recientemente se demostró que la activación de canales de potasio dependientes de ATP está involucrada en la defensa gástrica (Medeiros, *et al.*, 2008). El óxido nítrico también contribuye a la defensa de la mucosa a través de sus propiedades citotóxicas, que constituye una defensa primaria contra bacterias y parásitos ingeridos (Laine, *et al.*, 2008).

Finalmente, el óxido nítrico ejerce un efecto regulatorio sobre otros mediadores importantes. Se ha observado que el óxido nítrico regula negativamente la liberación de mediadores de mastocitos como la histamina, con lo cual contribuye a la inhibición de la secreción ácida (Konturek, *et al.*, 2005). La inhibición de la óxido nítrico sintasa anula la protección de la mucosa conferida por la estimulación de neuronas aferentes sensoriales con capsaicina (Peskar, 2001). Igualmente, se ha reportado que el óxido nítrico favorece la síntesis de prostaglandinas al activar la enzima COX (Wallace y Granger, 1996). El óxido nítrico puede ejercer gastroprotección, en parte, a través de la modulación de la producción de citocinas o bien al inhibir la activación de caspasas a través de una S-nitrosilación (Martin y Wallace, 2006).

d) Prostaglandinas

Las prostaglandinas son ácidos grasos conocidos como eicosanoides ya que están compuestas por 20 átomos de carbono y un anillo de 5 átomos de carbono derivados del ácido araquidónico. Debido a la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) o PLC, que hidroliza el enlace éster de los fosfolípidos en la membrana plasmática, se libera ácido araquidónico. El metabolismo del ácido araquidónico se realiza por un complejo enzimático llamado PG sintetasa, de localización microsomal y compuesto de una serie de enzimas con actividades ciclooxigenasa, peroxidasa, sintasa e isomerasa.

La enzima más importante para la biosíntesis de prostaglandinas es la ciclooxygenasa (COX), ya que corresponde el paso limitante de la velocidad en la síntesis de las prostaglandinas (Wilson, 1991).

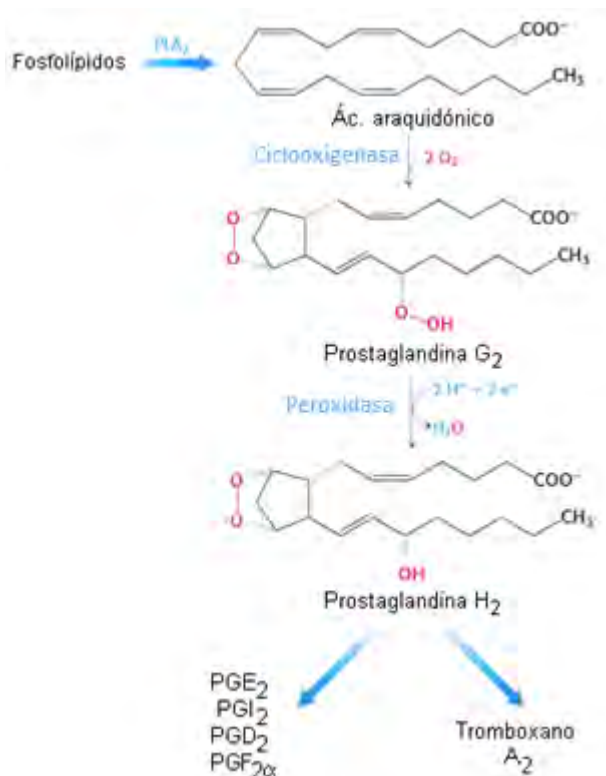


Figura 6. Biosíntesis de prostaglandinas

La primera etapa de la síntesis de prostaglandinas comprende la transformación del ácido araquidónico en un ácido graso insaturado cíclico y la adición del grupo 15-hidropoxi por acción de la enzima ciclooxygenasa. El grupo hidropoxi de la prostaglandina PGG₂ formada se reduce a hidroxilo dando origen a la PGH₂. Este intermediario sirve como sustrato para enzimas sintasa específicas (PGES, PGFS, PGDS, PGIS y TXS) que generan los prostanoides primarios: PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂ y TXA₂ (Sales y Jabour, 2003).

Se han identificado dos isoformas de la enzima ciclooxygenasa, COX-1 y COX-2, así como una variante de COX-1 llamada COX-1b, COX-1v o COX-3 (Hersh, *et al.*, 2005). La COX-1 corresponde a una isoforma constitutiva que se expresa en estómago, riñones, plaquetas y células endoteliales. La isoforma COX-2 es una isoforma que se expresa de forma constitutiva únicamente en cerebro y riñones; mientras que se expresa en macrófagos,

leucocitos, fibroblastos y células sinoviales en respuesta a diversos estímulos inflamatorios (Simmons, *et al.*, 2004).

Las prostaglandinas normalmente actúan en una forma endócrina o parácrina vía receptores EP1-4 o FP, acoplados a proteínas G (Figura 7), y presentan vidas medias cortas en la circulación (Sales y Jabour, 2003).

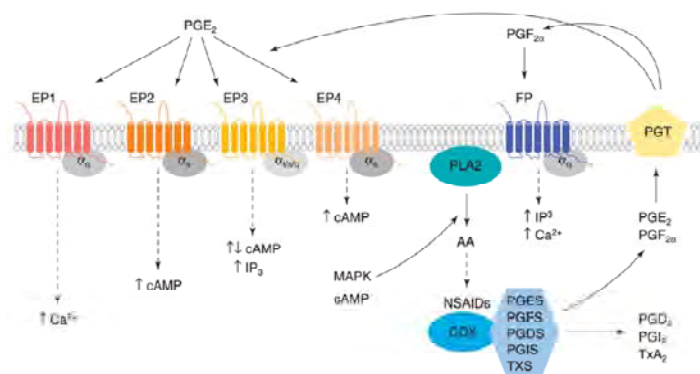


Figura 7. Las prostaglandinas ejercen un efecto biológico a través de su unión a receptores EP y FP.

Las prostaglandinas E₂, I₂ y F_{2α} juegan un papel muy importante en la integridad gástrica, gastroprotección y sanación de la úlcera (Brzozowski, *et al.*, 2005). Sin embargo, diversas condiciones, como es el fumar cigarrillos, reduce la síntesis de prostaglandinas en la mucosa gástrica y duodenal (Wilson, 1991).

La inhibición de la COX no solo reduce el efecto gastroprotector al disminuir la síntesis de prostaglandinas, sino que también, debido a la acumulación de ácido araquidónico, favorece la formación de leucotrienos, compuestos inflamatorios que incrementan el daño en la mucosa (Wilson, 1991).

Las prostaglandinas inhiben la secreción ácida; estimulan la secreción de moco, bicarbonato y fosfolípidos; incrementan el flujo sanguíneo; aceleran la restitución epitelial y la reparación de la mucosa e inhiben la motilidad gastrointestinal (Tsukimi y Okabe, 2001). Además, se ha observado que la PGE₂ regula la permeabilidad endotelial *in vivo* e *in vitro* (He, *et al.*, 2008).

Las prostaglandinas también inhiben la adherencia plaquetaria, la activación de mastocitos y de leucocitos. Las prostaglandinas son inhibidores extremadamente potentes de la liberación de mediadores de mastocitos, incluyendo el factor de agregación plaquetaria, histamina y el factor de necrosis tumoral (Konturek, *et al.*, 2005).

PGI_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ ejercen efectos protectores en la resolución de la fase inflamatoria (He, *et al.*, 2008); mientras que la prostaglandina E_2 inhibe potentemente la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF)- α y de interleucina (IL-1) de macrófagos, así como la liberación de leucotrieno B_4 e IL-8 de neutrófilos (Martin y Wallace, 2006).

Recientemente, se ha postulado que la enzima COX-2 es regulada positivamente en las lesiones gástricas (Brzozowski, *et al.*, 2005). Esto debido a que las prostaglandinas generadas al margen de la úlcera, especialmente las generadas por COX-2, parecen tener una participación crucial en la sanación del daño a través de favorecer la proliferación celular del epitelio, promover de la angiogénesis y restaurar la integridad de la mucosa. La síntesis de éstas prostaglandinas endógenas parecen ser regulada por factores de crecimiento y hormonas como la gastrina, CCK y melatonina, mediante la inducción de COX-2 y el incremento en la liberación local de PGE_2 en el área de la úlcera (Konturek, *et al.*, 2005).

Parece existir una regulación entre la liberación de prostaglandinas y óxido nítrico, pero además las prostaglandinas PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ son liberadas mayormente durante la estimulación a través del nervio vago, mientras que la estimulación de neuronas aferentes sensoriales con capsaicina no modifica la liberación de prostaglandinas (Peskar, 2001).

Finalmente, la generación de prostaglandinas puede verse afectada en una situación de estrés oxidativo; por ejemplo, la enzima microsomal sintasa 1 de prostaglandina E, la cual participa en la producción de PGE_2 a partir de PGH_2 , constituye una proteína integral de membrana que requiere de la unión a glutatión para su funcionamiento (Jegerschöld, *et al.*, 2008).

e) Otros factores humorales importantes en gastroprotección

Factor humoral	Descripción	Participación en gastroprotección
Lipoxinas LXA ₄ , LXB ₄ 15-epi-LXA ₄ 15-epi-LXB ₄	Lípidos del tipo trihidroxitetraeno cuya síntesis ocurre a partir del ácido araquidónico mediante distintas enzimas lipoxigenasa (LO) y que puede involucrar la acción de la enzima COX-2.	<ul style="list-style-type: none"> • Inducen vasodilatación dependiente del endotelio • Inhiben la liberación de IL-8 en los enterocitos • Inhiben quimiotaxis, adherencia y transmigración de neutrófilos • Inhiben la migración de eosinófilos • Inhiben la inflamación dependiente de leucocitos (Fierro y Serhan, 2001).
PARs PAR-1 PAR-2 PAR-3 y PAR-4	Subclase distintiva de receptores acoplados a proteína G que están expresados en la superficie de muchas células.	<ul style="list-style-type: none"> • PAR-2 desencadena la secreción de moco en el tracto gastrointestinal. • PAR-1 producen un incremento en el flujo sanguíneo de la mucosa. • PAR-1 y PAR-4 regulan la liberación de endostatina y VEGF; así como regulan la angiogénesis y sanación de las úlceras (Martin y Wallace, 2006).
Citocinas	Proteínas secretadas por las células de la inmunidad innata y adaptativa en respuesta a microorganismos y a otros antígenos (Abbas y Lichtman, 2004).	<ul style="list-style-type: none"> • La IL-1β inhibe la secreción gástrica ácida y estimula la liberación de prostaglandinas y óxido nítrico. • TNF-α contribuye al daño gástrico a través de la activación de caspasas (Martin y Wallace, 2006). • IL-3, IL-4 e IL-13 favorecen la formación de lipoxinas. IL-1β y TNF-α favorecen la expresión de la COX-2 (Fierro y Serhan, 2001).
Poliaminas	Compuestos sintetizados a partir de ornitina a través de la enzima ornitina descarboxilasa, durante la fase de reparación en la respuesta inflamatoria.	<ul style="list-style-type: none"> • Las poliaminas catiónicas (putresina, espermidina y espermina) estimulan la proliferación celular. • Las poliaminas protegen al DNA durante la fase S del ciclo celular (Martin y Wallace, 2006).

Cuadro 2. Descripción de algunos factores humorales y su participación en gastroprotección.

1.4 Propargilglicina

La Propargilglicina (PAG) es el ácido 2-amino-4-pentinoico, que actúa como inhibidor irreversible y selectivo de la enzima CSE (Figura 8) (Abeles y Walsh, 1973; Fiorucci, 2005).

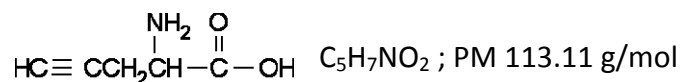


Figura 8. Propargilglicina (PAG), un inhibidor de la enzima CSE

El primer mecanismo propuesto para la inactivación de la enzima consideró que la propargilglicina convierte la región del sitio activo en un aleno reactivo (Washtien y Abeles, 1977).

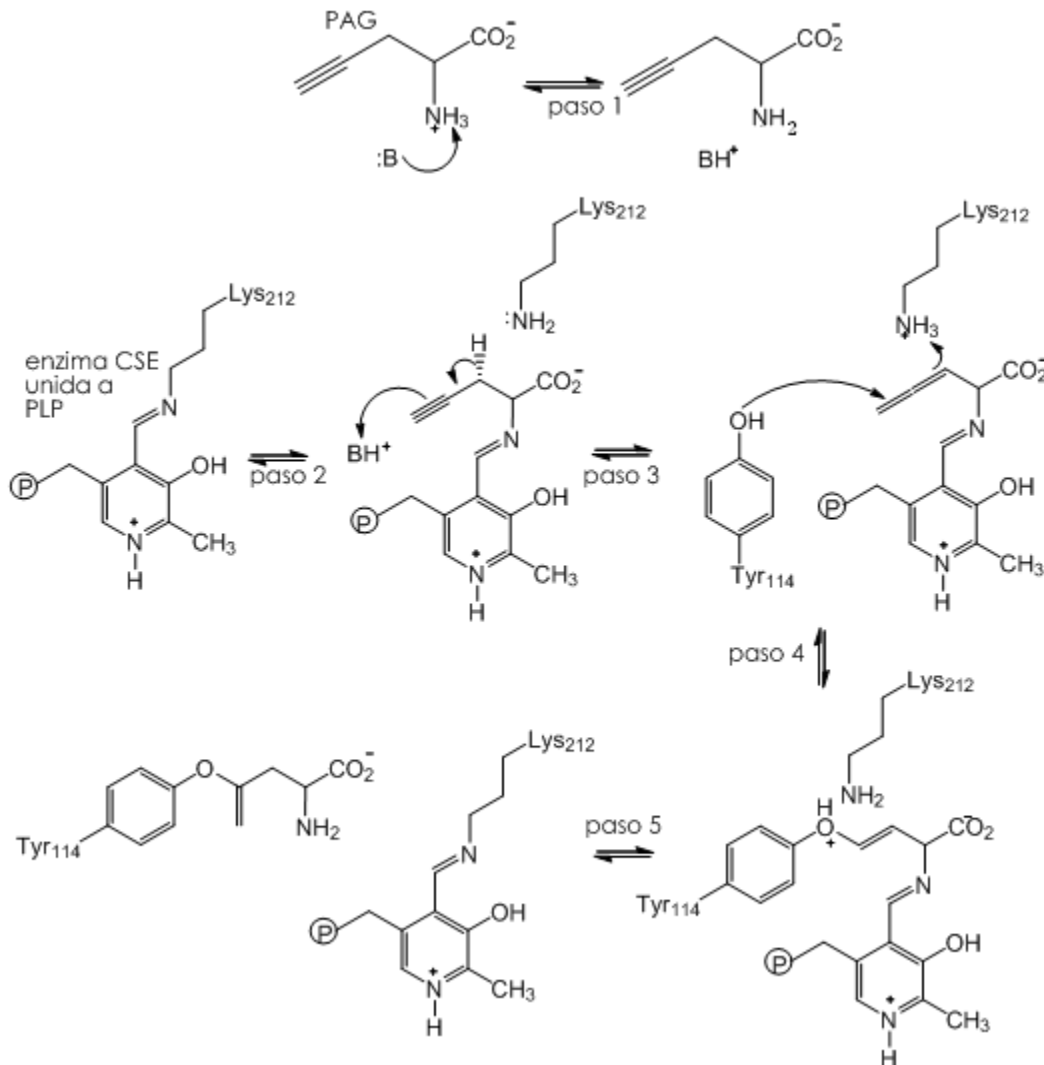


Figura 9. Mecanismo de reacción entre PAG y la enzima CSE (Sun, *et al.*, 2009).

Estudios recientes de cinética, cristalografía y modelaje molecular han revelado el mecanismo de propargilglicina de forma más detallada. PAG inhibe la enzima CSE al bloquear la accesibilidad del sustrato al sitio activo vía estérica y no se une a pirodoxal 5'-fosfato (PLP). Al parecer, el grupo amino de PAG es desprotonado por un aminoácido del sitio activo en un primer paso, lo cual favorece una transaldiminación (Figura 9, paso 2). Después, el alqueno es desprotonado por el residuo Lys212 y se genera un aleno reactivo (Figura 9, paso 3), el cual efectúa un ataque nucleofílico, probablemente sobre el grupo oxihidrilo de la Tyr114, para dar origen a un vinil éter.

Además, se sugiere que los residuos Arg119 y Glu339 podrían ser de crítica importancia en la inhibición específica de PAG, esto debido a que son residuos del sitio activo conservados en proteínas CSE (Sun, *et al.*, 2009).

Kodama y colaboradores observaron que la actividad de la enzima CSE se abate en tejidos de ratas administradas con *D,L*-propargilglicina 50 mg/kg (i.p.) de modo que luego de doce horas, la actividad de esa enzima es tan solo del 4.4% con respecto a un control sin el tratamiento (Kodama, *et al.*, 1983).

Entre los efectos farmacológicos benéficos de PAG reportados hasta el momento se encuentran: la regulación del tono vascular en condiciones basales (Zhong, *et al.*, 2003); la atenuación de la respuesta inflamatoria en pulmones e hígado en el modelo de sepsis en ratón (Zhang, *et al.*, 2006); la reducción del daño en hígado y músculo esquelético ocasionado por la inyección de LPS a ratas (Collin, *et al.*, 2005); la disminución del daño celular pancreático ocasionado por caeruleina (Bhatia, *et al.*, 2005b); la prevención de la infiltración leucocitaria y de la formación de edema en el modelo inflamatorio con carragenina (Bhatia, *et al.*, 2005a).

En contraste, se ha determinado un efecto opuesto de la administración de PAG, ya que reduce el efecto protector del sulfuro de hidrógeno exógeno en el modelo de daño en miocardio inducido por un episodio de isquemia/perfusión (Bian, *et al.*, 2006) y que su administración favorece el edema plantar inducido por carragenina (Zanardo, *et al.*, 2006).

III. Planteamiento del problema

El estudio del sulfuro de hidrógeno (H_2S) en diversos sistemas es relativamente reciente, por lo que su efecto no está claro. El H_2S se ha relacionado con efectos benéficos y nocivos en inflamación, isquemia en miocardio, proliferación celular y apoptosis; lo que sugiere un rol tipo dual, como sucede en el caso del óxido nítrico (Lowicka y Beltowski, 2007).

Al igual que en otros sistemas, el conocimiento de la participación del sulfuro de hidrógeno en el sistema gastrointestinal es limitado. El estudio de la función que tiene el H_2S en la fisiología del tubo digestivo contribuiría a avances en la clínica, ya que su modulación representa una posible nueva posibilidad estrategia para el tratamiento de la enfermedad ácido péptica. Esto resulta primordial debido a que los costos anuales directos e indirectos en el cuidado y tratamiento de las úlceras pépticas en países como Estados Unidos asciende aproximadamente a diez mil millones de dólares y las tasas de mortalidad y morbilidad no se han modificado notoriamente en los últimos años (Ramakrishnan, *et al.*, 2007).

Las estrategias para estudiar a este mediador se basan en el uso de agentes donadores de H_2S o el uso de inhibidores de su síntesis. En el daño gástrico, se ha descrito un efecto gastroprotector de los donadores de H_2S en la inducción de lesiones gástricas con AINEs y en el daño con etanol; mientras que los inhibidores de la síntesis de H_2S se emplean en combinación y no se han realizado estudios que pretendan su debida caracterización dosis respuesta, ni se ha estudiado la posible regulación en su mecanismo por parte de otros mediadores importantes en gastroprotección.

Por ello, en este trabajo se consideró importante realizar la caracterización de propargilglicina (PAG), un inhibidor de la síntesis de H_2S , en el modelo de daño gástrico inducido con etanol, la investigación de su interrelación con algunos mediadores importantes en gastroprotección y la evaluación de los canales K^+_{ATP} en su mecanismo de acción.

III. Hipótesis

El daño gástrico inducido con etanol absoluto incrementa los niveles endógenos de H₂S en estómago; por lo tanto, la administración de PAG será capaz de prevenir el daño gástrico en este modelo a través de un mecanismo relacionado con la inhibición de la síntesis de H₂S, el bloqueo de canales K⁺_{ATP} y la participación de los mediadores óxido nítrico (ON), grupos sulfhidrilos no proteicos y prostaglandinas.

IV. Objetivos

Objetivo general:

Proporcionar las bases científicas que permitan comprender el mecanismo gastroprotector de PAG en el daño gástrico provocado por etanol.

Objetivos particulares:

Caracterizar el efecto de propargilglicina en la susceptibilidad al daño gástrico inducido con etanol.

Determinar los niveles endógenos de H₂S en el daño gástrico con etanol en presencia y en ausencia de PAG.

Determinar la participación de óxido nítrico (ON), grupos sulfhidrilo no proteicos y prostaglandinas en el efecto gastroprotector de PAG.

Investigar el efecto gastroprotector de PAG en la activación o en el bloqueo de los canales K⁺_{ATP}.

VI. Material y metodología

6.1 Compuestos y reactivos

Los compuestos *D-L*-propargilglicina (PAG), *N*-etilmaleimida (NEM), *N*_ω-Nitro-*L*-arginina metil éster (L-NAME), indometacina, diazóxido, glibenclamida, Tween 80, Tween 20, sulfhidrato de sodio (NaHS), acetato de zinc (Zn AcO₂), cloruro férrico (FeCl₃), ácido tricloroacético (TCA), sulfato de *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamina, fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄), fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄), fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) y fosfato dibásico de potasio (K₂HPO₄) fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). El etanol absoluto empleado fue grado reactivo (Baker).

6.2 Kit para la determinación de PGE₂

El Kit Monoclonal EIA ACE™ para la determinación de PGE₂ fue adquirido de Cayman Chemical Company y corresponde al No. 514010 en su catálogo de productos.

6.3 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de 60 a 90 días de edad, con un peso entre 200 y 220 g y provenían de Harlan México S.A. de C.V.

En todos los procedimientos en los que se utilizaron animales de experimentación se siguieron los lineamientos marcados por la Norma Oficial Mexicana NOM062-ZOO-1999. Se realizó un experimento con 7 grupos experimentales y 6 experimentos con 4 grupos experimentales. El número de animales de experimentación en cada grupo fue de al menos cinco.

Todos los animales de experimentación se colocaron en compartimentos individuales con piso de malla metálica y se sometieron a un periodo de ayuno de 24 horas, con acceso al agua *ad libitum* antes de la realización de los experimentos.

6.4 Inducción y evaluación de daño gástrico

El daño gástrico se indujo empleando el método descrito por Robert, el cual consiste en la administración intragástrica de 1 mL de etanol absoluto por medio de una cánula metálica (longitud 76 mm y espesor 20 mm), seguida de un periodo de 2 horas donde se produce el daño gástrico (Robert, *et al.*, 1979).

Pasado ese tiempo, se sacrificaron los animales en cámara de CO₂. En cada animal de experimentación se realizó un corte transversal en la región abdominal, se colocó una pinza a nivel del esófago y una en duodeno, y se introdujeron, por medio de una jeringa, aproximadamente 10 mL de una solución de paraformaldehído 4% en el estómago. Se disectó el tejido y se colocó en una caja de petri con disolución de paraformaldehído 4% durante 15 minutos.

El órgano se abrió a lo largo de la región antimesentérica del duodeno y la curvatura mayor del estómago. Se midieron las zonas dañadas del tejido con la ayuda de un microscopio estereoscópico (x10) provisto de un micrómetro ocular y se determinó el área total dañada en cada estómago en mm². Finalmente, para la presentación de los datos y la elaboración de gráficas se calculó el porcentaje de lesiones gástricas para cada tratamiento, considerando al promedio de área dañada del grupo control (tratado con vehículo(s) y etanol) como el 100% de lesiones.

6.5 Caracterización del efecto de Propargilgicina en el daño gástrico producido con etanol

Los animales de experimentación se distribuyeron al azar en 7 grupos (n≥6); las ratas del grupo 1 fueron tratados con vehículo (NaCl 0.9% / Tween 0.5%, 0.1 mL/100g vía i.p.) y a los grupos 2-7 se les administró PAG en dosis de 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 75 mg/kg vía i.p. respectivamente. Tres horas después de la administración, el daño gástrico fue inducido y evaluado como se describe anteriormente.

6.6 Determinación de niveles endógenos de sulfuro de hidrógeno en estómago

6.6.1 Tratamiento a animales de experimentación

Se formaron tres grupos de ratas Wistar macho asignadas al azar (n=5-6). El primer grupo, corresponde a animales de experimentación que fueron tratados únicamente con vehículo (Tween 0.5%, 0.1 mL/100g vía i.p.) al inicio y nuevamente a las 3 horas; el segundo grupo fue tratado con el vehículo de PAG (Tween 0.5%, 0.1 mL/100g vía i.p.) y posteriormente con 1 mL de etanol absoluto por vía intragástrica; mientras que el tercer grupo fue tratado con propargilglicina (25 mg/kg, vía i.p.) y tres horas después se indujo el daño gástrico con etanol (Figura 10).

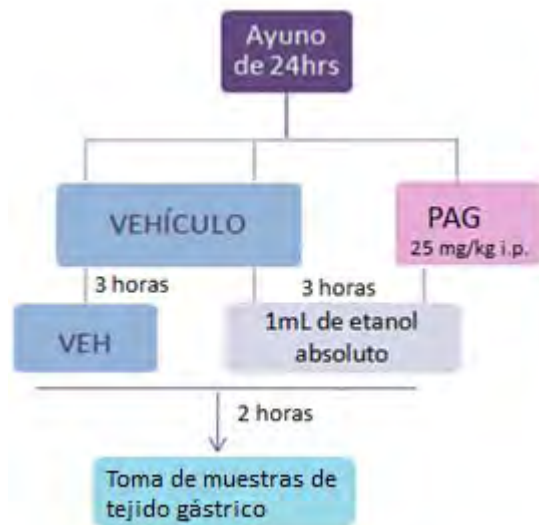


Figura 10. Tratamiento de los animales de experimentación en los que se determinaron H₂S y PGE₂.

Los animales de experimentación se sacrificaron en una cámara de CO₂ y se les extrajo el estómago siguiendo el procedimiento descrito en la inducción y evaluación de daño. En este caso, el tejido no se fijó y se tomó una muestra del cuerpo del estómago de alrededor de 300 mg de peso. Se registró el peso exacto del tejido y se almacenó a -70° C para su posterior análisis.

6.6.2 Curva patrón de sulfuro de hidrógeno

Se preparó una solución stock con 179 mg de NaHS en un volumen final de 10 mL, que corresponde a una concentración de 320 mmol NaHS/L o 96 mmol de H₂S/L (Qu K, *et al.*, 2006). Posteriormente, se realizaron 6 diluciones con concentraciones entre 0 y 0.96 mmol/L de H₂S como se detalla en el cuadro 3.

Solución de la curva patrón	Alícuota tomada(μL)	Volumen final de la sol.	Concentración de NaHS (mmol/L)	Concentración de H ₂ S(mmol/L)
C6	100 de la sol . Stock	10 mL	3.2	0.96
C5	75 de la sol . Stock	10 mL	2.4	0.72
C4	50 de la sol . Stock	10 mL	1.6	0.48
C3	25 de la sol . Stock	10 mL	0.8	0.24
C2	625 de la sol . C6	5 mL	0.4	0.12
C1	312 de la sol . C6	5 mL	0.2	0.06

Cuadro 3. Preparación de soluciones de la curva patrón para la determinación de H₂S

El sulfuro de hidrógeno se determinó mediante una reacción colorimétrica, por lo que las soluciones de la curva patrón preparadas fueron diluidas 1:10 en la mezcla de reacción, de modo que las absorbancias registradas corresponden a 96, 72, 48, 24, 12 y 6 μmol de H₂S/L.

En la reacción colorimétrica, se colocó una alícuota de 50 μL de la solución (C1-C6) en un tubo eppendorf y se adicionaron 150 μL de acetato de zinc al 0.66%; los componentes se mezclaron con vortex y se dejó reposar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 160 μL de ácido tricloroacético al 10%, 70 μL de sulfato de *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamina 20 mmol/L (disuelta en HCl 7.2 M) y finalmente 70 μL de FeCl₃ 30 mmol/L (disuelto en HCl 1.2 M), agitando luego de la adición de cada componente. La mezcla, con un volumen final de 500 μL, se dejó incubar durante 20

minutos para el desarrollo de una coloración azul-verde y pasado ese tiempo se determinaron las absorbancias a 650 nm.

6.6.3 Determinación de sulfuro de hidrógeno en las muestras

Los tejidos almacenados se descongelaron y se homogeneizaron con 300 μ L de acetato de zinc al 0.5 % a temperatura ambiente. Cada muestra se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó (4°C, 14000 g). Luego, se tomaron 200 μ L del sobrenadante y se colocaron en un tubo eppendorf con 160 μ L de ácido tricloroacético al 10%; se centrifugó nuevamente (4°C, 14000 g) y el sobrenadante se separó. Posteriormente, al sobrenadante se adicionaron 70 μ L de sulfato de *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamina 20 mmol/L (disuelta en HCl 7.2 M) y 70 μ L de FeCl₃ 30 mmol/L (disuelto en HCl 1.2 M), agitando luego de la adición de cada componente. La mezcla, con un volumen final de 500 μ L, se dejó incubar durante 20 minutos para el desarrollo de una coloración azul-verde y pasado ese tiempo se determinaron las absorbancia a 650 nm en un lector de placas BIORAD 680.

6.6.5 Análisis de los datos

Los valores de absorbancia obtenidos fueron corregidos al restarles el valor promedio del blanco. Luego, se construyó la curva patrón (concentración de las soluciones C1-C6 contra absorbancia) y se obtuvieron el intercepto y la pendiente de la recta. Empleando la ecuación de la recta se obtuvieron las concentraciones de sulfuro de hidrógeno para las muestras y considerando el volumen de muestra (la cantidad de sobrenadante recuperada luego de la adición de ácido tricloroacético) se calculó la cantidad de H₂S en cada muestra. Finalmente, se dividió entre el peso del tejido y se multiplicó por el factor de edema (factor que representa una relación entre los pesos promedio de los estómagos de los tratamientos para corregir el peso del tejido que corresponde a líquido producto de inflamación) para obtener resultados expresados en μ mol de H₂S/g de tejido.

6.7 Participación de grupos sulfhidrilo no proteicos y óxido nítrico en el efecto gastroprotector de PAG en el modelo de daño gástrico con etanol absoluto.

La metodología comprendió el análisis de 4 grupos experimentales y cada grupo estuvo formado por 5-9 animales de experimentación. Los grupos 1 y 2 recibieron como pretratamiento el vehículo del inhibidor (NaCl 0.9 %, Tween 0.5%, 0.1 mL/100g de peso corporal) por vía subcutánea; mientras que a los grupos 3 y 4 se les administró el compuesto inhibidor (NEM o L-NAME) ambos por vía subcutánea.

Treinta minutos después, a los grupos 1 y 3 se les administró el vehículo empleado para PAG (NaCl 0.9 % y Tween 0.5%, 0.1 mL/100g) y a los grupos 2 y 4 se les trató con PAG (25 mg/kg vía i.p.). Luego de tres horas, se indujo el daño gástrico con etanol absoluto en todos los grupos y se evaluó el área lesionada como se describe anteriormente.

6.8 Efecto de la inhibición y la activación de canales K^+_{ATP} en el efecto gastroprotector de PAG

Para investigar la posible participación de los canales de potasio dependientes de ATP en el mecanismo gastroprotector de propargilglicina, se evaluó el efecto de la administración de glibenclamida, que inactiva los canales K^+_{ATP} o diazóxido, que activa los canales K^+_{ATP} , 30 minutos antes de la administración de PAG.

El diseño del experimento para cada uno de los dos compuestos consistió en la formación de 4 grupos de ratas Wistar macho al azar (n=6-12). Los grupos 1 y 2 recibieron como primer tratamiento el vehículo del compuesto que actúa sobre canales K^+_{ATP} (NaOH 0.05 M, 0.1 mL/100g de peso corporal vía i.p.); mientras que a los grupos 3 y 4 se les administró glibenclamida (1 mg/kg vía i.p. en NaOH 0.05 M) o diazóxido (3 mg/kg en NaOH 0.050 M). Pasada media hora, a los grupos 1 y 3 se les administró el vehículo empleado para PAG (NaCl 0.9 %, Tween 0.5%) y a los grupos 2 y 4 se les trató con PAG (25 mg/kg vía i.p.) (Figura 11). Luego de tres horas de la segunda administración, se indujo el daño gástrico con etanol absoluto en todos los grupos y se evaluó el área lesionada como se describió anteriormente.

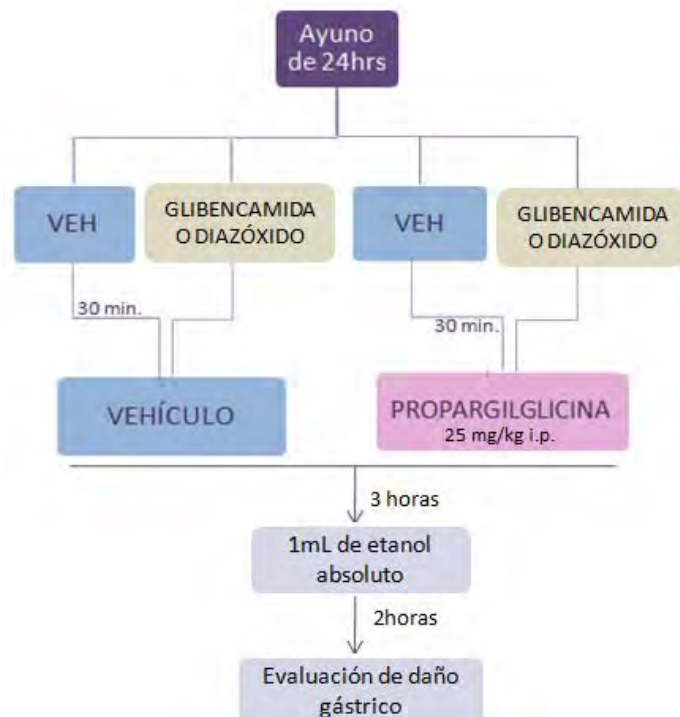


Figura 11. Metodología empleada para determinar la participación de canales K^+_{ATP} en el mecanismo gastroprotector de PAG.

6.9 Participación de prostaglandinas en el efecto gastroprotector de PAG en el daño gástrico inducido por etanol absoluto.

6.9.1 Efecto del pretratamiento con indometacina

Para determinar la posible participación de las prostaglandinas en el mecanismo gastroprotector de propargilglicina, se evaluó el efecto del pretratamiento con indometacina 75 minutos antes de la administración de PAG.

El diseño del experimento consistió en la formación de 4 grupos con ratas Wistar macho asignadas al azar (n=5); el procedimiento que se siguió se presenta enseguida de forma esquemática en la Figura 12.



Figura 12. Metodología para determinar la participación de prostaglandinas en el mecanismo gastroprotector de PAG.

6.9.2 Determinación de los niveles endógenos de prostaglandina E₂ en estómago.

a) Extracción de prostaglandinas de tejido gástrico

La determinación de PGE₂ se realizó a tres grupos (n= 5-6): grupo basal, grupo dañado con etanol y grupo PAG/ Etanol. El diseño experimental corresponde al descrito anteriormente para la determinación de niveles endógenos de H₂S (Figura 10).

Se tomó una muestra de tejido de alrededor de 300 mg de peso del cuerpo del estómago y se registró el peso exacto. Enseguida, el tejido se sumergió en un tubo Eppendorf que contenía 1 mL de solución amortiguadora de fosfato sódico (10 mM, pH 7.4) y se cortó con tijeras durante 30 segundos. La muestra se incubó en un baño de agua con movimiento durante 20 minutos y posteriormente se centrifugó a temperatura ambiente, 14000 g y durante 1 minuto. Finalmente, se separó el sobrenadante y se almacenó a -70° C para el

posterior análisis de los niveles de PGE₂ por un kit de ELISA (Kit Monoclonal EIA ACE™ Cayman Chemical Company).

b) Prueba de ELISA para la determinación de PGE₂ (Kit Cayman Chemical Company)

En principio, se realizó la reconstitución del Buffer EIA, diluyendo el contenido (10 mL) en agua grado MiliQ, hasta un volumen total final de 100 mL.

Luego, se construyó una curva patrón a partir de un estándar de 10 ng PGE₂ /mL. La primera solución (S1) fue preparada mediante una dilución 1:100 a partir del estándar. Posteriormente, a partir de la solución S1, se prepararon 7 diluciones sucesivas 1:2; por lo que resultaron las soluciones S2-S8 con concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 y 7.8 pg de PGE₂/mL respectivamente (Figura 13).

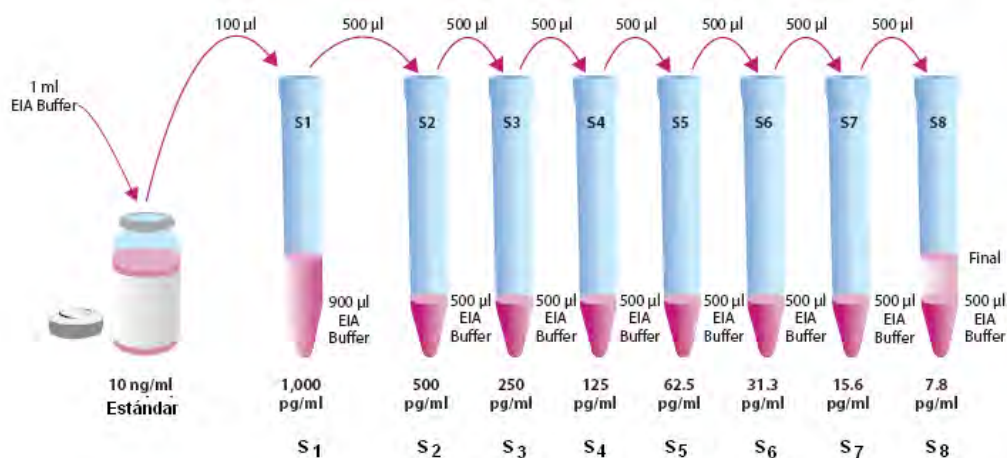


Figura 13. Procedimiento para la preparación de las soluciones de la curva patrón de PGE₂

Por otra parte, las muestras correspondientes a tejido gástrico por analizar, que estaban almacenadas en frío, fueron descongeladas y se muestreo lo suficiente para obtener una dilución 1:50 con buffer EIA por duplicado (20 µL de muestra + 980 µL de buffer EIA).

Posteriormente, el trazador, que contiene el conjugado de PGE₂-Acetilcolinesterasa (100 dtn), se reconstituyó con 6 mL de buffer EIA; mientras que el anticuerpo anti-PGE₂ (100 dtn) fue reconstituido mediante la adición de 6 mL de buffer EIA.

Enseguida, se asignaron las posiciones en la placa para 2 blancos (Blk), 2 celdas de unión no específica (NSB), 5 celdas de unión máxima (B_0), 1 celda de actividad total (TA), 8 concentraciones de la curva patrón elaboradas por duplicado (S1-S8), 6 muestras por duplicado de tejido con vehículo como único tratamiento (1-6), 6 muestras por duplicado cuyo tratamiento fue etanol (7-12) y 6 muestras por duplicado tratadas con PAG/etanol (13-18). La distribución fue como se muestra en el siguiente esquema (Figura 14):

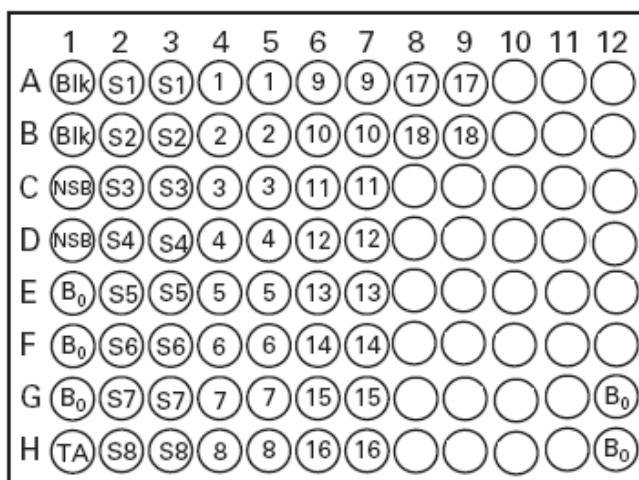


Figura 14. Asignación de la posición para cada ensayo realizado en la placa de ELISA

La adición de reactivos en cada celda se efectuó considerando si se trataba de Blk, NSB, TA, B_0 , estándar o muestra y siguiendo el orden de adición presentado en el cuadro 4:

Reactivo	Blanco (Blk)	Actividad total (TA)	Unión no específica (NSB)	Máxima unión (B_0)	Estándar (S1-S8)	Muestras analizadas
1. Buffer EIA	-----	-----	100 μ L	50 μ L	-----	-----
2. Soluciones de la curva patrón	-----	-----	-----	-----	50 μ L	-----
3. Muestras	-----	-----	-----	-----	-----	50 μ L
4. Trazador	-----	-----	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
5. Anticuerpo	-----	-----	-----	50 μ L	50 μ L	50 μ L

Cuadro 4. Orden y cantidades de los reactivos adicionados para cada tratamiento antes de incubar la placa.

Al terminar la adición de reactivos, se cubrió la placa con una tapa plástica adhesiva y se incubó a 4°C durante 18 horas. Posteriormente, se reconstituyó el buffer de lavado; para ello se disolvió el contenido del vial incluido en el kit (5 mL) en agua miliQ, se adicionó 1 mL de Tween 20 y se llevó a un volumen final de 2 L.

Una vez pasado el tiempo de incubación, se vació el contenido de las celdas de la placa y se realizó su lavado en 5 ocasiones consecutivas empleando el buffer de lavado.

Luego se adicionaron 5 µL de trazador a la celda TA y finalmente, se adicionaron 200 µL de reactivo de Ellman's a cada pocito. Se cubrió la placa con aluminio y se incubó a temperatura ambiente, con agitación ligera por un periodo de 60-90 minutos. Pasado ese tiempo se registró la absorbancia de cada celda a una longitud de onda de 412 nm.

c) Cálculos realizados con los datos

Primero se obtuvo el valor de máxima unión corregido ($B_{0 \text{ corregido}}$) como el promedio de las absorbancias obtenidas en las celdas B_0 menos el valor promedio del blanco y menos el valor promedio de las celdas NBS. Por otra parte se calcularon los valores B, que corresponde a las absorbancias de las muestras o de las concentraciones de la curva estándar menos el valor promedio del blanco y menos el valor promedio de las celdas NBS. Una vez efectuados esos cálculos se expresaron todos los resultados en % $B/B_{0 \text{ corregida}}$.

Se graficó Log PGE_2 contra % $B/B_{0 \text{ corregida}}$ para las concentraciones S1-S8, y debido a su ajuste a una recta se determinó la pendiente y el intercepto de la curva patrón.

Luego, se aplicó $\text{Log } [PGE_2] = (B - \text{intercepto}) / \text{pendiente}$ a los valores B de las muestras y sacando el antilogaritmo y considerando el factor de dilución (50) se obtuvo la concentración de PGE_2 en cada una de las muestras (ng/mL).

Finalmente, considerando que el volumen inicial donde se liberaron las prostaglandinas fue de 1 mL de buffer y dividiendo entre el peso del tejido se obtuvo la cantidad de PGE_2 por gramo de tejido.

6.10 Análisis estadístico

Todos los datos experimentales fueron expresados como la media \pm error medio estándar (EEM). La comparación entre grupos se efectuó a través de un análisis de varianza de una vía, seguido de una prueba de Student-Newman-Keuls. Los valores de $P \leq 0.05$ implicaron el rechazo de la hipótesis nula (H_0) y por tanto, indican que existe una diferencia significativa entre las medias de los grupos comparados con 95% de confianza.

VII. Resultados

7.1 Efecto gastroprotector de Propargilglicina en el daño gástrico inducido por etanol.

La administración previa de D,L-propargilglicina (PAG) presentó efecto gastroprotector a partir de la dosis de 6.25 mg/kg. El porcentaje de lesiones gástricas para las dosis mayores a 6.25 mg/kg de PAG disminuyó significativamente el daño gástrico inducido por etanol hasta alcanzar una gastroprotección del 79.1 % con la dosis de 75 mg/kg (Figura 15).

Considerando estos resultados, se eligió la dosis de 25 mg/kg de PAG para realizar experimentos posteriores, que corresponde aproximadamente a un 50% de protección.

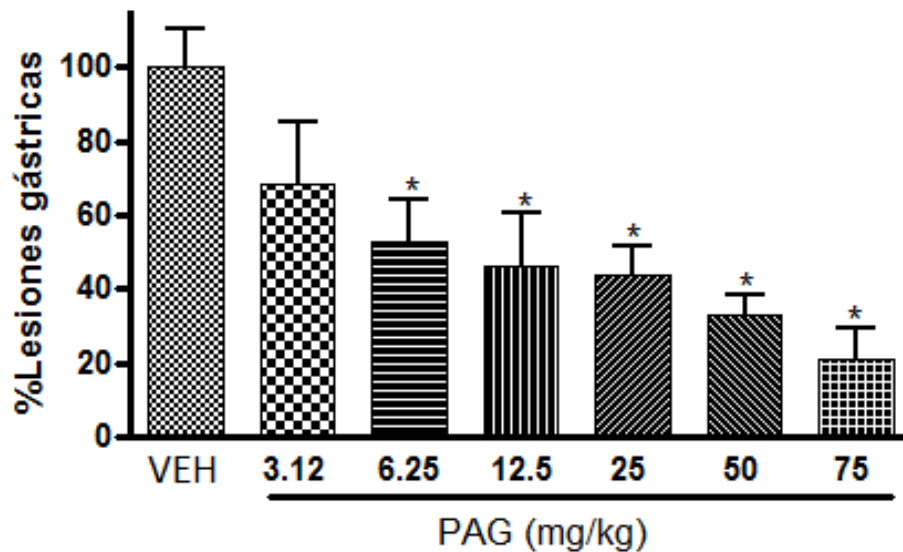


Figura 15. Efecto de PAG (D,L-propargilglicina) en el daño gástrico inducido con etanol absoluto en ratas. Los resultados se presentan como %lesiones gástricas promedio \pm EEM (n=6-9).

* $P \leq 0.05$ contra el grupo vehículo

7.2 Niveles endógenos de sulfuro de hidrógeno en estómago.

Los niveles endógenos de H_2S se incrementaron de forma significativa en el tejido gástrico dañado con etanol absoluto, alcanzando en promedio niveles de $32.6 \pm 11.3 \mu\text{mol/g}$ de tejido, que corresponden a aproximadamente el doble de los niveles basales que fueron de $16.7 \pm 4.4 \mu\text{mol/g}$ de tejido. En tanto que, el tratamiento con 25 mg/kg de PAG mantuvo los niveles basales de H_2S en $17.6 \pm 3.6 \mu\text{mol/g}$ de tejido, inhibiendo la elevación de estos niveles provocados por el tratamiento con etanol (Figura 16).

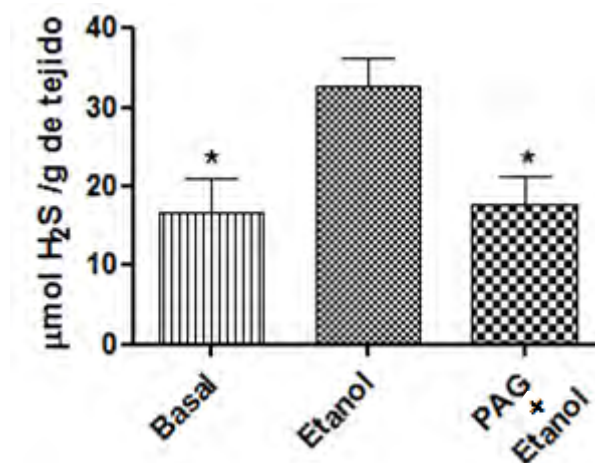


Figura 16. Efecto de PAG (25 mg/kg i.p.) en los niveles endógenos de H₂S en el modelo de daño gástrico con etanol (1mL, vía intragástrica). Los datos se presentan como niveles promedio ± EEM de sulfuro de hidrógeno en estómago de ratas Wistar (n=5-6). * P≤0.05 contra el grupo etanol

7.3 Participación de grupos sulfhidrilo no proteicos en el efecto gastroprotector de PAG en el daño gástrico inducido por etanol.

La NEM, un bloqueador de grupos sulfhidrilo no proteicos, a la dosis de 10 mg/kg, no modificó el daño gástrico que ocasiona la administración intragástrica de 1 mL de etanol absoluto. Sin embargo, a esta dosis la NEM revirtió el efecto gastroprotector de PAG a la dosis de 25 mg/kg. En este experimento la PAG disminuyó el porcentaje de lesiones gástricas hasta un promedio de 51.4 ±9 % (Figura 17).

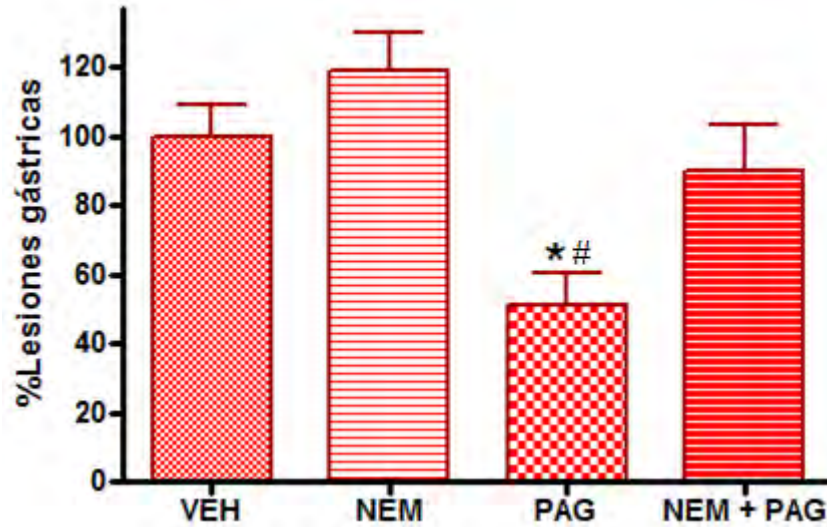


Figura 17. Efecto de PAG (25 mg/kg, vía i.p.) en el daño gástrico inducido por etanol absoluto en ratas pretratadas con NEM (10 mg/kg, s.c.). Los resultados se presentan como %lesiones gástricas promedio \pm EEM (n=6). * $P \leq 0.05$ contra el grupo vehículo # $P \leq 0.05$ contra NEM + PAG

7.4 Participación de óxido nítrico en el efecto gastroprotector de PAG

El daño gástrico inducido por etanol fue el mismo para el lote tratado con L-NAME y para el lote tratado con el vehículo. En este experimento, la PAG disminuyó el porcentaje de lesiones gástricas hasta un promedio de $41.9 \pm 17\%$ (Figura 18).

El pretratamiento con L-NAME, a la dosis de 70 mg/kg, no modificó el efecto gastroprotector del PAG en el daño gástrico inducido con etanol absoluto (Figura 18).

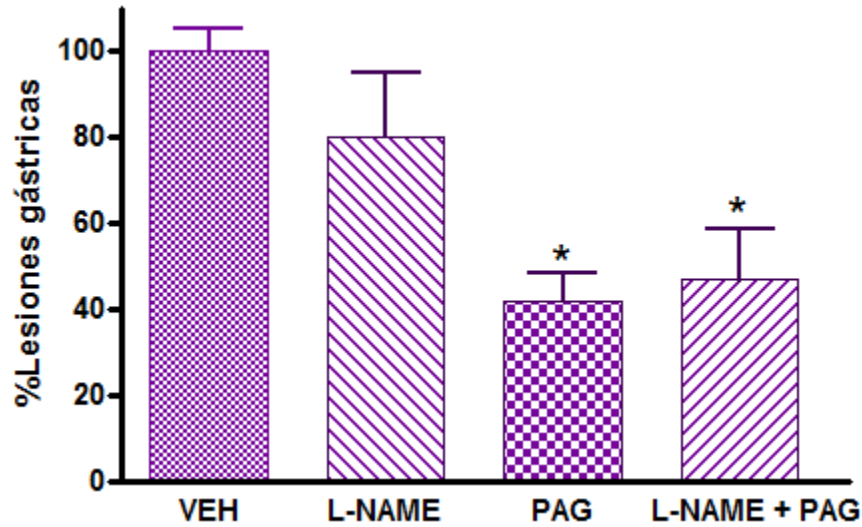


Figura 18. Efecto de PAG (25 mg/kg, vía i.p.) en el daño gástrico inducido por etanol absoluto en ratas pretratadas con L-NAME (70 mg/kg, vía s.c.). Los resultados se presentan como %lesiones gástricas \pm EEM (n=6). * $P \leq 0.05$ contra el grupo vehículo

7.5 Efecto de la inhibición y la activación de canales de potasio dependientes de ATP en el efecto gastroprotector de PAG

El efecto gastroprotector de PAG a la dosis de 25 mg/kg no se modificó por el bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) con glibenclamida a la dosis de 1 mg/kg (Figura 19), ni por la activación de los mismos con diazóxido a la dosis de 3 mg/kg (Figura 20). Ni la glibenclamida ni el diazóxido modificaron el daño gástrico inducido por etanol de forma significativa (Figuras 19 y 20).

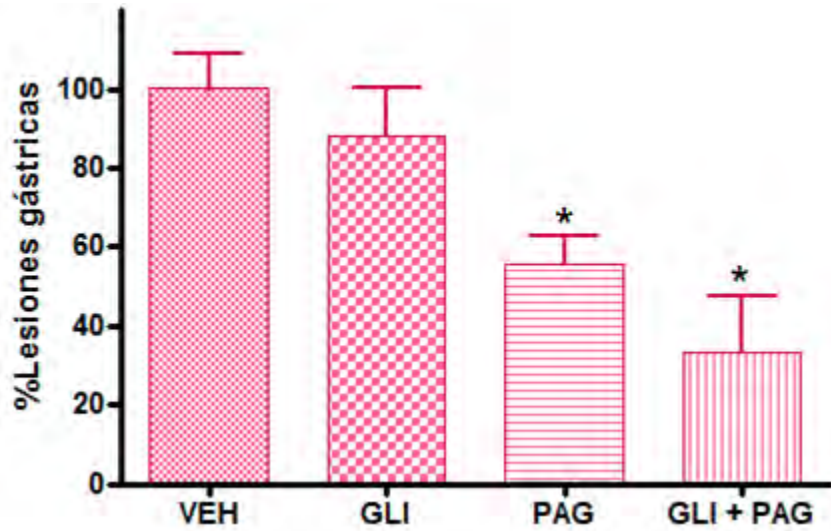


Figura 19. Efecto de PAG (25 mg/kg, vía i.p.) sobre el daño gástrico inducido por etanol absoluto en ratas pretratadas con Glibenclamida (1 mg/kg, vía i.p.). Los datos se presentan como %lesiones gástricas \pm EEM (n=6-12). * $P \leq 0.05$ contra el grupo vehículo

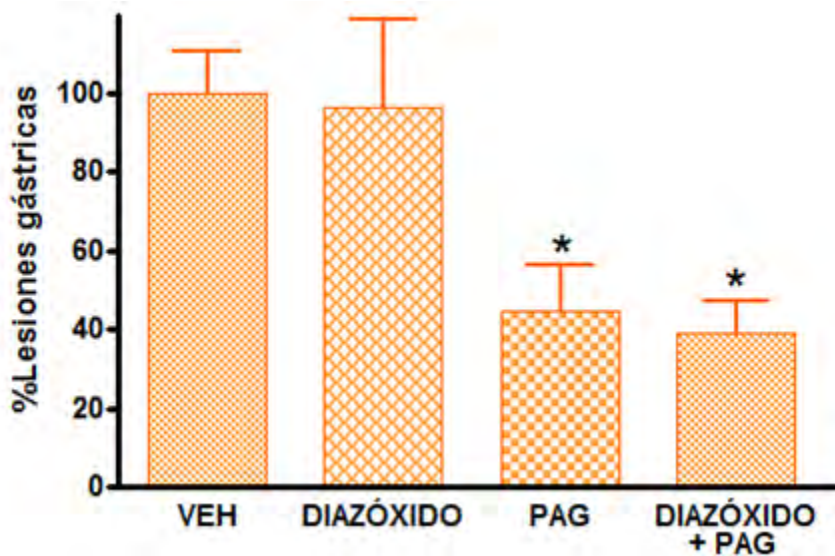


Figura 20. Efecto de PAG (25 mg/kg, vía i.p.) sobre el daño gástrico inducido por etanol absoluto en ratas pretratadas con Diazóxido (3 mg/kg, vía i.p.) . Los datos se presentan como %lesiones gástricas \pm EEM (n=6). * $P \leq 0.05$ contra el grupo vehículo

7.6 Participación de prostaglandinas en el efecto gastroprotector de PAG

7.6.1 Efecto del pretratamiento con indometacina en el efecto gastroprotector de PAG

El daño gástrico inducido por etanol fue el mismo para el grupo tratado con indometacina y para el grupo tratado con el vehículo. En este experimento, la gastroprotección ejercida por PAG logró que el porcentaje de lesiones gástricas se redujera hasta un 45.2 ± 8 %. La indometacina, a la dosis de 10 mg/kg, no modifica la magnitud del daño gástrico causado por etanol. El pretartamiento con indometacina inhibió el efecto gastroprotector de PAG en el modelo de daño con etanol (Figura 21).

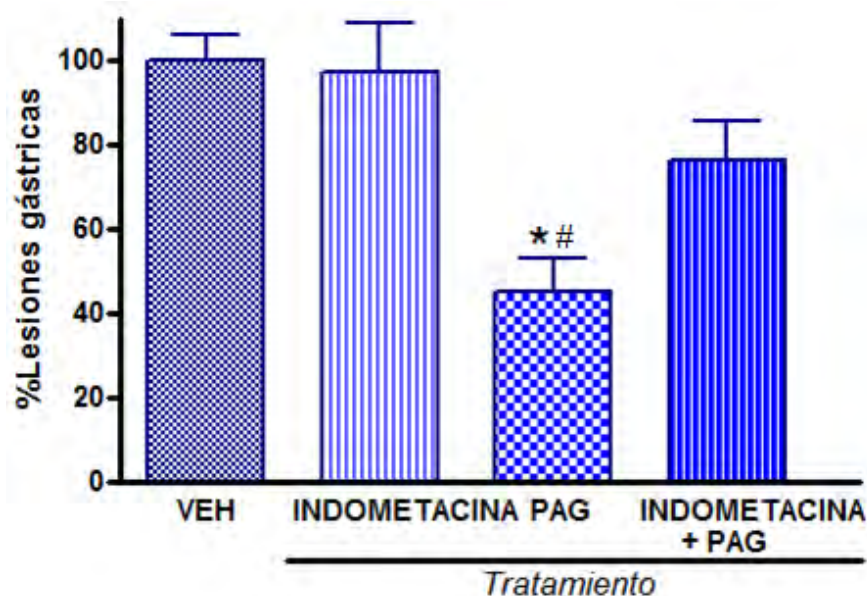


Figura 21. Efecto de PAG (25 mg/kg, vía i.p.) sobre el daño gástrico inducido por etanol absoluto en ratas pretratadas con indometacina (10 mg/kg, vía i.p.). Los resultados están expresados como %lesiones gástricas promedio \pm EEM (n=7-9).

* $P \leq 0.05$ contra el grupo vehículo # $P \leq 0.05$ contra el grupo tratado con Indometacina/PAG/etanol

7.6.2 Niveles endógenos de prostaglandina E_2 en estómago.

Con la finalidad de establecer si el efecto gastroprotector de PAG se relaciona con un incremento en la síntesis de prostaglandinas, se determinaron los niveles endógenos de prostaglandina E_2 en estómago de ratas para un grupo control en condiciones basales, un

grupo al que se le provocó daño con etanol y un grupo tratado con PAG y etanol. En el lote tratado con etanol disminuyeron significativamente los niveles basales de prostaglandinas (139.2 ± 34.4 ng/g de tejido) en aproximadamente un 50% (68.26 ± 4.7 ng/g de tejido); niveles parecidos que se encontraron en el lote tratado con PAG (55.99 ± 11.0 ng/g de tejido), lo que indica que PAG no altera la síntesis de las prostaglandinas E_2 (Cuadro 5).

Tratamiento	PGE ₂ (ng/g de tejido)
	media \pm EEM
Vehículo/Vehículo (grupo basal)	139.20 ± 34.4
Vehículo/etanol	68.26 ± 4.7 *
PAG/etanol	55.99 ± 11.0 *

Cuadro 5. Participación de prostaglandinas en el efecto de PAG (25 mg/kg i.p.) sobre el daño gástrico inducido con etanol absoluto. Los datos se presentan como niveles promedio de PGE₂ en estómago de ratas Wistar \pm EEM (n=5-6). *P \leq 0.05 contra el grupo basal

VIII. Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran claramente que la *D,L*-propargilglicina, inhibidor de la enzima cistationina- γ -liasa (CSE), protege del daño gástrico inducido con etanol absoluto, debido tal vez a que no permite que los niveles de H_2S se eleven como respuesta al daño causado por etanol.

En el sistema gastrointestinal, el conocimiento acerca del H_2S se ha incrementado notoriamente desde el 2005, a través de los estudios realizados en el modelo de daño gástrico inducido por antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Este trabajo estuvo enfocado a obtener información acerca del papel que desempeña el sulfuro de hidrógeno en otro modelo: el modelo de daño gástrico inducido con etanol absoluto; empleando como estrategias la determinación de H_2S en estómago y la caracterización de la inhibición de su síntesis a través de la administración del inhibidor propargilglicina (PAG).

Los resultados indican que los niveles endógenos de sulfuro de hidrógeno se encuentran incrementados en el modelo de daño gástrico con etanol. Este incremento de H_2S en estómago podría deberse, a que la destrucción del tejido derivada del daño inducido con etanol permite el incremento en la síntesis de H_2S en estómago, de manera similar a como ocurre con el incremento de $TNF-\alpha$ y LTC_4 luego del tratamiento con etanol (Ferraz, *et al.*, 1997; Peskar, 1991). Es posible que este papel dual del H_2S esté relacionado con las concentraciones de este modulador en diferentes órganos.

El papel nocivo del sulfuro de hidrógeno al encontrarse a altas concentraciones ya ha sido reportado en otros órganos, pero su mecanismo de daño no ha sido del todo esclarecido. Con respecto a ello, por ejemplo, se ha propuesto que el exceso de H_2S causa un efecto tóxico en las neuronas a través de la inhibición de la citocromo c oxidasa y/o la estimulación exagerada de receptores NMDA, y eso conlleva a un retraso mental progresivo en pacientes con trisomía 21 (Kamoun, 2001).

Por otra parte, el aumento en los niveles endógenos de H_2S observado en este estudio con el daño gástrico inducido con etanol resulta contrario a lo que se ha observado en el

modelo de daño gástrico con AINEs, en donde existe un decremento de la formación de H₂S y de la expresión de la enzima CSE (cistationina-γ-liasa), importante en su síntesis.

La discrepancia entre los niveles endógenos de sulfuro de hidrógeno presentes en el daño inducido con etanol y en el de daño gástrico inducido con AINEs se debe, probablemente, a diferencias en los mecanismos de daño involucrados. En primera, el etanol es un agente necrozante que incrementa la permeabilidad y la generación de radicales libres, induce daño en la membrana celular y provoca la destrucción extensiva de tejido; mientras que los AINEs causan daño gástrico principalmente a través de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, lo que a su vez genera un decremento en la secreción de moco y bicarbonato, aumenta la secreción de ácido, disminuye el flujo sanguíneo e incrementa la adherencia de leucocitos. En segunda, el tipo de lesiones resultantes en estos dos modelos tampoco coincide como resultado de las diferencias en la manera que se origina el daño gástrico; las lesiones observadas en el modelo de daño gástrico con AINEs son puntuales y profundas, mientras que el daño con etanol origina úlceras hemorrágicas en la mucosa con una extensión notoriamente mayor a la encontrada en daño con AINES como indometacina (Glavin y Szabo, 1992 ; Whittle, 1981; Lanza, 1989).

Por otra parte, la administración de PAG, un inhibidor de la enzima CSE para la síntesis de H₂S, previene el daño gástrico en una forma dosis dependiente en el modelo de daño con etanol absoluto. Este efecto benéfico de PAG ha sido descrito anteriormente como una reducción en la respuesta inflamatoria en el modelo de sepsis y en el modelo de endotoxemia con lipopolisacáridos (Zhang, *et al.*, 2006; Collin, *et al.*, 2005).

Recientemente, se ha comprendido que en el sistema gastrointestinal, para la síntesis de H₂S se encuentran expresadas tanto la enzima CSE como la CBS, sin embargo, Fiorucci y colaboradores (2005) comprobaron el rol prevalente de la enzima CSE en la generación de sulfuro de hidrógeno en el estómago; por ello, el efecto observado por la administración de PAG podría indicar que la inhibición de la síntesis de H₂S a través de la CSE previene el daño gástrico con etanol absoluto de forma dosis dependiente.

Este hallazgo resulta congruente con el incremento en el sulfuro de hidrógeno endógeno en el daño gástrico con etanol, pero nuevamente parece contradecir observaciones recientes hechas a partir del estudio de agentes donadores de H₂S en el daño gástrico inducido con AINEs (Wallace, *et al.*, 2007). En ese trabajo de investigación, se indica que los agentes donadores 4-HTB y el reactivo de Lawesson, así como la cisteína, un precursor de H₂S, promueven la sanación de úlceras gástricas; también se describe que el efecto gastroprotector de cisteína es inhibido por un pretratamiento con PAG. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los niveles de sulfuro de hidrógeno están disminuidos en el daño gástrico con AINEs, por lo que resulta congruente que agentes que incrementan la síntesis de sulfuro de hidrógeno favorezcan la sanación de úlceras gástricas. Además, este grupo de trabajo evaluó la promoción de la sanación de úlceras y en el presente trabajo se evaluó la prevención de las mismas.

Por otra parte, recientemente se publicó un trabajo con el modelo de inducción de úlcera con etanol al 50% , en el que evaluaron el efecto de los agentes donadores de H₂S en la prevención del daño gástrico. Ese trabajo propone que los agentes donadores de sulfuro de hidrógeno NaSH y el reactivo de Lawesson, al igual que el precursor de sulfuro de hidrógeno cisteína tienen un efecto gastroprotector al ser administrados 30 minutos antes de inducir el daño y no PAG. Sin embargo, ellos relacionan el efecto gastroprotector de los agentes donadores o precursores con un incremento importante en la respuesta de neuronas sensibles a capsaicina, un aumento de la síntesis de glutatión y la activación de canales K⁺_{ATP}, pero no con cambios en los niveles de H₂S (Medeiros, *et al.*, 2009).

Es probable que en modelos donde el daño gástrico no incrementa significativamente los niveles de H₂S en estómago, la administración de agentes donadores no representa un incremento de H₂S suficiente para que se alcancen niveles tóxicos. Siguiendo esa propuesta, los efectos farmacológicos observados al administrar los agentes donadores no se relacionan directamente con los niveles de H₂S, ya que como lo describe Fiorucci y colaboradores (2005), el efecto gastroprotector de NaHS, L-cisteína y N-acetil-cisteína en el daño gástrico inducido con AINEs es independiente de H₂S, ya que estos compuestos no incrementaron la síntesis de H₂S en el tejido gástrico. Es decir que tales compuestos

poseen efecto gastroprotector intrínseco. Adicionalmente se sabe que el NaHS, incrementa la concentración intracelular de L-cisteína y γ -glutamilcisteína que son precursores inmediatos de glutatión (Kimura y Kimura, 2004)

Los resultados acerca del efecto gastroprotector de PAG presentados en este trabajo son contrarios a lo encontrado por Medeiros y colaboradores (2009). A pesar de que en ambos trabajos el mecanismo de daño es a través del mismo agente necrozante, la concentración de etanol empleada por ellos es 50% y en este trabajo el daño gástrico se indujo con etanol absoluto.

En este trabajo se encontró que el incremento significativo en los niveles de H₂S endógeno se presenta en el daño gástrico con etanol absoluto, pero hasta el momento, no se sabe si se presenta al inducir daño gástrico con etanol a menores concentraciones. Se ha observado que el incremento significativo del sulfuro de hidrógeno depende de la intensidad del estímulo nocivo; así por ejemplo, la administración subcutánea de formalina 1.25% en la pata trasera de rata en el modelo de dolor inflamatorio persistente no modifica significativamente los niveles de H₂S, pero la administración de formalina a una concentración de 5% incrementa de forma significativa los niveles de H₂S (Lee, *et al.*, 2008).

El efecto gastroprotector de PAG se debe a la prevención del incremento en los niveles de sulfuro de hidrógeno, por lo que, en modelos donde no existe un incremento significativo de H₂S no se observará su efecto benéfico. Así, por ejemplo, en el caso de la inducción de dolor inflamatorio con formalina al 1.25% o 5% se encontró que PAG reduce el edema cuando se usó formalina al 5% y no modifica el grado de edema cuando se administró formalina al 1.25% (Lee, *et al.*, 2008).

Ante el descubrimiento del efecto gastroprotector de PAG en el daño gástrico inducido con etanol y conociendo que los factores involucrados en gastroprotección se regulan entre sí, se decidió estudiar la participación de grupos sulfhidrilos no proteicos y del óxido nítrico (ON) como posibles mediadores compensadores frente a la inhibición de la producción de sulfuro de hidrógeno a través de la administración de PAG.

En los experimentos destinados a determinar la posible regulación de estos factores humorales sobre el efecto de PAG en el modelo de daño gástrico con etanol, se incluyó un grupo tratado con PAG (25 mg/kg), con lo que se constató en repetidas ocasiones su efecto gastroprotector.

Además, se determinó que el bloqueo de grupos sulfhidrilo no proteicos, mediante el pretratamiento con el inhibidor NEM, impidió completamente el efecto gastroprotector de PAG en el modelo de daño gástrico con etanol (Figura 17).

Se ha descrito que la administración intraperitoneal de 5 μ moles de PAG en ratón o la administración de 50 μ moles de PAG/kg por vía i.p. en ratas durante tres días consecutivos inhiben completamente la enzima CSE de forma irreversible en hígado (Shinozuka, *et al.*, 1982; Houghton, *et al.*, 1991). La inhibición de la enzima CSE disminuye la producción de H₂S, pero también puede disminuir la producción de cisteína a partir de cistina o de cistationina (Figura 4), lo cual podría repercutir a su vez en la síntesis de glutatión (GSH).

El pretratamiento con PAG sobre los niveles de glutatión es controversial; en el experimento anteriormente descrito, donde los ratones recibieron un tratamiento de una sola dosis de PAG, se observó una reducción del GSH hepático hasta el 40%; mientras que en la investigación donde las ratas fueron tratadas durante 3 días consecutivos con PAG los niveles de GSH hepático no se encontraron alterados (Shinozuka, *et al.*, 1982; Houghton, *et al.*, 1991).

Los investigadores Kim y Kim (2001) encontraron que el pretratamiento con 200 μ moles/kg i.p. de PAG redujo significativamente los niveles de glutatión en tejido y en plasma; ocasionó la reducción de los niveles de cisteína en hígado y riñones, así como los niveles de cistina en plasma, que corresponden a la forma en que se presenta predominantemente la cisteína en plasma; y bloqueó el incremento de GSH mediante la administración del precursor metionina en ratones ICR. Debido a lo anterior, estos investigadores propusieron que la última reacción enzimática de transulfuración de la conversión de metionina a cisteína es bloqueada por PAG.

De forma similar, se ha observado que el pretratamiento con una dosis de 50 mg/kg de PAG impide el incremento de glutatión en estómago que ejerce la cisteína sobre el daño gástrico con etanol al 50% ; sin embargo, en ese trabajo no se exponen resultados para conocer si los niveles de GSH en estómago se modifican significativamente en ratas tratadas con PAG después de provocar daño gástrico con etanol 50% con respecto a ratas con daño gástrico con etanol al 50%, o para determinar si los niveles gástricos de GSH difieren entre ratas únicamente tratadas con PAG y ratas en condiciones basales (Medeiros, *et al.*, 2009).

De acuerdo con lo anterior, es posible proponer que PAG ejerce un efecto benéfico al evitar que los niveles de H₂S lleguen a concentraciones tóxicas en estómago, pero probablemente también impide la producción de más cisteína a partir de metionina.

Por ello, posiblemente, cuando se suman la inhibición de la enzima CSE por PAG y la administración de NEM, que también inactiva los compuestos antioxidantes con grupos sulfhidrilo ya presentes en estómago, al daño gástrico con etanol absoluto, donde hay una gran generación de radicales libres, el daño resultante en el tejido es tan intenso que no se logra revertir mediante la disminución de la síntesis de H₂S.

También se evaluó la participación del óxido nítrico, ya que resulta posible una regulación entre la enzima CSE y la vía del óxido nítrico como se ha observado en el sistema cardiovascular, donde los compuestos donadores de óxido nítrico incrementan la generación de H₂S a través del incremento de la expresión CSE y en una forma dependiente de GMP_c. Sin embargo, los experimentos en el sistema gastrointestinal para evaluar la posible participación del óxido nítrico, realizados en este trabajo mediante el pretratamiento con el inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) L-NAME, mostraron que el óxido nítrico no está involucrado en el efecto gastroprotector de PAG en el modelo de daño gástrico con etanol absoluto.

Por otra parte, los blancos moleculares principales que se han relacionado con el sulfuro de hidrógeno son los canales K⁺_{ATP}. El sulfuro de hidrógeno estimula este tipo de canales de potasio en músculo liso, neuronas, cardiomiocitos y células pancreáticas (Łowicka y

Beltowski, 2007). Es por ello que, en este trabajo se evaluó la participación de los canales K^+_{ATP} en el efecto gastroprotector de PAG en el modelo de daño gástrico inducido con etanol.

En los experimentos realizados a este respecto, se encontró que ni la inhibición de canales K^+_{ATP} con glibenclamida ni la apertura de los mismos con diazóxido modificó el efecto de PAG en la prevención del daño gástrico causado por etanol absoluto. Resulta importante destacar, que esta observación da indicios de que la inhibición de la CSE no desencadena un efecto sobre canales de potasio. Sin embargo, no puede descartarse el hecho de que el H_2S podría actuar a través de la activación de canales K^+_{ATP} en el sistema gastrointestinal a determinadas concentraciones, como se ha mostrado que lo hace en otros sistemas. En relación con ésta posibilidad, Medeiros y colaboradores (2009) determinaron que el efecto gastroprotector de cisteína, NaSH y el compuesto de Lawesson se inhibe por el pretratamiento con glibenclamida, por lo que proponen que esos agentes previenen el daño gástrico inducido por etanol al 50%, al menos en parte, mediante la activación de canales K^+_{ATP} (Medeiros, *et al.*, 2009). De acuerdo a lo anterior, el efecto gastroprotector de los agentes donadores y precursores podría prevenir la isquemia característica en el daño con etanol a través de la vasodilatación dependiente de canales K^+_{ATP} .

Por otro lado, se ha determinado que en el daño gástrico inducido con AINEs la inhibición de canales K^+_{ATP} contribuye a su patogénesis y, luego de la observación de que los modelos de daño gástrico con etanol y con AINEs parecen comportarse de modo contrario, es posible esperar que la inhibición de canales K^+_{ATP} tenga un efecto gastroprotector en el modelo de daño gástrico con etanol. En este trabajo se encontró que la inhibición de los canales K^+_{ATP} no disminuyó de forma significativa el daño gástrico en el modelo de etanol absoluto; sin embargo, solamente se evaluó la inhibición de canales de potasio con una dosis de glibenclamida de 1 mg/kg vía i.p., de modo que resulta necesaria la evaluación de otras dosis de glibenclamida para descartar esa posibilidad.

Por otra parte, se estudió la posible participación de prostaglandinas en la prevención del daño gástrico inducido con etanol que ejerce PAG, a través del pretratamiento con indometacina y mediante la determinación de los niveles endógenos de PGE₂.

El pretratamiento con indometacina disminuyó significativamente el efecto gastroprotector de PAG, lo cual sugirió, en primera instancia, que las prostaglandinas constituyen un mediador activado de forma compensatoria y que podría ser responsable, al menos en parte, del efecto gastroprotector de PAG. Sin embargo, si bien el porcentaje de lesiones gástricas promedio del grupo tratado con indometacina y PAG no es significativamente diferente al promedio de lesiones gástricas del grupo vehículo, es de notarse que el grado de daño gástrico es ligeramente menor para el grupo con la combinación de tratamientos que para el grupo control tratado con el vehículo.

Para determinar si el efecto de PAG se debe a un incremento en los niveles endógenos de prostaglandinas, se midieron los niveles de PGE₂ por medio de un kit que se basa en una prueba de ELISA.

Los resultados indicaron que la cantidad de PGE₂ está reducida en el tejido gástrico dañado con etanol con respecto a tejidos basales, dato que coincide con lo reportado en la literatura y que se relaciona con el efecto necrozante del etanol sobre las células productoras de prostaglandinas (Glavin y Szabo, 1992).

Además, se observó que el tratamiento con PAG no modifica, de forma significativa, los niveles de esta prostaglandina con respecto al tejido dañado. Por una parte, este resultado indica que la inhibición de la enzima CSE no regula la síntesis de prostaglandinas de forma positiva o negativa. Por otra parte, este resultado implica que el efecto gastroprotector de PAG frente al daño gástrico con etanol no está relacionado con un incremento en su síntesis y probablemente, las prostaglandinas no son factores involucrados en el mecanismo de PAG.

Si PAG regulara a las prostaglandinas de algún modo diferente a favorecer su síntesis, es muy probable que no se apreciara en experimentos con la duración de la prueba

realizada, ya que requerirían un proceso de señalización y de síntesis. Es posible, que el daño observado como la inhibición del efecto gastroprotector de PAG se deba a la suma del daño gástrico inducido por el daño con etanol y el daño provocado por la combinación de indometacina con PAG. Esto debido a que, indometacina no alcanza a dañar a la dosis administrada, pero se ha reportado que la administración de una combinación de PAG y un AINE incrementa significativamente indicadores de la respuesta inflamatoria (aumenta la actividad de la mioeloperoxidasa (MPO) y la cantidad de TNF- α RNAm, ICAM-1 RNAm y LFA-1 RNAm en la mucosa gástrica) con respecto a grupos tratados únicamente con el AINE (Fiorucci, *et al.*, 2005).

De ese modo, a pesar de que la combinación indometacina y etanol genera un porcentaje de lesiones gástricas similar al observado con el daño con etanol, es posible que el daño fuera más complejo. Resulta probable que el tejido se enfrentó a factores nocivos producto de la inhibición de la ciclooxigenasa y del daño con etanol, de modo que, a pesar de que PAG disminuyó los niveles de H₂S, el tejido no pudo recuperarse del efecto de todos los componentes involucrados en la patogénesis, por lo que no se alcanzó a prevenir el daño de forma significativa.

IX. Conclusiones

1. La propargilglicina (PAG), un inhibidor de la síntesis de H₂S, presenta un efecto gastroprotector dosis dependiente en el modelo de daño gástrico con etanol en ratas.
2. El efecto gastroprotector de PAG se debe principalmente a la prevención del incremento en el sulfuro de hidrógeno endógeno que se induce por el daño gástrico con etanol absoluto.
3. La prevención del daño gástrico observada con la administración de PAG se relaciona con la participación de grupos sulfhidrilos no proteicos y no se debe a la participación del óxido nítrico, canales K⁺_{ATP}, ni prostaglandinas.

X. Perspectivas

Considerando el efecto nocivo del sulfuro de hidrógeno en el modelo de daño con etanol absoluto, resulta pertinente determinar si los agentes donadores de sulfuro de hidrógeno como el 4-HTB y el NaSH puede ocasionar daño a la mucosa, a que dosis y a través de que mecanismo.

Así mismo, determinar que relación existe entre los niveles de sulfuro de hidrógeno en estómago y la concentración de etanol empleada para inducir daño gástrico.

Por otra parte, es también necesario determinar bajo qué condiciones las enzimas CSE y CBS incrementan la síntesis de sulfuro de hidrógeno en estómago, para poder relacionar esa información con sus funciones en el organismo.

XI. Bibliografía

Abbas A.K. Lichtman A. H. (2004). Inmunología celular y molecular. 5ª Ed., México, Sanunders-Elsevier, 563 pp.

Abe K, Kimura H (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*; 16: 1066–1071.

Abeles R.H., Walsh C. (1973). Acetylenic enzyme inactivators. Inactivation of γ -cystathionase, in vitro and in vivo by propargylglycine. *J Am Chem Soc*; 95: 6124–6125.

Accarino A., Ponce J. (2003). Tratamiento de las enfermedades gastroenterológicas, Asociación Española de Gastroenterología, Ediciones Doyma, S.L., Madrid España. 83-95pp.

Arrieta J., Benitez, J., Flores E., Castillo & Navarrete A. (2005). Purification of gastroprotective triterpenoids from stem bark of *Amphitrygium adstringens*; role of prostraglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med*; 69: 905-909.

Ali A.T.M.M.(1995). Natural honey, exert is protective effects against ethanol-induced gastric lesions in rats by preventing depletion of glandular nonproteinsulfhydryls. *Tropical Gastroenterology*; 16: 18–26.

Allen A., Flemström G., Garner A., Kivilaakso E. (1993).Gastroduodenal mucosal protection. *Physiol Rev*; 73: 823-57.

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

Beauchamp R.D., Townsend C.M., Singh Jr. P., Glass E. J., Thompson J.C. (1985). Proglumide, a gastrin receptor antagonist, inhibits growth of colon cancer and enhances survival in mice. *Ann Surg*; 202: 303-309.

Bettarello A. (1985). Antiulcer therapy past to present. *Dig Dis Sci*; 30: 365-425.

Bhatia M., Sidhapuriwala J., Moochhala S.M., Moore P.K. (2005a). Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *Br J Pharmacol*; 145: 141–144.

Bhatia M., Wong F.L., Fu D., Lau H.Y., Moochhala S.M., Moore P.K. (2005b). Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *FASEB J*; 19: 623–625.

[Bhatia V.](#), [Tandon R.K.](#) (2005). Stress and the gastrointestinal tract. [J Gastroenterol Hepatol](#); 20: 332-339.

Bian J.S., Yong Q.C., Pan T.T., Feng Z.N., Ali M.Y., Zhou S., Moore P.K. (2006). Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*; 316: 670–678.

Blecker, U. (1999). Gastritis and peptic ulcer disease in childhood. *Eur J Pediatr*; 158: 541-546.

Brown J.F., Keates A.C., Hanson P.J., Whittle B.J.R. (1993). Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *Gastrointest Liver Physiol*; 28: G418- G422.

Brzozowski T., Konturek P.C., Konturek S.J., Brzozowska I. , Pawlik T. (2005). Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J Physiol Pharmacol*; 56: 33-55.

Bulatov A.V., Goldvirt D.K., Moskvina L.N., Moskvina A.L., Vaskova E.A (2006). Stepwise Injection Photometric Determination of Hydrogen Sulfide in Natural Gas. *J Flow Injection Anal*; 23: 102–106.

Chen X., Jhee K.H., Kruger W.D. (2004). Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine γ -synthase *via* the condensation of cysteine and homocysteine. *J Biol Chem*; 279: 52082–52086.

Collin M., Anuar F.B., Murch O., Bhatia M., Moore P.K. (2005). Thiemeermann C: Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. *Br J Pharmacol*; 146: 498–505.

Del Valle, J. (2006). Úlcera péptica y trastornos relacionados. En: Kasper D. L., *et al*, (Eds.), *Harrison Principios de Medicina Interna*, México, 16^a edición, Mc Graw Hill Interamericana, 1924-1930 pp.

Doeller J.E., Isbell T.S., Benavides G., Koenitzer J., Patel H., Patel R.P., Lancaster J.R. J (2005). Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Anal Biochem*; 341: 40–51.

Fernández A. A., Abudara V. y Morales F. R. (1999). El Óxido Nítrico como Neurotransmisor y Neuromodulador. *Actas de Fisiol*; 5: 39-77.

Ferraz, J.G., Tigley, A.W., Appleyard, C.B., Wallace J.L. (1997). TNF- α contributes to the pathogenesis of ethanol-induced gastric damage in cirrhotic rats. *Am J Physiol*; 272: G809-G814.

Fierro I. M. y Serhan C. N. (2001). Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Braz J Med Biol Res*; 34: 555-566.

[Fiorucci S.](#), [Antonelli E.](#), [Distrutti E.](#), [Rizzo G.](#), [Mencarelli A.](#), [Orlandi S.](#), [Zanardo R.](#), [Renga B.](#), [Di Sante M.](#), [Morelli A.](#), [Cirino G.](#), [Wallace J.L.](#) (2005). Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. [Gastroenterology](#); 129: 1210-1224.

Glavin G.B. y Szabo S. (1992). Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *FASEB J*; 6: 825-827.

Hawkey C. J., Wilson I., Næsdal J., Långström G., Swannell A. J., Yeomans N. D.(2002). Influence of sex and *Helicobacter pylori* on development and healing of gastroduodenal lesions in non-steroidal anti-inflammatory drug users. *Gut*; 51: 344–350

Hahne W.F.,Jensen R.T., Lemp G.F., Gardner J.D. (1981).Proglumide and benzotript: members of a different class of cholecystokinin receptor antagonists. *Proc Nat Acad Sci USA*; 78: 6304-6308.

He T., Lu T., d’Uscio L. V., Lam C., Lee H. y Katusic Z. S. (2008). Angiogenic function of prostacyclin biosynthesis in human endothelial progenitor cells. *Circ Res*; 103: 80–88.

Hersh E. V., Lally E. T. y Moore, P. A. (2005). Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray?. *Curr Med Res Opin*; 21: 1217-1226.

Houghton C.B., Cherian M.G.(1991). Effects of inhibition of cystathionase activity on glutathione and metallothionein levels in the adult rat. *J Biochem Toxicol*; 6: 221–228.

IMSS, Blanca, J.M. (2007).Comunicado No. 390, Mueren alrededor de 15 mil mexicanos al año por úlcera péptica. Coordinación de Comunicación social, 10/10/07 consulta en: http://www.imss.gob.mx/IMSS/IMSS_SITIOS/IMSS_06/prensa/Octubre+2007.htm

Jegerschöld C., Pawelzik S-C., Purhonen P., Bhakat P., Gheorghe K. R., Gyobu N., Mitsuoka K., Morgenstern R., Jakobsson P-J. y Hebert H.(2008). Structural basis for induced formation of the inflammatory mediator prostaglandin E₂. *PNAS*; 105: 11110–11115

Kasperek M. S., Linden D. R., Kreis M.E. y Sarr M.G. (2008). Gasotransmitters in the gastrointestinal tract. *Surgery*; 143: 455–459.

Kamoun P. (2001). Mental retardation in Down syndrome: a hydrogen sulfide hypothesis. *Med Hypotheses*, 57: 389–392.

Kim S.K.,g Kim Y.C. (2001). Effect of propargylglycine on synthesis of glutathione in mice. *Nutr Res*; 21: 1373–1381.

Kimura Y, Kimura H. (2004). Hydrogen sulfide neurons from oxidative stress. *FASEB J*; 18: 1165-1167

Kodama H., Hiroaki M., Keiko S. ,Shiro A. & Kazuko N.(1983). Unusual Metabolism of Sulfur-Containing Amino Acids in Rats Treated with DL-Propargylglycine. *Arch Biochem Biophys*; 225: 25-32.

Konturek S.J., Konturek P.C. y Brzozowski T. (2005). Prostaglandins and ulcer healing. *J Physiol Pharmacol*; 56: 5-31.

Lanza, F.L. (1989). A review of gastric ulcer and gastroduodenal injury in normal volunteers receiving aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Scand J Gastroenterology*; 24: 24-31.

[Laine L.](#), [Takeuchi K.](#), [Tarnawski A.](#) (2008). Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. [Gastroenterology](#); 135: 41-60.

Lehman F.S., Hildebrand P. y Beglinger C. (2003). New Molecular Targets for Treatment of Peptic Ulcer Disease, *Drugs* 63: 1785-1797.

López-Bárcena J. (2009). Fármacos útiles en el tratamiento de la enfermedad acidopéptica. En: Rodríguez R., Vidrio H., Campos E. (Eds). *Guía Farmacológica y Terapéutica*, México, 2ª edición, Mc Graw Hill; 149-153 pp.

Lowicka E. y Beltowski J. (2007). Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep*; 59: 4-24.

[Martin G.R.](#), [Wallace J.L.](#) (2006). Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. [Exp Biol Med \(Maywood\)](#); 231: 130-137.

Menguy R y Masters Y. F. (1974).Gastric Mucosal Energy Metabolism and “Stress Úlceration”. *Ann Surg*; 180: 538–546.

Medeiros J.V., Bezerra V. , Gomes A. , Barbosa A. L., Lima-Junior R. C., Soares P. M., Brito G. A., Ribeiro R., Cunha F., Souza M. H. L. (2009). Hydrogen Sulfide Prevents Ethanol-

Induced Gastric Damage in Mice: Role of ATP-Sensitive Potassium Channels and Capsaicin-Sensitive Primary Afferent Neurons. JPET; 330: 764–770.

[Medeiros J.V.](#), [Gadelha G.G.](#), [Lima S.J.](#), [Garcia J.A.](#), [Soares P.M.](#), [Santos A.A.](#), [Brito G.A.](#), [Ribeiro R.A.](#), [Souza M.H.](#) (2008). Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. [Br J Pharmacol.](#); 153: 721-727.

Muscará MN, Wallace JL. (1999). Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. Am J Physiol; 276: G1313-6.

Nishiwaki H., Takeda H., Kitagawa y Kohel H. (1989). Roles of gastric acid secretion and motility in gastric mucosal lesión formation induced by water-immersion stress in rat. Scand J. Gastroenterol; 24: 11-14.

Nirmal J., Babu C.S., Harisudhan T., Ramanathan M.(2008). Evaluation of behavioural and antioxidant activity of *Cytisus scoparius* Link in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. BMC Complement Altern Med; 8: 15.

Okabe S., Roth J.L., Pfeiffer C.J. (1971). A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats. Observations on normal healing. Am J Dig Dis; 16: 277-284.

[Overmier J.B.](#), [Murison R.](#) (1994). Differing mechanisms for proactive effects of intermittent and single shock on gastric úlceration. [Physiol Behav](#); 56: 913-919.

Page C, Curtis M, Sutter M, Walker M, Hoffman B. (1998). Farmacología integrada. Ed. Mosby Harcourt Brace, Madrid. 307-310 pp.

Peskar, B.M. (1991). Leukotrienes in mucosal damage and protection. J Physiol Pharmacol 42: 135-145.

Peskar B.M. (2001). Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense. J Physiol Pharmacol; 52: 555-568.

Pique JM, Esplugues JV, Whittle BJR (1992). Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilatation during acid secretion. *Gastroenterology*; 102: 169-174.

Qu, K., Chen, C. P. L. H., DPhil, B. H., Moore, P., K., Wong, P. T.-H. (2006). Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. *Stroke*; 37: 889-893.

Ramakrishnan K., Salinas R. (2007). Peptic ulcer disease. *American Family Physician*; 76: 1005-1012.

[Rang](#) H. P., [Dale](#) M. M., [Ritter](#) J. M. (2008). *Farmacologia*. 6ª edición, Ed. Elsevier, 848 pp.

Reiffenstein R. J., Hulbert W.C., Roth S.H. (1992). Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 32: 109–134.

Robert A., Nezamis J. E., Lancaster C., Hanchar A. J.(1979). Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology*; 77: 433-43.

Robert A., Nezamis J., Lancaster C., Davis J., Field S. y Hanchar A. (1983). Mild irritants prevent gastric necrosis through adaptive cytoprotection mediated by prostaglandins. *Am J Physiol*; 245: G113-G121.

Sales K. J. y Jabour H. N. (2003). Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium. *Reproduction*; 126: 559–567.

Schulz J.B., Lindenau J., Seyfried J. y Dichgans J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem*; 267: 4904-4911.

Shay D., Sun D. y Gruenstein M. (1954). A quantitative method for measuring spontaneous gastric secretion in the rat. *Gastroenterology*; 26: 906-917.

Shinozuka S., Tanase S., Morino Y. (1982). Metabolic consequences of affinity labeling of cystathionase and alanine aminotransferase by L-pargpylglycine in vivo. *Eur J Biochem*; 124: 377–82.

Simmons D.L., Botting R.M., Hla T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 56: 387-437.

Smith H. y Thier O. (1999). *Fisiopatología. Principios biológicos de la enfermedad. Cap. 14 Fisiopatología del tracto gastrointestinal.* 2a ed., 9a reimp. México. Ed. Mc Graw Hill. 1236 pp.

Sodeman, A. y Sodeman, M. (1988). *Fisiopatología clínica. Mecanismos de producción de los síntomas. Sección 4. 7a edición, México, D.F.* Ed. Interamericana Mc Graw Hill. 807-833 pp.

Stipanuk M.H., De la Rosa J., Hirschberger L.L. (1990). Catabolism of cysteine by rat renal cortical tubules. *J Nutr*; 120: 450–458.

Sun Q., Collins R., Huang S., Holmberg-Schiavone L., Anand G.S., Tan C., van-den-Berg S., Deng L-W., Moore P. K., Karlberg T. y Sivaraman J. (2009). Structural Basis for the Inhibition Mechanism of Human Cystathionine γ -Lyase, an Enzyme Responsible for the Production of H₂S. *J Biol Chem*; 284: 3076–3085.

[Szabo S](#), [Goldberg I](#). (1990). Experimental pathogenesis: drugs and chemical lesions in the gastric mucosa. [Scand J Gastroenterol Suppl](#); 174: 1-8.

Szabo S. (1991a). Gastroduodenal mucosal injury-acute and chronic: pathways, mediators, and mechanism. *J Clin Gastroenterol*; 13: S1-S8.

Szabo S. (1991b). Mechanism of gastric mucosal injury and protection. *J Clin Gastroenterol* 13: S21-S34.

Tahara T., Shibata T., Nakamura M., Yamashita H., Yoshioka D., Hirata I., Arisawa T. (2009). Effect of polymorphisms in the 3' untranslated region (3'-UTR) of vascular endothelial growth factor gene on gastric cancer and peptic ulcer disease in Japan. *Mol Carcinog*; jun 3.

Targownik L. E. y Thomson P. A. (2006). Gastroprotective strategies among NSAID users: Guidelines for appropriate use in chronic illness. *Can Fam Physician*; 52: 1100–1105.

Tarnawski A.S., Chai J. y Jones M. K. (2005). Esophageal and Gastrointestinal Microcirculation: Essential for Mucosal Protection, a Target for Injury, and a Critical Component of Injury and Ulcer Healing. Ishii H, *et al* (Eds), *Organ Microcirculation: A Gateway to Diagnostic and Therapeutic Interventions*, Springer, Tokyo. 49-61 pp.

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

Wallace, J., and McKnight, W. (1990). The mucoid cap over superficial gastric damage in the rat. A high-pH microenvironment dissipated by nonsteroidal antiinflammatory drugs and endothelin. *Gastroenterology*; 99: 295-304

[Wallace J.L.](#), [Granger D.N.](#) (1996). The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. [FASEB J](#); 10: 731-740.

[Wallace J.L.](#), [Dicay M.](#), [McKnight W.](#), [Martin G.R.](#) (2007). Hydrogen sulfide enhances ulcer healing rats. [JASEB J](#); 21: 4070-4076.

Washtien W., Abeles R.H. (1977). Mechanism of inactivation of gamma-cystathionase by the acetylenic substrate analogue propargylglycine. *Biochemistry*; 16: 2485–2491.

Whittle B.J.R. (1975). Gastric acidity and the mechanisms by which prostaglandins prevent indomethacin- induced gastric erosions. *Br J Pharmacol*; 55: 242P–243P.

Whittle, B.J.R. (1981). Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in the rat. *Gastroenterology*; 80: 94-98.

Wilson D. E. (1991). Role of prostaglandins in gastroduodenal mucosal protection. [J Clin Gastroenterology](#); 13: S65-S71.

Zanardo R.C., Brancaleone V., Distrutti E., Fiorucci S., Cirino G., Wallace J.L. (2006). Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J*; 20: 2118–2120.

Zhang H., Zhi L., Moore P.K., Bhatia M. (2006). Role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 290: L1193–L1201.

Zhong G., Chen F., Cheng Y., Tang C., Du J. (2003). The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase. *J Hypertens*; 21: 1879–1885.

Anexo A. Fundamento de la determinación espectrofotométrica de H₂S en una muestra

Este ensayo se basa en la producción de un compuesto azufrado estable a partir de sulfuro de hidrógeno, el cual a su vez se hace reaccionar para dar origen a un compuesto colorido.

El H₂S, que se libera del tejido a través de fragmentación mecánica o bien se encuentra disuelto en las soluciones estándar de NaSH (Figura 22 A), reacciona con acetato de zinc Zn(CH₃COO)₂ presente en exceso para formar ZnS (Figura 22B).

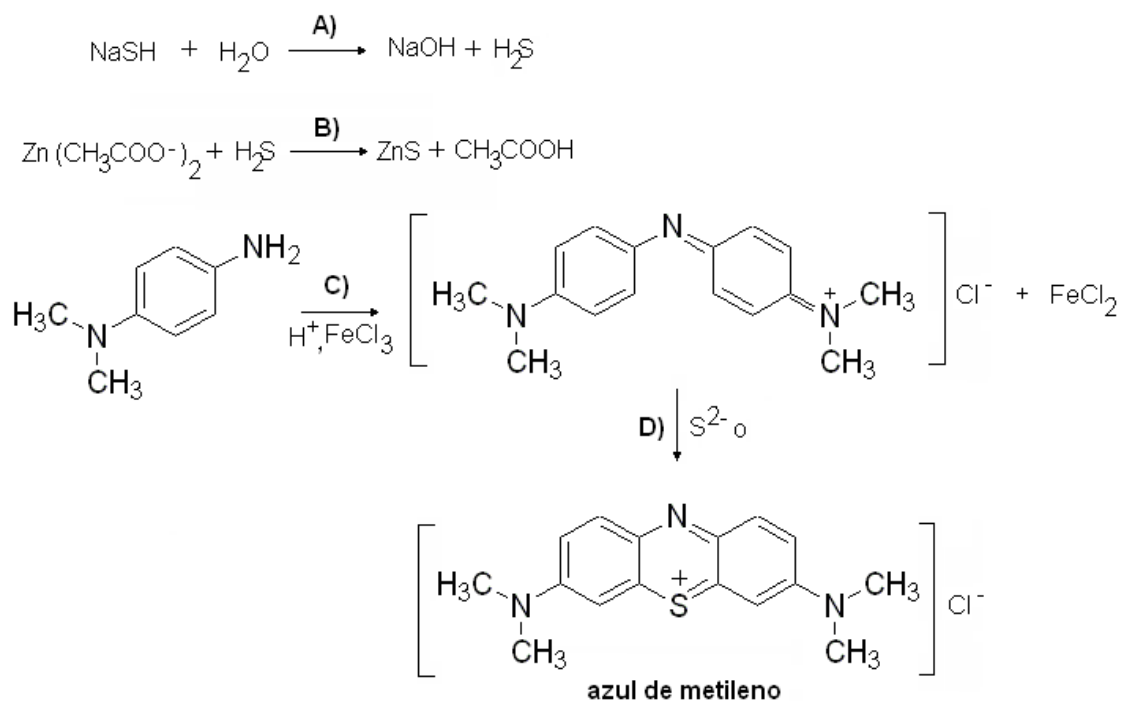


Figura 22. Reacciones involucradas en la determinación de sulfuro de hidrógeno en estómago

Posteriormente se efectuó la adición de ácido tricloroacético y la centrifugación con la finalidad de precipitar las proteínas presentes en las muestras de tejido, ya que podrían incrementar la absorbancia del ensayo.

Finalmente, a pH ácido el cloruro férrico actúa como agente oxidante sobre la *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamina generando un intermediario reactivo (Figura 22C) que reacciona con el ión sulfuro (Figura 22D) para formar el compuesto azul de metileno (Bulatov, *et al.*, 2006).

Anexo B. Fundamento de la determinación de PGE₂

La técnica ELISA (Valoración inmunoabsorbente ligada a enzimas) se basa en la determinación directa o indirecta de la cantidad de un antígeno unido a anticuerpos fijos a una placa, lo cual suele evidenciarse mediante una reacción colorimétrica.

En este caso, debido a que la PGE₂ es un compuesto muy inestable, en un primer paso se propicia la formación del metabolito estable biciclo prostaglandina E₂ (Figura 23).

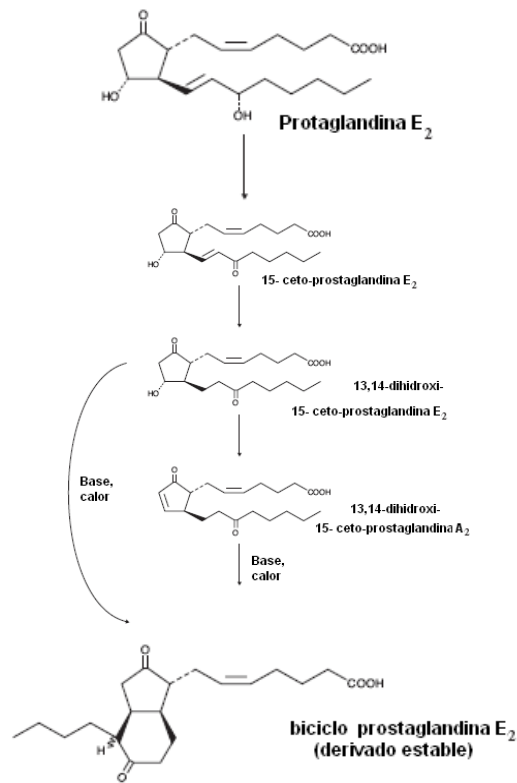


Figura 23. Formación de la biciclo prostaglandina E₂

Por otra parte, la placa base empleada tiene celdas con anticuerpo anti- IgG policlonal de cabra unido a su superficie (Figura 24. A). Cuando se adiciona la mezcla de reacción (Figura 24. B), un número limitado de anticuerpos monoclonales anti-PGE₂ van a unirse al conjugado PGE₂-Acetilcolinesterasa o bien a la PGE₂; pero también se unirán por su región Fab a los anti-IgG, de modo que el complejo queda fijo a la placa (Figura 24. C).

Posteriormente, se realizan lavados con la finalidad de eliminar los antígenos o anticuerpos que no se unieron.

Cuando se adiciona el reactivo de Ellman, que contiene acetiltiocolina y 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico), se produce una reacción enzimática catalizada por la acetilcolinesterasa y una segunda reacción que origina un producto color amarillo (Figura 24. D).

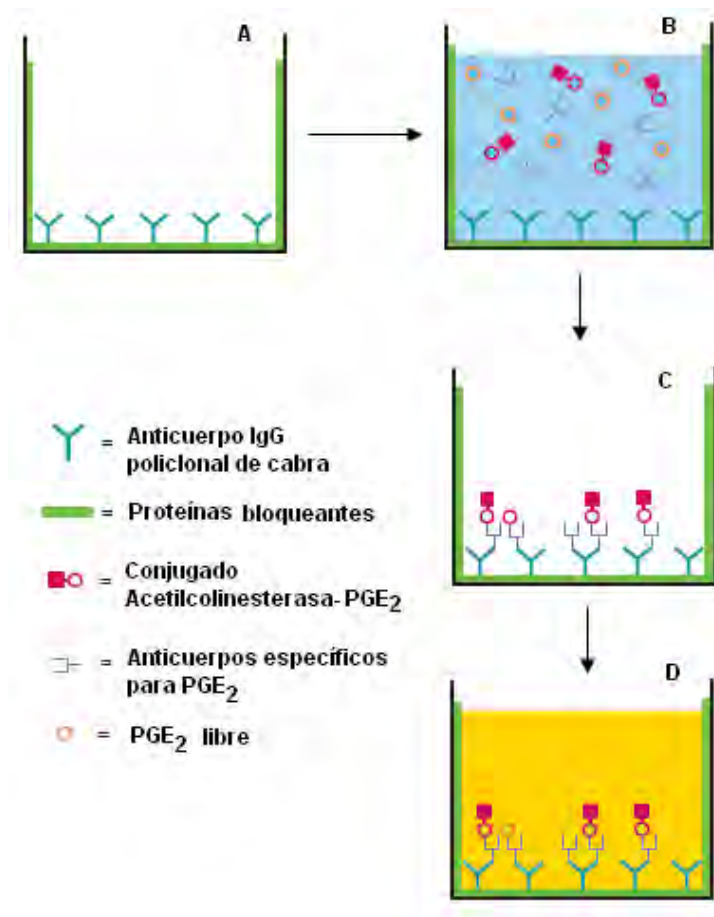


Figura 24. Pasos de la prueba de ELISA en la determinación de PGE₂

La acetiltiocolina es un sustrato para la acetilcolinesterasa, por lo que se hidroliza a acetato y tiocolina en una proporción directa con la cantidad de conjugado PGE₂ - Acetilcolinesterasa. A su vez, la tiocolina reacciona con el 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-

nitrobenzoico) para generar dos productos, uno de los cuales corresponde al ácido 5-tio-2-nitrobenzoico con una $\lambda_{\text{máx}}$ de 412nm (Figura 25).

Finalmente la determinación de PGE_2 se obtiene indirectamente como la cantidad que de PGE_2 - Anticolinesterasa que fue desplazada por la unión de PGE_2 .

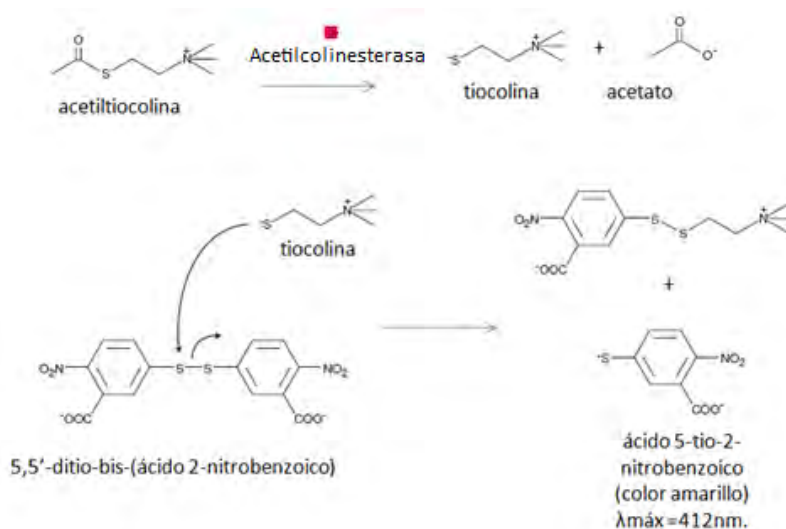


Figura 25. Reacciones debidas a la adición del reactivo de Ellman en la determinación de PGE_2