



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARACTERIZAR EL EFECTO
GASTROPROTECTOR DE GLIBENCLAMIDA
EN EL MODELO DE INDUCCIÓN DE DAÑO
GÁSTRICO CON ETANOL EN RATAS
NORMOGLICÉMICAS E HIPERGLICÉMICAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

CECILIA SOLEDAD AZAMAR GARCÍA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Andrés Navarrete Castro

VOCAL: M. en F. Ma. Martha Ugalde Hernández

SECRETARIO: Q.F.B. Irma Alejandre Razo

1er. SUPLENTE: M. en C. José Luis Trejo Miranda

2° SUPLENTE: Dra. Juana Rosado Pérez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS:

Laboratorio 126 Conjunto E. Departamento de farmacia de la facultad de química. Universidad Nacional Autónoma de México.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Andrés Navarrete Castro

ASESOR DE TESIS:

M en F. Ma. Martha Ugalde Hernández

SUSTENTANTE:

Cecilia Soledad Azamar García

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del proyecto DGAPA IN 210910, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto 82 613 y el Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP 4390-18).

Se agradece la beca otorgada por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico en la modalidad conclusión de estudios del proyecto DGAPA IN 210910

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por abrirme las puertas a una educación de calidad y alto nivel, que me ha convertido en la profesional que ahora soy.

Al **Dr. Andrés Navarrete Castro** por darme la oportunidad de participar en los proyectos del laboratorio 126 y guiarme durante esta experiencia con sus conocimientos y paciencia.

A la **M. en F. Ma Martha Ugalde Hernández** por su interés y atenciones durante mi estancia en la FES Zaragoza así como en la realización de este trabajo.

A los profesores del jurado por el tiempo prestado en la revisión de esta tesis:

Dra. Juana Rosado Pérez

QFB. Irma Alejandre Razo

M. en C. José Luis Trejo Miranda

A la **Dra. Araceli Chávez Piña** y a la **Q.F.B Gabriela Tapia** por su apoyo en el desarrollo de algunas de las técnicas analíticas de este proyecto.

Al **Dr. Héctor Isaac Rocha González** por su amabilidad, conocimientos y experiencia compartidos durante mi estancia en el laboratorio 126 de la fac. Química.UNAM

Al **Dr. Adelfo Reyes** por la síntesis de compuestos empleados para las técnicas analíticas de este trabajo.

Dedicatoria

A mi mamá **Ma. Cecilia Guillermina García Figueroa** por sus cuidados, infinito amor y paciencia brindados incansablemente, a mi padre **Ángel Azamar Herrera** por su apoyo y demostrarme que la vida es un lucha en la que nunca hay que rendirse. Lo que soy ahora, se lo debo a ustedes. Este logro es nuestro. Gracias mamá y papá.

A mis hermanos **Priscilla Azamar García** y **Ángel Azamar García** por haberme apoyado en mis momentos más difíciles, con sus consejos y ejemplo. Saben que siempre contarán conmigo.

A mis tios **Claudia Iveth García Figueroa** y **Hermes Figueroa Herrera** por su cariño y apoyo incondicional. Con su ejemplo me han demostrado que siempre se pueden pasar las dificultades estando en familia. Gracias por todo.

A **Xavier Santiago Sánchez** por su amor, confianza, apoyo y paciencia.

A mis amigas **Paloma Rebeca, Marisela, Magali, Imelda, Leticia**, por su apoyo y por los buenos momentos que compartimos.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. FUNDAMENTO TEÓRICO	3
3.1. Úlcera péptica	3
3.1.1. Definición	3
3.1.2. Epidemiología	3
3.1.3. Factores de riesgo	4
3.1.4. Sintomatología	5
3.1.5. Etiología	5
3.1.6. Co-morbilidades de importancia médica	5
3.1.6.1. Diabetes mellitus y úlcera péptica	6
3.1.7. Tratamiento	8
3.2. Mecanismos de gastroprotección	9
3.2.1. Factores funcionales	10
3.3. Modelos experimentales para el estudio de gastroprotección	17
3.3.1. Inducción de úlcera con etanol.	18
3.4. Glibenclamida	19
3.4.1. Estructura química	19
3.4.2. Actividad farmacológica	19
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS	25
6.1. General	25
6.2. Particulares	25
7. MATERIAL Y MÉTODO	26
7.1. Animales	26
7.2. Fármacos y reactivos	26
7.3. Equipo e instrumentos	26
7.4. Inducción y evaluación del daño gástrico	27

7.5. Modelo de inducción de hiperglicemia.....	27
7.6. Caracterización del efecto gastroprotector de glibenclamida en el daño gástrico inducido con etanol en ratas normoglicémicas.	28
7.7. Participación de los canales de K^+_{ATP} en el mecanismo de acción gastroprotector de glibenclamida.	29
7.8. Influencia de glibenclamida sobre mediadores endógenos de gastroprotección normoglicémicas.....	30
7.9. Caracterización del efecto de la administración de glibenclamida sobre el daño gástrico inducido con etanol en ratas hiperglicémicas.	38
7.10. Influencia de glibenclamida en mediadores de estrés oxidativo en ratas hiperglicémicas.	39
7.11. Análisis estadístico.....	40
8. RESULTADOS	41
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
10. CONCLUSIONES	51
11. PERSPECTIVAS	52
12. ANEXOS	53
A. Fundamento de la determinación espectrofotométrica de óxido nítrico.....	53
B. Fundamento de la determinación inmuno-enzimática de prostaglandina E_2	54
C. Fundamento de la determinación espectrofotométrica de sulfuro de hidrógeno ...	56
D. Fundamento de la determinación espectrofotométrica de glutatión	57
E. Fundamento de la determinación espectrofotométrica de malondialdehído.....	58
F. Fundamento de la determinación espectrofotométrica de $TNF-\alpha$	59
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 3-1. Casos anuales nuevos y tasa de incidencia de úlceras gastritis y duodenitis en México del 2000 al 2009.....	4
FIGURA 3-2. Mecanismos de gastroprotección endógenos de la mucosa gástrica.....	9
FIGURA 3-3. Estructura química de la glibenclamida	19
FIGURA 3-4. Sitios de unión en los canales K^+_{ATP} KIR6.2/SUR1 Y KIR6.2/SUR2.....	20
FIGURA 3-5. Mecanismo de acción de glibenclamida en las células beta del páncreas.	21
FIGURA 3-6. Mecanismo de acción de glibenclamida y las sustancias activadoras de los canales K^+_{ATP} sobre el tejido vascular endotelial.....	22
FIGURA 7-1. Esquema de la metodología empleada en el modelo de inducción de hiperglicemia en los animales de experimentación.....	27
FIGURA 7-2. Esquema de la metodología empleada en la caracterización del efecto gastroprotector de glibenclamida en ratas normoglicémicas con el modelo de inducción de úlcera con etanol.	28
FIGURA 7-3. Esquema de la metodología empleada en la determinación de la participación de los canales K^+_{ATP} en el mecanismo gastroprotector de glibenclamida.....	29
FIGURA 7-4. Esquema de la metodología empleada en los tratamientos de los animales de experimentación para la determinación de la influencia de glibenclamida en los mediadores endógenos de gastroprotección en animales normoglicémicos.	30
FIGURA 7-5. Diagrama de la preparación de las soluciones de la curva patrón de PGE_2	32
FIGURA 7-6. Orden y cantidades de los reactivos para la determinación de PGE_2	32
FIGURA 7-7. Asignación de la posición para cada ensayo realizado en la placa para la determinación de PGE_2	33
FIGURA 7-8. Procedimiento para la preparación de las soluciones de la curva patrón de $TNF-\alpha$	37
FIGURA 7-9. Metodología empleada para la caracterización del efecto de la administración de glibenclamida sobre el daño gástrico inducido con etanol en ratas hiperglicémicas	38

FIGURA 7-10. Metodología empleada para la determinación del efecto de glibenclamida en los mediadores de estrés oxidativo en ratas hiperglicémicas.	39
FIGURA 12-1. Reacciones involucradas en la determinación espectrofotométrica de óxido nítrico	53
FIGURA 12-2. Formación del biciclo de PGE ₂	54
FIGURA 12-3. Secuencia de pasos para la determinación por ensayo inmunoenzimático de PGE ₂	55
FIGURA 12-4. Reacciones involucradas en la determinación espectrofotométrica de sulfuro de hidrógeno	56
FIGURA 12-5. Reacciones involucradas en la determinación espectrofotométrica de glutatión.	57
FIGURA 12-6. Reacciones involucradas en la determinación espectrofotométrica de malondialdehído.	58
FIGURA 12-7. Pasos para la prueba de ELISA en la determinación del TNF- α	59

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 8-1. Efecto gastroprotector de glibenclamida en el daño gástrico inducido con etanol absoluto en ratas normoglicémicas.....	38
GRÁFICO 8-2. Efecto del pretratamiento con diazóxido de glibenclamida en el daño gástrico inducido con etanol absoluto en ratas normoglicémicas.....	39
GRÁFICO 8-3. Efecto de glibenclamida en el daño gástrico inducido con etanol absoluto en ratas tratadas con diferentes agentes hiperglicemiantes (estreptozotocina o aloxan).....	41

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 3-1. Agentes antiulcerosos empleados en el tratamiento de la úlcera péptica	8
CUADRO 8-1. Efecto de glibenclamida en la modulación de mediadores endógenos en el modelo de inducción de úlcera con etanol absoluto en ratas normoglicémicas.....	40
CUADRO 8-2. Efecto de glibenclamida en la modulación de niveles de glutatión en el modelo de inducción de úlcera con etanol absoluto en ratas tratadas con diferentes agentes hiperglicemiantes.	42
CUADRO 8-3. Efecto de glibenclamida en la modulación de niveles de malondialdehído en estómago en modelo de inducción de úlcera con etanol absoluto en ratas hiperglicémicas.	43

ABREVIATURAS Y NOTACIONES UTILIZADAS

K^+_{ATP}	Canal potasio dependiente de adenosin trifosfato
GSH	Glutación
NO	Óxido nítrico
MDA	Malondialdehído
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno
PGS	Prostaglandinas
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
SUR 1	Subunidad 1 del canal K^+_{ATP}
AINES	Fármacos analgésicos no esteroideos
CGRP	Péptido gen relacionado con calcitonina
PGE ₂	Prostaglandina E2
STZ	Estreptozotocina
ALOX	Aloxan
EIA	Ensayo inmunoenzimático
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
COX	Ciclooxigenasa
SH	Grupos sulfhidrilos
KCO	Agonista del canal K^+_{ATP}
NORMO	Normoglicémicas
HCT-3012	Fármaco experimental donador de NO
ATB-337	Derivado de diclofenaco donador de H ₂ S

1. RESUMEN

La glibenclamida es un bloqueador de los canales K^+_{ATP} empleado ampliamente en estudios sobre la participación de éstos en los mecanismos de protección endógena de la mucosa gástrica. Recientemente se ha mostrado que la glibenclamida, además de antagonizar los efectos gastroprotectores de algunos agentes antiulcerosos también posee propiedades protectoras de la mucosa cuando se administra en dosis altas.

En este trabajo de investigación se realizó la caracterización del efecto gastroprotector de la glibenclamida, además de la investigación sobre la participación de los canales K^+_{ATP} y mediadores endógenos de gastroprotección, en su mecanismo de acción gastroprotector, en el modelo de inducción de úlcera con etanol en ratas normoglicémicas. Así mismo se evaluó si la glibenclamida ejercía actividad gastroprotectora ó modulaba a los mediadores endógenos de estrés oxidativo en el modelo de inducción de úlcera con etanol en ratas con hiperglucemia inducida por aloxan ó estreptozotocina.

Para evaluar la actividad gastroprotectora se calculó el índice de úlcera. El mecanismo de acción gastroprotector se determinó mediante la evaluación del antagonismo farmacológico entre la glibenclamida (bloqueador de los canales K^+_{ATP}) y el diazóxido (activador de los canales K^+_{ATP}), además se realizó la cuantificación de los mediadores endógenos gastroprotectores por métodos analíticos.

Los resultados mostraron que la glibenclamida presentó actividad gastroprotectora significativa en el modelo de inducción de úlcera con etanol en ratas Wistar macho normoglicémicas. Dicho efecto está relacionado con la regulación de los mediadores endógenos prostaglandina E_2 (PGE_2), óxido nítrico (NO), sulfuro de hidrógeno (H_2S) y glutatión (GSH); pero no con los canales de K^+_{ATP} ni con la regulación del malondialdehído (MDA) y factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$). Por otra parte, se encontró que la glibenclamida no presenta actividad gastroprotectora ni moduladora de los mediadores de glutatión y malondialdehído en ninguno de los modelos de hiperglicemia empleados.

Cabe destacar que el presente estudio es el primero en demostrar este nuevo efecto gastroprotector de la glibenclamida en animales normoglicémicos. Sin embargo, se requiere de más estudios para elucidar el blanco farmacológico responsable de la actividad gastroprotectora de la glibenclamida.

2. INTRODUCCIÓN

La úlcera péptica representa un problema de salud que va en aumento en la población mundial debido al uso indiscriminado de fármacos analgésicos no esteroideos (AINES), estilos de vida no saludables y el aumento en la infección por *Helicobacter pylori*. En nuestro país este padecimiento ocupó el primer lugar en morbilidades no transmisibles durante el 2009 (Secretaría de Salud, 2011). Es por ello que se siguen haciendo esfuerzos en la investigación de los mecanismos de gastroprotección endógenos, con la finalidad de ayudar en el desarrollo de nuevos tratamientos antiulcerosos.

Al respecto se han realizado diversos estudios sobre la participación de los canales K^+_{ATP} en los mecanismos de gastroprotección endógenos, para lo cual es empleada la glibenclamida como bloqueador de los canales K^+_{ATP} de la microcirculación gástrica. Los resultados de estos estudios muestran que la glibenclamida presenta un rol paradójico, ya que por un lado ha antagonizado el efecto protector de algunos agentes antiulcerosos, pero también posee actividad gastroprotectora cuando se administra en dosis altas (Peskar *et al.*, 2002; Akar *et al.*, 1999). Con base en estos antecedentes se planteó la presente investigación que tiene la finalidad de determinar el papel que juega la glibenclamida como protector de la mucosa gástrica de animales normoglicémicos e hiperglicémicos, del cual no se tiene precedente.

En el presente trabajo se propuso realizar la caracterización del efecto de la glibenclamida sobre el daño inducido con etanol en ratas Wistar normoglicémicas y ratas Wistar tratadas con un modelo de hiperglicemia inducida con aloxan o estreptozotocina. Además investigar si en su mecanismo de acción gastroprotector están involucrados los canales de K^+_{ATP} y la regulación de algunos mediadores endógenos protectores de la mucosa en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1. Úlcera péptica

3.1.1. Definición

La úlcera péptica es una patología del tracto gastrointestinal superior, caracterizada por daño o lesión en la pared gástrica ó duodenal, que penetra más allá de la capa *muscularis mucosae*, cicatriza con tejido de granulación y endoscópicamente es mayor de 5 mm. Es secundaria a la secreción de pepsina y ácido gástrico, lo cual ocurre principalmente en el estómago y el duodeno proximal (CENETEC, 2008).

La prevalencia de las úlceras es cinco veces mayor en el duodeno, principalmente en el bulbo pilórico. Mientras que en el estómago se localizan comúnmente en el antro (60%) (McQuaid, 2012).

3.1.2. Epidemiología

La prevalencia de trastornos gastrointestinales en estudios basados en la población mundial, muestran que hasta un tercio de los adultos del mundo occidental se reportan con dispepsia. La prevalencia de úlcera péptica con síntomas gastrointestinales se reporta de 10 a 20%, pero su prevalencia real en la población general se desconoce (CENETEC, 2008).

Aproximadamente 25 millones de personas en Estados Unidos han padecido enfermedad ulcerosa durante su vida. Cada año se reportan en Estados Unidos de 500,000 a 850,000 casos nuevos de úlcera péptica y cuatro millones de casos de recurrencias. El 70% de los pacientes se encuentran entre los 25 y 64 años (CENETEC, 2008). Las complicaciones de la enfermedad ulcerosa péptica son fatales en aproximadamente 6,500 personas al año (CENETEC, 2008).

El costo directo e indirecto por cuidados del paciente y pérdidas productivas se estiman en 5.65 miles de millones de dólares al año (CENETEC, 2008).

En México, el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) reporta que los casos nuevos de úlcera péptica, gastritis y duodenitis van en aumento (Figura 3-1). En 2009 estos padecimientos ocuparon el primer lugar en morbilidad entre las enfermedades no transmisibles a nivel nacional, al reportarse 1 557 315 casos nuevos con una incidencia de 1 781 casos por 100 000 habitantes de 10 años o más (Secretaría de Salud, 2011).

De acuerdo al Instituto Mexicano de Seguridad Social, el 20% de la población mayor de 50 años presenta este padecimiento, ocasionando del 45 al 50% de los casos de hemorragia del tubo digestivo alto en México (IMSS, 2010).

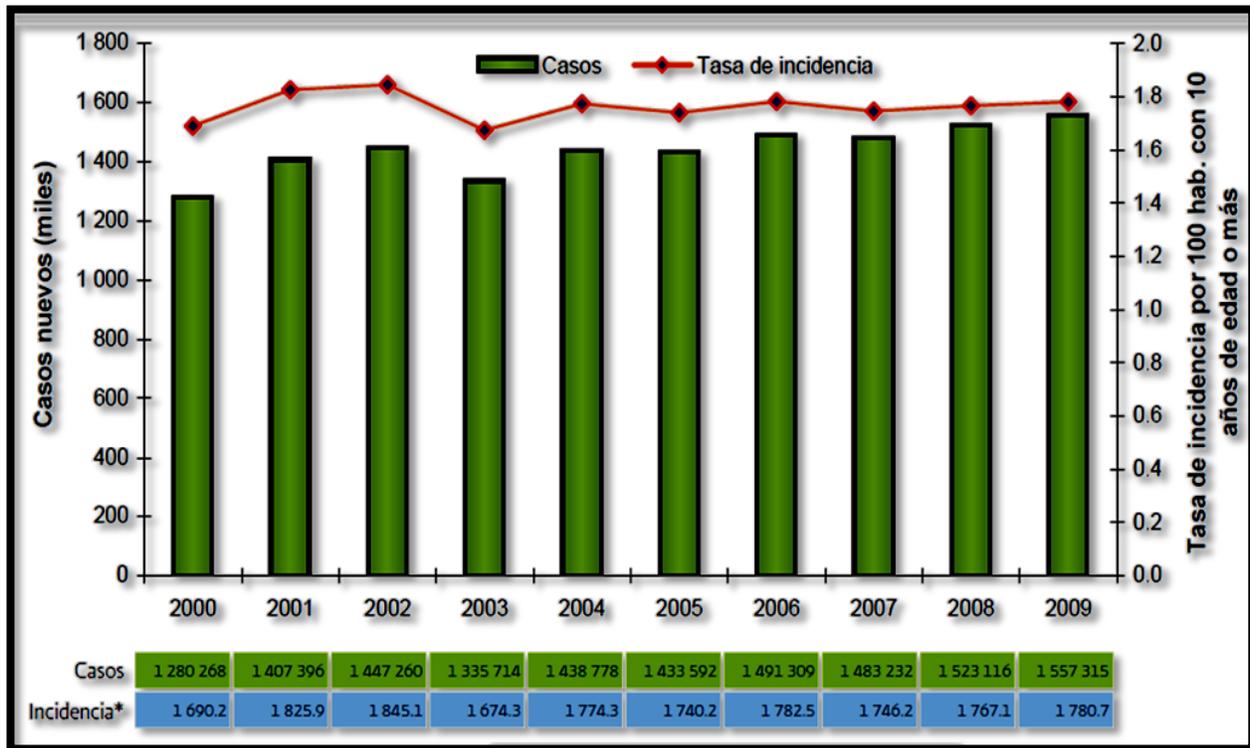


Figura 3-1. Casos anuales nuevos y tasa de incidencia de úlceras, gastritis y duodenitis en México del 2000 al 2009 (CENETEC, 2008).

3.1.3. Factores de riesgo

La edad, el género, la historia personal y/o familiar de úlcera, los estilos de vida no saludables, los trastornos de ansiedad, el uso crónico (incluso a dosis bajas) de AINES y la infección por *H. pylori* han sido asociados con la úlcera péptica y sus complicaciones (Kellow, 2001; Goodwin y Murray, 2002).

En este respecto también se ha demostrado que el tabaquismo incrementa el riesgo de recurrencia de úlceras y enlentece la cicatrización (Kurata y Nogawa, 1997). La nicotina empeora los efectos deletéreos de los factores agresivos y atenúa las acciones protectoras de factores defensivos en el proceso de desarrollo y reparación de úlceras gástricas. Así mismo también toma parte en la iniciación y promoción de carcinogénesis en el tracto gastrointestinal (Wu y Cho, 2004).

3.1.4. Sintomatología

Los síntomas típicos de la enfermedad ulcerosa péptica incluyen sensación ardorosa o dolor epigástrico quemante. El dolor aparece de dos a cinco horas después de la ingesta de los alimentos o en ayuno, el dolor nocturno se alivia por alimentos, antiácidos o agentes anti-secretorios (Kalyanakrishnan y Salinas, 2007).

En úlceras gástricas no complicadas el vómito significativo y la pérdida de peso son inusuales, por lo que sugieren una obstrucción gástrica (McQuaid, 2012).

3.1.5. Etiología

Los dos principales factores etiológicos de enfermedad ulcerosa son: uso crónico de AINES y la infección por *H. pylori* (McQuaid, 2012). Tanto la infección por *H. pylori* como el uso de AINES rompen las defensas y la capacidad de reparación de la mucosa normal, ocasionando que la mucosa se vuelva más susceptible al ácido gástrico (Del Valle, 2012).

Otras causas pueden ser problemas con los factores defensivos de la mucosa, anomalías en la presión del esfínter pilórico en reposo y un incremento en el reflujo gástrico duodenal (Del Valle, 2012).

Son pocos los pacientes que presentan un estado subyacente de hipersecreción ácida que ocasiona úlceras. Por ejemplo, menos del 1% de los pacientes con úlceras duodenales tienen un tumor que estimula la secreción de gastrina, produciendo una secreción de ácido profunda como parte del síndrome de Zollinger-Ellison (Del Valle, 2012).

3.1.6. Co-morbilidades de importancia médica

En padecimientos críticos como quemaduras severas, traumas físicos, falla múltiple de órganos, enfermedad de Crohn, hiperparatiroidismo, tuberculosis, sarcoidosis e infección por citomegalovirus y herpes simple (especialmente en pacientes inmunosuprimidos) se ha observado un incremento en el riesgo de desarrollar úlceras gastroduodenales y sus complicaciones (Chan y Leung, 2002; Lew, 2009).

Otra enfermedad crónica que recientemente se ha asociado a úlcera péptica es la diabetes mellitus. Lo cual se demuestra con el creciente aumento en los reportes al respecto (Boehme *et al.*, 2007; Pietzsch *et al.*, 2002; Quatrini *et al.*, 2001).

3.1.6.1. Diabetes mellitus y úlcera péptica

La diabetes es una enfermedad metabólica caracterizada por el aumento de los niveles de glucosa en sangre (conocido médicamente como hiperglicemia) resultante de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina, o ambas; que conducirán posteriormente a alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas (American association of diabetes, 2011).

El estado hiperglicémico de la diabetes puede estar presente por un periodo largo de tiempo antes de que ésta sea detectada, ya que no se presentan síntomas clínicos. Sin embargo ese grado de hiperglicemia es suficiente para causar cambios patológicos y funcionales en varios tejidos blanco (Kahn *et al.*, 2006).

La hiperglicemia ocasiona diferentes alteraciones debido a que favorece el aumento del estrés oxidativo del organismo mediante diferentes mecanismos (Giacco y Brownlee, 2010; Maritim *et al.*, 2003). Por una parte la oxidación de la glucosa promueve la generación de radicales libres (Jiang *et al.*, 1990), se promueve la lipido peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Kawamura *et al.*, 1994), se forman productos finales de glicación avanzada (AGEs) (Brownlee, 2001) y se activa el factor de transcripción pleotrópico (factor nuclear Kappa B (NF kB)) ocasionando múltiples cambios patológicos en la expresión genética (Goldin *et al.*, 2006).

Además también se impacta en el sistema de defensa endógeno antioxidante, mediante la marcada disminución de glutatión (Saxena *et al.*, 1993). Es por ello que el estado diabético favorece el desarrollo de patologías microvasculares específicas en la retina, glomérulos renales, el nervio periférico y tejido vascular. Como consecuencia de esta patología microvascular, se producen una gran variedad de trastornos en diferentes órganos del organismo (Brownlee, 2001).

En el estómago la hiperglicemia ocasiona anormalidades como disritmias gástricas (Koch *et al.*, 1989; Abell *et al.*, 1991; Rothstein *et al.*, 1993), dilatación antral (Undeland *et al.*, 1996), hipomotilidad antral (Abell *et al.*, 1991; Malagelada *et al.*, 1980), gastroparesis (Koch *et al.*, 1989; Lin y Hasler 1995), cambios de la contractilidad gástrica, del tono y actividad mioeléctrica (Koch K, 1999). Estos problemas viscerales ocasionan una reducción en la percepción de síntomas típicos de alteraciones gastrointestinales. Lo cual lleva a la alta prevalencia de pacientes con diabetes mellitus que presentan inflamación severa gástrica aguda, úlcera péptica con poca o sin sintomatología alguna (Boehme *et al.*, 2007).

Se ha observado que las úlceras gástricas presentes en el estado diabético están caracterizadas por un aumento en la severidad de las lesiones y están usualmente asociadas a complicaciones (Pietzsch *et al.*, 2002). En este respecto las investigaciones en modelos animales insulino-dependientes han mostrado que existe un incremento en la vulnerabilidad de la mucosa gástrica ante la administración de varios agentes ulcerogénicos (isquemia-reperfusión, estrés, AINES) (Takehara *et al.*, 1997; Takeuchi *et al.*, 1997; Tashima *et al.*, 1998). El mecanismo que produce este incremento en la susceptibilidad del daño incluye una falla del sistema antioxidante en la mucosa gástrica (Goldin *et al.*, 1997), afectación de la secreción duodenal de HCO_3^- (Takehara *et al.*, 1997), supresión del factor básico de crecimiento fibroblástico (Takeuchi *et al.*, 1997), así como la disminución de la respuesta angiogénica y la disfunción de las neuronas aferentes sensibles a capsaicina de la mucosa gástrica (Tashima *et al.*, 1998).

Adicionalmente se ha observado la disminución en la capacidad de curación de las úlceras pépticas en el estado diabético. Este fenómeno está relacionado con la reducción de la circulación gástrica alrededor de la úlcera, involucrando un incremento en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$), la afectación en la generación de las prostaglandinas E_2 de la mucosa y la liberación de óxido nítrico en el lumen gástrico (Brzozowski *et al.*, 2004). Ésta disminución en la concentración de óxido nítrico también contribuye a la disfunción vascular observada en la diabetes mellitus (De la Cruz *et al.*, 2002).

Con base en lo anterior, las investigaciones actuales se han enfocado en la búsqueda de sustancias que exhiban propiedades gastroprotectoras en modelos de diabetes experimental. Recientemente Morsy *et al.*, 2010 demostraron que las sustancias antidiabéticas metformina y rosiglitazona poseen actividad gastroprotectora en el modelo de inducción de úlcera con indometacina.

El efecto gastroprotector de ambos fármacos fue relacionado con sus propiedades antisecretoras (disminución de la cantidad total de ácido en el jugo gástrico), fortalecimiento de los factores de defensa gástrica (incremento de la concentración de mucina en el jugo gástrico) y actividad antioxidante (reducción de los niveles de MDA, incremento en las concentraciones de óxido nítrico e incremento de la actividad de la catalasa). La evidencia de los efectos gastroprotectores de rosiglitazona y metformina puede ser de gran valor en pacientes diabéticos que tienen mayor susceptibilidad al desarrollo de úlceras gástricas (Morsy *et al.*, 2010).

3.1.7. Tratamiento

El tratamiento y la prevención de las úlceras pépticas están relacionados con la disminución de la acidez gástrica y el fortalecimiento de los factores de defensa de la mucosa. Además dado que el agente infeccioso *H. pylori* juega un papel importante en la patogénesis de ésta enfermedad, su erradicación del estómago es considerada dentro de los esquemas actuales de tratamiento (Lew, 2009).

Los agentes farmacológicos antiulcerosos más comúnmente empleados en los tratamientos de la úlcera péptica, pueden dividirse en tres categorías: (1) los agentes antisecretores de ácido, (2) agentes protectores de la mucosa, (3) agentes que promueven la curación a través de la erradicación de *H.pylori* (Lew, 2009). Las características de éstos fármacos se describen en el siguiente Cuadro 3-1.

Cuadro 3-1. Agentes antiulcerosos empleados en el tratamiento de la úlcera péptica (modificado de Malfertheiner *et al.*, 2009)

TIPO DE FÁRMACO	MECANISMO DE ACCIÓN	USOS
Antisecretores de ácido		
Antagonistas del receptor H ₂ : Ranitidina, famotidina, nizatidina, roxatidina.	Inhibición en la secreción del ácido.	<ul style="list-style-type: none"> •Úlcera péptica- no relacionada con <i>H.pylori</i> •Remplazo de los IBP
Inhibidores de la bomba de protones (IBP): Omeprazol, pantoprazol, lansoprazol, rabeprazol, esomeprazol	Inhibidor de la secreción de ácido, acción muy potente.	<ul style="list-style-type: none"> •Tratamiento de primera elección para úlcera péptica-no relacionada con <i>H.pylori</i> •Prevención de las úlceras por AINES •Componente esencial del régimen de erradicación de <i>H.pylori</i> •Se da de manera IV en las úlceras sangrantes
Agentes protectores de la mucosa		
Sucrafalto, sales de bismuto y análogos de prostaglandinas (Misoprostol)	Incrementan la resistencia de la mucosa, estimulan la producción de prostaglandinas en la mucosa gástrica.	<ul style="list-style-type: none"> *Úlcera péptica- no relacionada con <i>H.pylori</i> *Prevención de las úlceras por AINES *En la terapia cuádruple de erradicación de <i>H.pylori</i>
Agentes que erradican la infección por <i>H.pylori</i>		
Terapias combinadas de inhibidores de la bomba de protones y 2 antibióticos (claritromicina y metronidazol)	Eliminación de la infección por <i>H.pylori</i> . Disminución de los síntomas.	*úlceras pépticas relacionadas con <i>H.pylori</i>

3.2. Mecanismos de gastroprotección

El término gastroprotección se atribuye a la habilidad del tejido gástrico de prevenir una lesión. Los mecanismos de defensa de la mucosa gastrointestinal consisten principalmente en factores funcionales, humorales y neuronales. Las secreciones mucoc-alcalinas, la barrera fosfolipídica, la microcirculación y la motilidad representan a los factores funcionales. Las prostaglandinas (PGs), el óxido nítrico, el sulfuro de hidrógeno y el glutatión actúan como los factores humorales y las neuronas sensibles a capsaicina funcionan como factores neuronales (Fiorucci *et al.*, 2005; Tsukimi y Okabe, 2001; Wallace y Granger, 1996; Szabo, 1984) (Ver Figura 3-2).

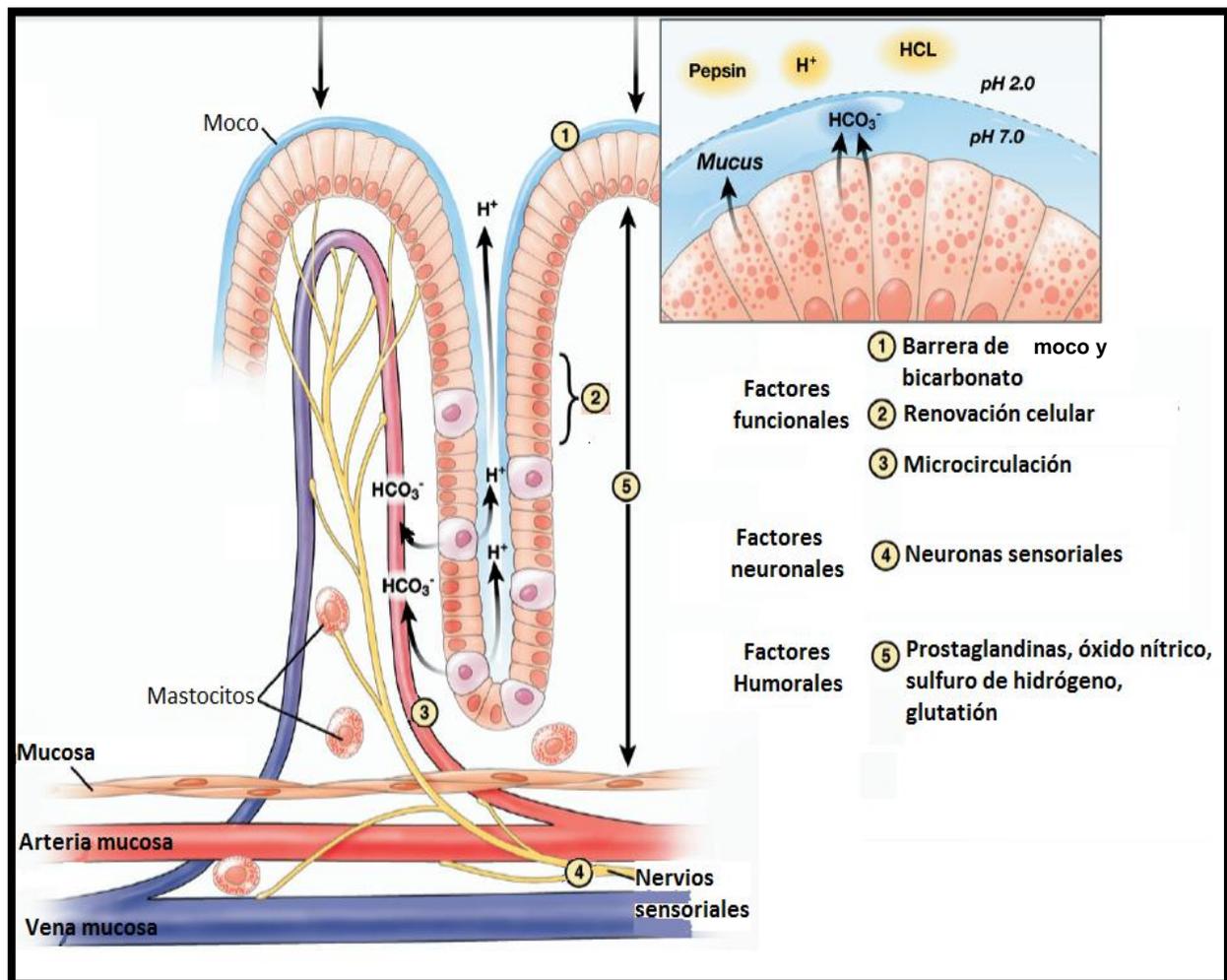


Figura 3-2. Mecanismos de gastroprotección endógenos de la mucosa gástrica (modificado de Laine *et al.*, 2008).

3.2.1. Factores funcionales

3.2.1.1. Barrera moco-bicarbonato-fosfolípidos

La primera línea de defensa de la mucosa gástrica esta constituida por la denominada “barrera” moco-bicarbonato-fosfolípidos. Esta barrera esta formada por gel mucoso, bicarbonato y fosfolípidos surfactantes que cubren la superficie de la mucosa (Laine *et al.*, 2008). El gel mucoso y el bicarbonato son secretados por expulsión apical de la superficie de las células epiteliales (Allen y Flemstrom, 2005; Atuma *et al.*, 2001), ahí mismo son combinados con fosfolípidos surfactantes con fuertes propiedades hidrofóbicas (Allen y Flemstrom, 2005).

La barrera moco-bicarbonato-fosfolípidos evita la permeación de ácido dentro del epitelio gástrico y neutraliza el ácido luminal. Sin embargo *H. pylori* es capaz de dañar la capa de moco con el consecuente descenso del pH en el epitelio (Henriksnas *et al.*, 2006). Irritantes exógenos exhiben la habilidad de disminuir el pH y la secreción de moco, induciendo daño mediante este mecanismo (Chávez-Piña y Navarrete, 2009). Cuando la barrera mucosa alcalina es sobrecargada o se rompe por un daño, existen otros mecanismos que pueden presentarse para la defensa de la mucosa (Chávez-Piña y Navarrete, 2009).

3.2.1.2. Epitelio de la mucosa

La capa continua de células epiteliales superficiales de la mucosa es considerada como la siguiente línea de defensa de la mucosa gástrica. Las uniones entre las células epiteliales superficiales favorecen la formación de una barrera que evita la permeación del ácido y la pépsina (Laine *et al.*, 2008).

Adicionalmente el epitelio es regenerado continuamente mediante un proceso de proliferación celular a partir de células progenitoras. Este proceso permite el remplazo de células epiteliales dañadas o adultas. El remplazo completo del epitelio superficial de la mucosa se realiza en un lapso de tiempo de entre 3 y 7 días (Wallace y Granger, 1996). La proliferación celular de las células progenitoras es controlada por los factores de crecimiento. El receptor principal expresado en las células progenitoras gástricas es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), las principales sustancias que activan a este receptor son el factor transformador de crecimiento alfa (TGF- α) y el factor-1 de crecimiento parecido a la insulina (Tarnawski *et al.*, 1992).

La reconstitución de la superficie del epitelio después de un daño superficial se produce en minutos, mediante la migración de las células epiteliales localizadas en el área del cuello de las glándulas gástricas. Esta migración se lleva a cabo independientemente de la proliferación celular de las células progenitoras, la cual ocurre horas después de inducido el daño (Laine *et al.*, 2008).

3.2.1.3. Microcirculación de la mucosa

La microcirculación de la mucosa es esencial para la entrega de nutrientes y oxígeno además de remoción de sustancias tóxicas. En el nivel de la *muscularis mucosae* la mayoría de las arterias gástricas se ramifican en capilares que entran en la lámina propia y siguen hacia la proximidad de las células epiteliales glandulares. En la base de las células epiteliales de superficie, los capilares convergen en vénulas colectoras (Ganong *et al.*, 1984).

Cuando el ácido u otros irritantes entran en el compartimento subepitelial, las neuronas sensitivas aferentes son capaces de disparar un rápido incremento en el flujo sanguíneo de la mucosa que permita amortiguar el ácido y remueva rápidamente las sustancias tóxicas, limitando así la penetración del daño dentro de las capas profundas de la mucosa (Wallace y Granger, 1996).

Con base en lo anterior, mantener el flujo sanguíneo de la mucosa juega un papel importante en la defensa de la mucosa gástrica (Tanaka y Guth, 1994).

En este respecto los canales K^+_{ATP} juegan un papel importante en la modulación del flujo sanguíneo gástrico, ya que varias sustancias endógenas actúan a través de ellos para incrementar el flujo sanguíneo. Se ha demostrado que los canales K^+_{ATP} son modulados por las neuronas primarias aferentes (Iwata *et al.*, 1997), el péptido gene-relacionado con calcitonina (CGRP), óxido nítrico (Nelson *et al.*, 1990; Murphy y Brayden, 1995; Dart y Standen, 1993), sulfuro de hidrógeno (Tang *et al.*, 2010) y prostaglandinas (Peskar *et al.*, 2002).

La activación del canal K^+_{ATP} por el óxido nítrico esta relacionado con la vía NO/cGMP/ K^+_{ATP} . Ésta regula el tono vascular y la función plaquetaria en el sistema cardiovascular (Al-Shabanah *et al.*, 2000). El óxido nítrico activa a la guanilato ciclasa para incrementar los niveles de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) lo cual lleva a la activación del canal en la microcirculación gástrica. Esta vía es un mecanismo de acción gastroprotector para sustancias como el sildenafil (Medeiros *et al.*, 2008) y la carbenoxolona (Chávez-Piña *et al.*, 2011).

El sulfuro de hidrógeno activa a los canales K^+_{ATP} en el músculo liso, cardiomiocitos, neuronas y tejido vascular del sistema gastrointestinal (Tang *et al.*, 2010); mediante una interacción directa con los residuos extracelulares de cisteína de las subunidades SUR1 (Jiang *et al.*, 1990), lo cual ocasiona una vasodilatación de los tejidos vasculares. Estas propiedades relajantes son endotelio-dependientes y pueden ser mediadas por la liberación de NO ó el factor de hiperpolarización derivado del endotelio (EDHF) (Zhao *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2004).

El CGRP que es liberado por las neuronas aferentes sensibles a capasaicina, medía el incremento del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica (GMBF) (Li *et al.*, 1992). El CRGP incrementa el GMBF, en parte mediante la activación de los canales K^+_{ATP} en el tejido vascular gástrico (Doi *et al.*, 1998).

Adicionalmente diversas investigaciones muestran que el diazoxido y la cromakalima ejercen efectos protectores de la mucosa en el modelo de inducción de úlcera con indometacina (Pazoki-Toroudi *et al.*, 1999). Esto debido a que promueven la relajación de las arterias gástricas, estando relacionados con la activación del canal de K^+_{ATP} . Por lo que los efectos dilatores de la cromakalima y del diazoxido en las arterias gástricas pueden contribuir a su efecto gastroprotector al incrementar la perfusión gástrica.

Así mismo se ha determinado que la activación de los canales K^+_{ATP} puede ofrecer un mecanismo protector durante el proceso de daño mediante la inhibición de la activación de los leucocitos polimorfonucleares con su subsecuente producción de superperóxidos (Akar *et al.*, 1999).

3.2.1.4. Motilidad

Una motilidad gástrica normal se ha relacionado con la defensa de la mucosa gástrica. Se ha visto que los AINES inducen daño gástrico en parte por aumentar la motilidad gástrica. Esta hipermotilidad gástrica provocada por los AINES está asociada con una deficiencia en prostaglandinas causada por la inhibición de COX-1 (Wallace *et al.*, 1998). Se ha propuesto que la patogenicidad de la hipermotilidad gástrica está relacionada con una disminución del flujo sanguíneo gástrico (Chávez-Piña y Navarrete, 2009). Es por ello que los glucocorticoides ofrecen gastroprotección mediante su efecto de mantener la homeostasis de la glucosa, el flujo sanguíneo gástrico, secreción de moco, la atenuación de una motilidad gástrica alterada y la permeabilidad microvascular (Filaretova *et al.*, 2007).

3.2.2. Factores neuronales

El sistema nervioso entérico (SNE) es una red de neuronas en el tracto gastrointestinal que constituyen el “cerebro del intestino”, las cuales funcionan de manera independiente del sistema nervioso central. El SNE controla la motilidad, las secreciones endocrinas-exocrinas y la microcirculación del estómago. Además de la regulación de procesos inflamatorios e inmunes gastrointestinales (Goyal y Hirano, 1996).

La mucosa gástrica está inervada por las neuronas sensoriales aferentes que se localizan dentro de la lámina propia debajo de las células epiteliales. Estas neuronas conforman un plexo denso en la base de la mucosa. Sus funciones incluyen detectar cambios en el contenido luminal y la entrada ó salida de ácido dentro de la mucosa gástrica. Además su estimulación directa permite la liberación de neurotransmisores como acetilcolina, noradrenalina (norepinefrina), 5-hidroxitriptamina, purinas, óxido nítrico y gran variedad péptidos activos farmacológicamente como el péptido liberador-gastrina (GRP), polipéptido vasoactivo intestinal (VIP), polipéptido activador-adenilato ciclasa (PACAP), CGRP y sustancia P (Schubert y Peura, 2008; Rang y Dale, 2008), los cuales afectan el tono de las arterias que regulan el flujo sanguíneo de la mucosa (Chávez-Piña y Navarrete, 2009).

Siendo así que cuando la barrera de la mucosa gástrica es alterada, un incremento de ácido en la lámina propia es la señal para que las neuronas aferentes activen al CGRP para inducir la síntesis de óxido nítrico y por consiguiente incrementar el flujo sanguíneo gástrico y la secreción de bicarbonato (Holzer, 2007).

La interferencia con cualquier aspecto de la inervación sensorial, como la afectación de los nervios sensoriales aferentes con capsaicina, perjudica la respuesta hiperémica y por consiguiente disminuye la resistencia de la mucosa gástrica (Chávez-Piña y Navarrete, 2009).

3.2.3. Factores humorales

3.2.3.1. Prostaglandinas

Las prostaglandinas son eicosanoides (cadena de 20 átomos de carbono y un anillo de 5 átomos de carbono) sintetizados a partir del ácido araquidónico (Serhan, 2001). Las prostaglandinas están divididas en series que difieren en la sustitución del oxígeno del anillo ciclopentano, lo cual es codificado mediante una letra (PGD, PGE, PGF, PGG y PGH). El número subíndice en la nomenclatura PG indica el número de enlaces dobles presentes en el compuesto (Serhan, 2001). Las prostaglandinas generalmente actúan de manera autocrina o paracrina y tienen vidas medias muy cortas (segundos a minutos) en la circulación (Chávez-Piña y Navarrete, 2009).

Para la síntesis de las prostaglandinas se requiere de un estímulo (epinefrina, trombina y bradisinina) que active a la fosfolipasa A₂, la cual hidroliza al ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana celular. Posteriormente el ácido araquidónico es metabolizado por un complejo enzimático llamado PG sintetasa de localización microsomal, compuesto de una serie de enzimas con actividades ciclooxigenasa, peroxidasa, sintasa e isomerasa (Wilson, 1991).

La enzima más importante para la biosíntesis de prostaglandinas es la ciclooxigenasa (COX), ya que corresponde al paso limitante de la velocidad en la síntesis de las prostaglandinas (Wilson, 1991). De la COX se conocen dos principales isoenzimas la COX-1 y COX-2 que participan en la síntesis de diferentes tipos de prostaglandinas (Li *et al.*, 1998). Del intermediario PGH_2 se obtienen productos biológicamente activos como tromboxano (TXA_2), prostaciclina (PGI_2), PGD_2 , PGE_2 y $\text{PGF}_{1\alpha}$, por la acción de tromboxano sintasa, prostaciclina sintasa, PGD_2 isomerasa, PGE_2 isomerasa y PGF reductasa respectivamente. Cabe resaltar que la síntesis de cada tipo de prostaglandina depende del tipo de célula y la enzima presente en cada tejido (Chávez-Piña y Navarrete, 2009).

En el tejido gástrico las prostaglandinas que derivan de COX-1 participan en muchos de sus componentes de defensa. PGI_2 interviene en el aumento del flujo sanguíneo gástrico, mientras que PGE_2 regula la secreción de moco y bicarbonato. Adicionalmente también retardan la habilidad del ácido y la pepsina para penetrar la mucosa (Wallace y Granger 1996, Wallace y Devchand, 2005).

Cuando COX-1 es inhibida por el daño de agentes químicos, se induce la expresión positiva de COX-2 para proteger o reparar el daño gástrico. Las PGs provenientes de COX-2 inhiben la adherencia leucocitaria e incrementan la proliferación del epitelio (Wallace y Devchand, 2005). Es por ello que COX-2 es expresada potentemente en las células del margen de la úlcera, que es donde la proliferación primaria epitelial da a lugar, permitiendo el restablecimiento de las glándulas. Además también es expresada en las células endoteliales de la base de la úlcera, donde comienza el crecimiento de las nuevas vénulas (angiogénesis) (Mizuno *et al.*, 1997).

Esta regulación entre las isoformas de COX representan un importante mecanismo de defensa de la mucosa por lo que sólo en ausencia de ambas isoformas se desarrollan erosiones gástricas (Warner *et al.*, 1999; Wallace *et al.*, 2000).

3.2.3.2. Óxido nítrico

El NO es una molécula pequeña sintetizada a partir del átomo de nitrógeno terminal de la guanidina de L-arginina. Esta síntesis se lleva a cabo por óxido nítrico sintasa (NOS) a través de una reacción de oxidación de cinco electrones usando diversos cofactores (mononucleotido flavino, dinucleotido adenino flavino, tetrahidrobiopterino y hemo protoporfirino IX). Hay tres isoformas de NOS diferentes, dos de ellas son enzimas constitutivas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina (cNOS): neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS). La tercera enzima es inducible (iNOS) y Ca^{2+} independiente. Ésta última se induce por la exposición a citoquinas y lipopolisacáridos en varios tipos de células como las células inflamatorias (Calatayud *et al.*, 2001).

En diversos estudios el NO ha mostrado poseer propiedades relajantes en el endotelio vascular. En la mucosa gástrica interactúa con neuropéptidos y prostaglandinas para mantener la integridad de la mucosa en condiciones basales. Se ha reportado que una dieta rica en nitratos incrementa el flujo sanguíneo gástrico. El nitrato se absorbe en la porción luminal del intestino delgado y es concentrado en las glándulas salivales (Tannenbaum *et al.*, 1976). El nitrato salivario es reducido a nitrito por las bacterias orales y posteriormente es reducido a NO en el ácido del estómago (Duncan *et al.*, 1997; Lundberg *et al.*, 1994). Este gas mediador participa en la defensa de la mucosa gástrica mediante la regulación de flujo sanguíneo gástrico, ácido y secreciones mucoc-alcalinas (Whittle y López-Belmonte, 1993).

Hay estudios que han demostrado que la aplicación de una solución de NO ó un donador de NO en la mucosa gástrica protege del daño (MacNaughton *et al.*, 1989). En este respecto, se han desarrollado fármacos AINES que liberan óxido nítrico para compensar la falta en la síntesis de prostaglandinas y así mitigar el daño gástrico. Por ejemplo un derivado del naproxen liberador de óxido nítrico HCT-3012 inhibe la síntesis de prostaglandinas derivadas de COX-1 y COX-2 (Wallace y Cirino, 1994). Sin embargo HCT-3012 ha sido relacionado con pocas lesiones en la mucosa gástrica en voluntarios humanos sanos en comparación con aquellos administrados con naproxen (Hawkey *et al.*, 2003). Otros AINEs liberadores de NO como un derivado de la aspirina flurbiprofen, no inducen daño gástrico aunque se inhiba la síntesis de prostaglandinas (Konturek *et al.*, 2003, Wallace *et al.*, 2004).

3.2.3.3. Sulfuro de hidrógeno

El sulfuro de hidrógeno es sintetizado endógenamente por L-cysteina mediante dos enzimas: cistationina- γ -liasa (CSE) y cistationina- β -sintetasa (CBS). En algunos tejidos se requiere la presencia de ambas enzimas para la síntesis de H₂S, mientras que en otros sólo una enzima es necesaria. En neuronas del cerebro y del sistema nervioso entérico se ven expresadas las dos enzimas (Wang, 2002).

El H₂S fue estudiado por primera vez en el músculo liso vascular, donde al igual que el NO exhibe efectos relajantes por la acción directa sobre los canales K⁺_{ATP} (Kasperek *et al.*, 2008).

En la mucosa gástrica el H₂S endógeno tiene un rol como factor protector de la mucosa, ya que regula el flujo sanguíneo y la adherencia leucocitaria al endotelio vascular (Fiorucci *et al.*, 2005). Siendo así que también se han sintetizado fármacos anti-inflamatorios no esteroideos que liberan H₂S. Se ha demostrado que un derivado de diclofenaco (ATB-337) unido a una molécula que libera H₂S, repone a la mucosa gastrointestinal ante el daño por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Wallace *et al.*, 2007).

Este compuesto no estimula la adherencia leucocitaria en el endotelio vascular, en contraste con los efectos del diclofenaco (Wallace *et al.*, 2007) y además la liberación de H₂S protege contra la reducción del flujo sanguíneo de la mucosa ocasionado por el ácido acetilsalicílico (Wallace *et al.*, 2007).

También se le ha relacionado con el proceso de curación de las úlceras. El tratamiento por una semana de donadores de sulfuro de hidrógeno dos veces al día incrementa la superficie de curación de úlceras después de la inducción del daño gástrico con ácido acético. Además L-cisteína, un precursor del H₂S, también ha mostrado acelerar la sanación de las úlceras. Estos resultados sugieren que el sulfuro de hidrógeno es producido en la mucosa gástrica en respuesta del daño y actúa promoviendo la sanación (Wallace *et al.*, 2007; Kowicka y Beltowski, 2007).

A pesar de estos reportes acerca de los efectos anti-inflamatorios y gastroprotectores del sulfuro de hidrógeno, también existen aquellos en los que se le atribuye un rol paradójico. El sulfuro de hidrógeno parece participar como una sustancia pro-inflamatoria al incrementar la actividad de la mieloperoxidasa en pulmones e hígado así como la concentración de TNF- α . Mientras que D-L-propargilglicina (CSE inhibidor) exhibe una marcada actividad anti-inflamatoria (Li *et al.*, 2005). También se ha reportado que propargilglicina (PAG) ejerce efecto gastroprotector, debido a que disminuye el H₂S sobreproducido por la administración de etanol. Esta evidencia sugiere que los efectos de H₂S están relacionados con niveles críticos en los tejidos (Chavez-piña *et al.*, 2010). Más estudios deben realizarse para elucidar el mecanismo por el cual el sulfuro de hidrógeno tiene actividades pro-inflamatoria y anti-inflamatorias (Chávez-Piña y Navarrete, 2009).

3.2.3.4. Glutación

Las sustancias con grupos sulfhidrilos (SH) forman parte de los agentes protectores del organismo más distribuidos intracelular y extracelularmente. Por lo que han sido implicados en la protección contra las lesiones inducidas químicamente en la mayoría de los órganos y tejidos (Szabo *et al.*, 1992).

El efecto benéfico de los SH es usualmente atribuido al glutación, ya que es el que contiene la fracción SH no proteínica más larga. Sin embargo los grupos proteínicos SH también son cruciales para el mantenimiento de la integridad y permeabilidad de las membranas celulares. Así como en la actividad de ciertas enzimas y péptidos regulatorios (Szabo, 1981; Szabo, 1984; Freeman y Crapo, 1982, Dupuy *et al.*, 1989).

El glutación y los SH proteicos pueden actuar directamente como antioxidantes, depósito de radicales libres y reguladores de la integridad de la membrana (Szabo *et al.*, 1992).

Los grupos sulfhidrilos en la gastroprotección han sido estudiados desde hace varios años. Los resultados de estos estudios muestran que existe una alta concentración de sulfhidrilos no proteicos (glutatión reducido, cisteína, coenzima A y otros tioles) en la mucosa gástrica. Lo que es indicativo de sus posibles implicaciones en la gastroprotección de la mucosa (Miller *et al.*, 1985).

Además se ha determinado que se presentan cambios rápidos en la concentración de SH y disulfito en la mucosa gástrica, después de su exposición al daño por sustancias químicas como: etanol, solución hipertónica de NaCl, HCl, NaOH ó amonio. Es bien sabido que la administración de estas sustancias químicas causan lesiones gástricas severas y que diferentes eventos bioquímicos (generación de radicales libres y lipoperoxidación) han sido implicados en la patogénesis de estas lesiones (Nagy *et al.*, 2007). Sin embargo como mecanismo de defensa ante los radicales libres producidos por el daño de los agentes químicos, la mucosa gástrica cuenta con el glutatión reducido (Nagy *et al.*, 2007).

También se ha demostrado que la administración exógena de agentes SH como L-cisteína, N-acetilcisteína, cistamina, penicilamina y glutatión ejercen una protección gástrica dosis-dependiente contra el daño con etanol (Strubelt y Hoppenkamps, 1983; Szabo 1984; Szabo, 1981; Balint y Varro, 1982). Además alquiladores de SH como el iodoacetato ó NEM antagonizan el efecto gastroprotector de un tiol gastroprotector ó prostaglandina (Szabo *et al.*, 1987), lo que corrobora la importancia de los grupos de SH reducidos en la gastroprotección. Así mismo fármacos como el sucralfato incrementan la concentración de glutatión en la mucosa gástrica, siendo este efecto bioquímico parte de su mecanismo de acción gastroprotector (Nagy *et al.*, 2007).

3.3. Modelos experimentales para el estudio de gastroprotección

La investigación de los mecanismos endógenos de gastroprotección es de utilidad en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de la úlcera péptica. Dentro de los modelos más utilizados se encuentran los de inducción de úlcera gástrica. En ellos se pretende reproducir la úlcera gástrica en animales de experimentación, con el propósito de evaluar posibles tratamientos terapéuticos. Los agentes químicos empleados en ese modelo incluyen al etanol, ácido acético y la administración de dosis de fármacos AINES (Szabo, 1990; Wallace *et al.*, 1990).

3.3.1. Inducción de úlcera con etanol.

La administración oral de etanol ha sido descrita como un método de inducción de daño gástrico. La severidad de las lesiones están relacionadas con la dosis de etanol administrada. La administración de etanol al 25% induce una disminución en la secreción de moco y un incremento en la secreción de jugo ácido (Kang *et al.*, 1995). La administración de etanol 50% causa daño por la constricción de las vénulas (Saeki *et al.*, 2004), la ausencia del flujo sanguíneo desarrolla un daño gástrico extenso en un periodo de tiempo corto; estudios han mostrado que el daño ocurre primero por la constricción de vénulas submucosas, seguido de un cese en el flujo sanguíneo gástrico lo que lleva a la necrosis de la mucosa (Bou-Abboud *et al.*, 1988). En general, el etanol absoluto induce cambios histopatológicos severos en la mucosa oxíntica de estómagos de rata y ratón, que consisten en agudas lesiones erosivas hemorrágicas, acompañadas de congestión vascular, edema y necrosis (Al-Shabanah *et al.*, 2000; Gazzieri *et al.*, 2007).

Además de la constricción de las vénulas, el etanol absoluto causa disminución de los niveles gástricos de proteínas, ácidos nucleicos, grupos sulfhidrilos no proteicos y sustancias antioxidantes (Zamora-Rodríguez *et al.*, 2007). Además se ha descrito que esta disminución de los grupos sulfhidrilos no proteicos incrementa el contenido de radicales libres mediando el daño al tejido por la estimulación de la lipido peroxidación y daño a las membranas celulares (incrementa el nivel de malondialdehído en la mucosa gástrica) (Al-Shabanah *et al.*, 2000). También el etanol absoluto impacta en los niveles de los mediadores de gastroprotección endógenos óxido nítrico, prostaglandinas y sulfuro de hidrógeno. Lo cual contribuye al desarrollo del daño gástrico (Chávez-Piña y Navarrete, 2009).

Por otro lado como un mecanismo que contribuye al daño se observa un aumento en los leucocitos de la mucosa. Esto medía en parte el proceso de vasoconstricción (Yonei y Guth, 1991). La acumulación leucocitaria está estrechamente relacionada con la inflamación de la mucosa del tracto gastrointestinal (Elliot y Wallace, 1998). La adhesión de neutrófilos en las áreas de inflamación comienza con la adhesión de las células circulantes al revestimiento del endotelio de los pequeños vasos sanguíneos (Elliot y Wallace, 1998). Hay dos mecanismos principales por los cuales la adherencia de neutrófilos causa daño sobre la mucosa gástrica, los factores que disparan la adherencia de neutrófilos al endotelio vascular también disparan la activación de los neutrófilos permitiendo la liberación de radicales libres de oxígeno y proteasas. La adherencia leucocitaria al endotelio vascular puede también obstruir capilares, resultando en reducción del flujo sanguíneo gástrico y predisposición al daño gástrico (Del soldato *et al.*, 1985).

La adhesión leucocitaria en el endotelio y la subsecuente migración depende de la expresión de moléculas específicas de adhesión como L-, E- y P-selectina ó molécula de adhesión intercelular 1; del tipo de superficie de la célula y de la consecuente activación de citoquinas como el TNF- α (Muller, 2003, Véliz *et al.*, 2008). La inhibición de TNF- α disminuye el daño ocasionado por etanol (Ferraz *et al.*, 1997).

3.4. Glibenclamida.

3.4.1. Estructura química

La glibenclamida pertenece al grupo de las sulfonilureas de segunda generación. Se caracteriza por poseer un grupo benzamido unido a su núcleo sulfonilurea (Figura 3-3) (Rang y Dale, 2008).

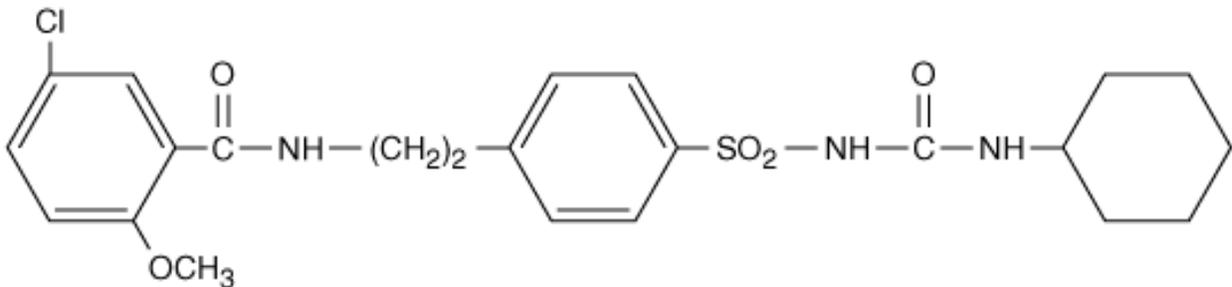


Figura 3-3. Estructura química de la glibenclamida (Rang y Dale, 2008).

3.4.2. Actividad farmacológica

Los agentes terapéuticos sulfonilureas son considerados los inhibidores clásicos de los canales K^+_{ATP} (Gribble y Reiman, 2003). Dadas sus múltiples funciones fisiológicas los canales K^+_{ATP} representan objetivos farmacológicos promisorios (Mannhold 2003).

3.4.2.1. Antagonista de los canales K_{ATP}

La glibenclamida puede ejercer una acción inhibitoria sobre los canales K^+_{ATP} Kir6.2/SUR1 y Kir6.2/SUR2 presentes en diversos tejidos del organismo, ya que presenta una alta afinidad por ambos tipos de subunidad SUR (Gribble *et al.*, 1998; Song y Ashcroft, 2001). Sin embargo la reversibilidad de su unión con los canales K^+_{ATP} depende del tipo de subunidad SUR. Se ha visto que su unión con el canal K^+_{ATP} Kir6.2/SUR1 es lentamente reversible, a diferencia del canal K^+_{ATP} Kir6.2/SUR2 en donde su unión es rápidamente reversible (Gribble y Reiman 2003).

Una explicación para su selectividad y reversibilidad puede ser que a SUR1 se pueden unir moléculas que presenten grupo sulfonilurea ó grupo benzamido. No obstante el sitio de unión en SUR2 parece acomodar derivados benzamidados pero no sulfonilureas. Dado que glibenclamida contiene ambas características (grupo sulfonilurea y grupo benzamido) puede unirse en SUR1 con ambas partes, pero en SUR2 sólo con la parte de derivado benzamido (Ver Figura 3-4). El enlace de ambas partes de glibenclamida en SUR1 puede ser el responsable de su baja disociación (Gribble y Reiman 2003).

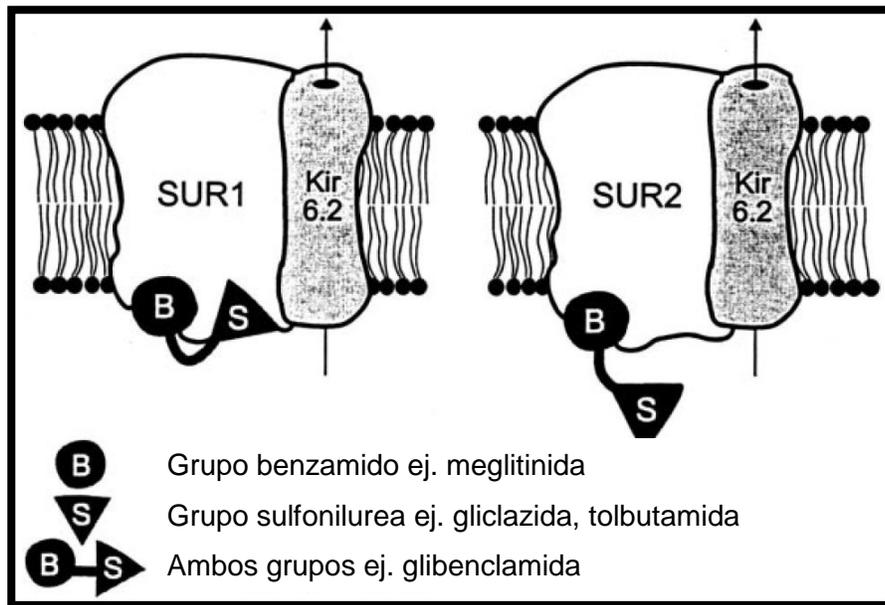


Figura 3-4. Sitios de unión en los canales K^+ ATP Kir6.2/SUR1 y Kir6.2/SUR2 (Ashcroft y Gribble, 2000).

El mecanismo de acción de la glibenclamida se describe a continuación. La glibenclamida se une al canal K^+ ATP por su subunidad SUR y por consiguiente inhibe su actividad. Esto ocasiona una disminución en la entrada de iones K^+ , lo que resulta en la despolarización de la membrana celular. La despolarización permite la apertura del canal de Ca^{2+} voltaje-dependiente lo que representa un aumento del calcio intracelular. Un aumento del calcio intracelular impacta en muchas funciones celulares. Por ejemplo en las células beta del páncreas (Ver Figura 3-5) se promueve la exocitosis de la insulina (Rang y Dale, 2008; Bruton *et al.*, 2010)

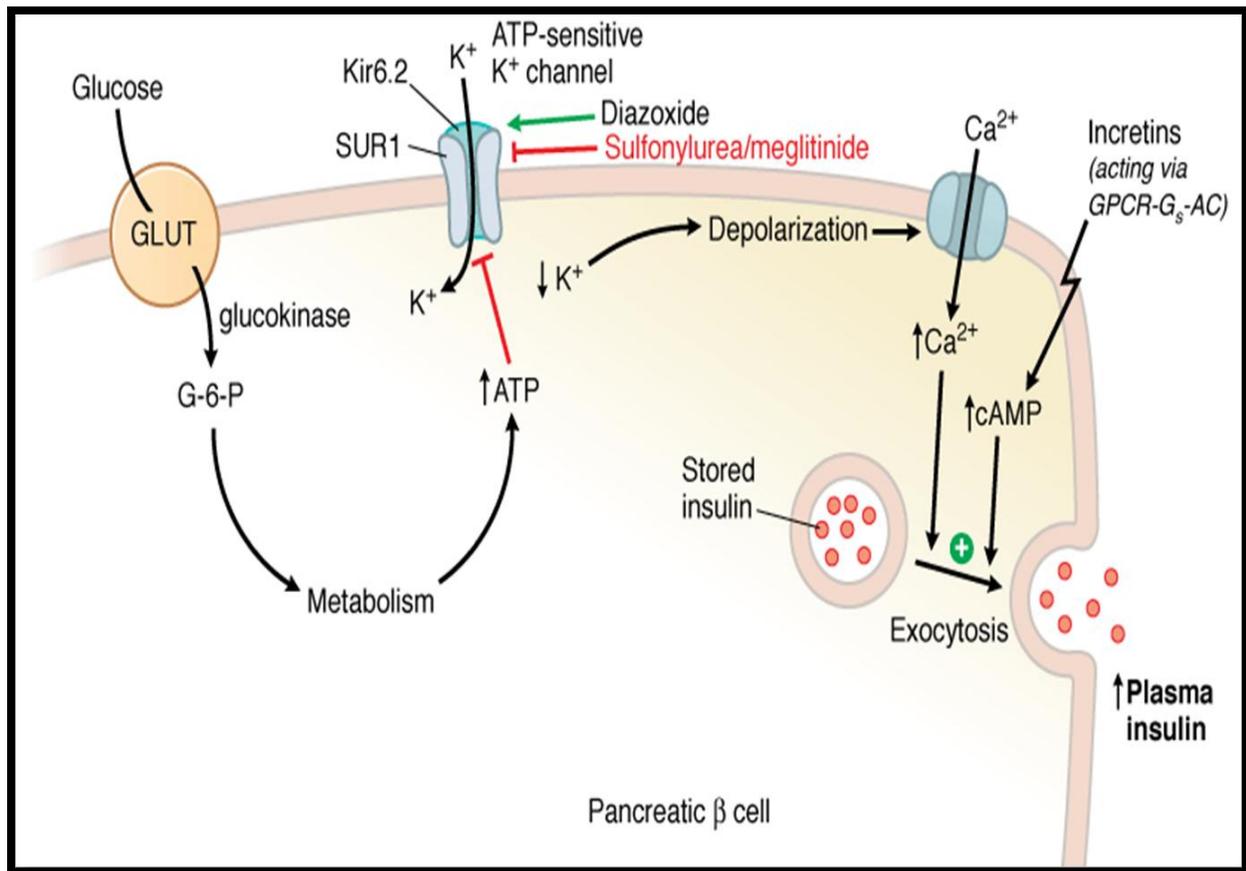


Figura 3-5. Mecanismo de acción de glibenclamida en las células beta del páncreas (Bruton *et al.*, 2010).

En otros tejidos como el músculo liso vascular la inhibición de los canales K^+_{ATP} por glibenclamida evita la relajación y vasodilatación del músculo liso vascular (Ver Figura 3-6). En contraste, las sustancias agonistas del canal (KCO) funcionan como potentes vasodilatadores (Cole y Clement-Chomienne, 2003). Los KCO al hiperpolarizar la membrana celular disminuyen la entrada de Ca^{2+} debido a la regulación del canal de Ca^{2+} voltaje-dependiente, además regulan la movilización intracelular del Ca^{2+} en las células del músculo liso, lo cual lleva a la relajación muscular y vasodilatación (Quast *et al.*, 1994) (Ver Figura 3-6).

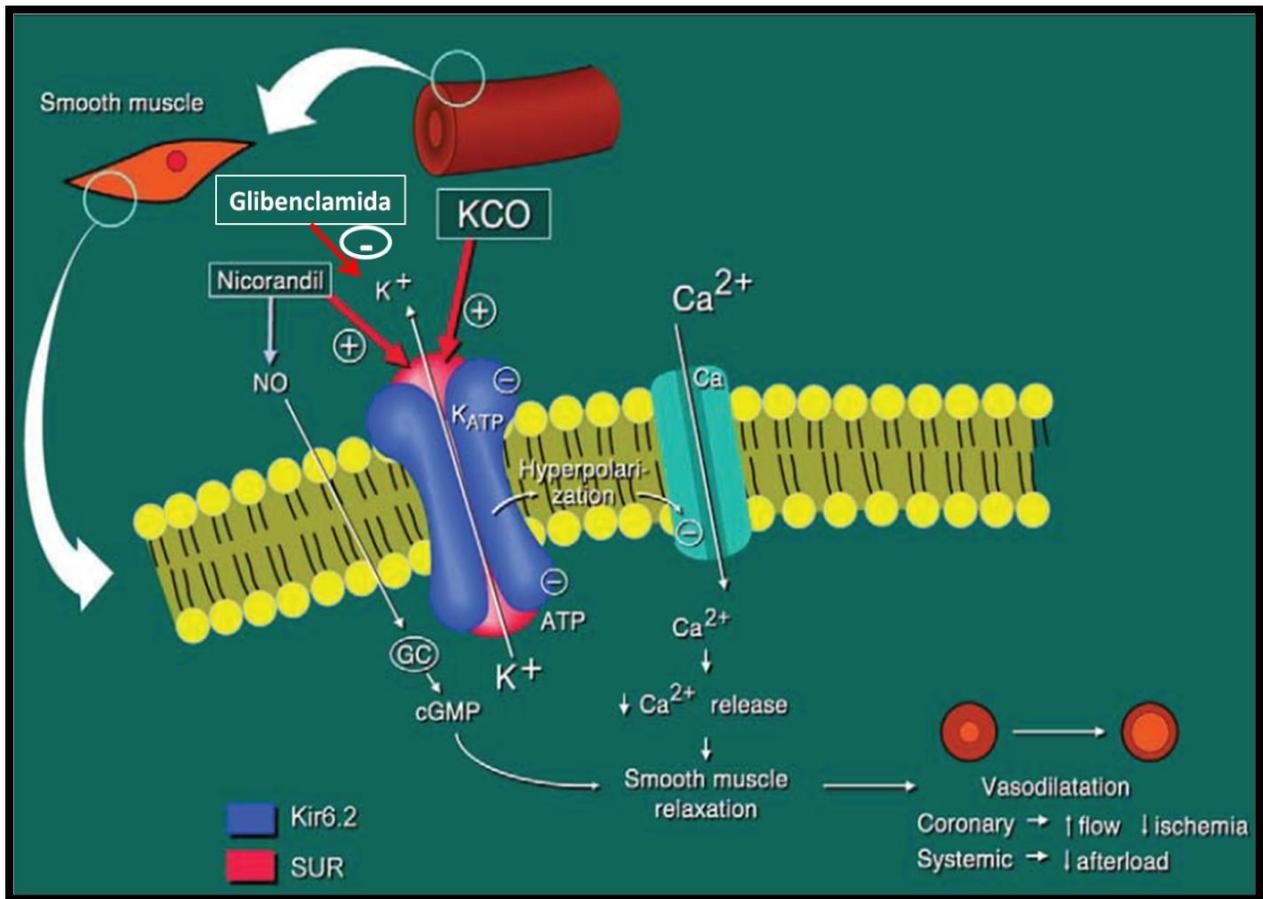


Figura 3-6. Mecanismo de acción de glibenclamide y las sustancias activadoras de los canales K^+_{ATP} sobre el tejido vascular endotelial (modificado de Jahangir y Terzic, 2005).

3.4.2.2. Actividad gastroprotectora

Se sabe que los canales K^+_{ATP} han sido encontrados en el tejido vascular de la circulación de la mucosa gástrica (Doi *et al.*, 1998). Están involucrados en la secreción de fluidos, motilidad gástrica y tono vascular (vasodilatación de las arterias mesentéricas) (Soria, 1998). Recientemente diversos estudios han tenido la finalidad de investigar el papel de los canales K^+_{ATP} en la protección de la mucosa gástrica. Para ello fue empleada con frecuencia a la glibenclamide como antagonista y al diazoxido como activador.

Los efectos de la glibenclamida sobre los canales de K^+_{ATP} de la microcirculación gástrica son variados. Sin embargo coinciden en que en dosis mayores de 10 mg/Kg se observa un efecto de protección de la mucosa gástrica. Pazoki-Toroudi *et al.*, 1999, observaron que el diazóxido en altas dosis previno significativamente el daño gástrico inducido con indometacina con un incremento significativo de glucosa en sangre, mientras que la glibenclamida (2.6 mg/Kg, i.p.) lo agravó significativamente, con excepción de la dosis de 18 mg/Kg, en donde se observó disminución del índice de úlcera con disminución de los niveles de glucosa en sangre en todos los grupos con indometacina y control. No obstante los efectos de la glibenclamida no pueden explicarse como un efecto vascular directo, debido a que la glibenclamida no modificó el tono en reposo ó precontraído de las arterias gástricas (Akar *et al.*, 1999).

Adicionalmente en un modelo de inducción de daño gástrico con etanol 70% la glibenclamida a pesar de antagonizar el efecto gastroprotector de varios compuestos (16,16-dimetil-PGE₂, etanol 20%, salicilato de sodio, cloruro de litio, dietilmaleato y dimercaprol), exhibe actividad protectora cuando se administra sola en dosis altas (Peskar *et al.*, 2002). Además se mostró que los efectos de la glibenclamida o los activadores del canal K^+_{ATP} sobre la mucosa gástrica no están correlacionados con sus efectos sobre el nivel de glucosa en sangre (Akar *et al.*, 1999).

3.4.2.3. Restaurador del balance oxidante-antioxidante en la diabetes

Además de sus propiedades sobre los canales K^+_{ATP} se ha investigado si la glibenclamida posee otras actividades que pudieran ayudar en el tratamiento de la diabetes mellitus. Por ejemplo en restaurar el desbalance oxidante-antioxidante mediante la normalización del sistema antioxidante endógeno afectado por el padecimiento.

Tünzun *et al.*, 1999 encontraron que la administración de glibenclamida puede normalizar la actividad de la catalasa (CAT) en los tejidos de ratas diabéticas (pulmón, corazón, cerebro, riñón) con excepción del hígado. Además existe otro reporte de Altan *et al.*, 1994, que han demostrado que el tratamiento con glibenclamida restauró la actividad de la superóxido dismutasa hepática en un modelo experimental de diabetes tipo 2.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La úlcera péptica es una enfermedad que a nivel mundial es un problema de salud importante. Recientemente en nuestro país este padecimiento representa una de las principales causas de morbilidad a nivel nacional. Así mismo está relacionado con la diabetes, donde se presenta una disfunción en el estómago que ocasiona una reducción en la percepción de síntomas típicos de alteraciones gastrointestinales, y por consiguiente estos pacientes presentan úlceras pépticas asintomáticas muy severas. La glibenclamida es usada ampliamente en el estudio de la participación de los canales K^+_{ATP} en los mecanismos de gastroprotección endógena, ha mostrado antagonizar el efecto protector de algunos agentes antiulcerosos. No obstante, se ha reportado que posee actividad gastroprotectora cuando se administra en dosis altas, estando este efecto no relacionado con su propiedad como hipoglucemiante oral (Peskar *et al.*, 2002; Akar *et al.*, 1999). Sin embargo no se han llevado a cabo estudios en donde se realice una caracterización dosis-respuesta de ésta actividad, ni sobre la participación de mediadores endógenos gastroprotectores en este mecanismo de acción. Adicionalmente Morsy *et al.*, 2010 demostraron que los fármacos antidiabéticos metformina y rosiglitazona exhiben actividad gastroprotectora en el modelo de daño inducido con indometacina en ratas normo e hiperglicémicas. El efecto gastroprotector de ambos fármacos está relacionado con sus actividades antisecretoras, fortalecimiento de los factores de defensa gástrica y actividad antioxidante. En relación a otros fármacos antidiabéticos hay estudios en donde la glibenclamida presenta propiedades antioxidantes al restaurar los niveles de la actividad de la catalasa en diferentes tejidos de ratas diabéticas (Tüzun *et al.*, 1999) y de la superóxido dismutasa en hígado de animales hiperglicémicos (Altan *et al.*, 1994). Sin embargo no hay estudios sobre su posible acción gastroprotectora en ratas hiperglicémicas ni de su efecto sobre el estrés oxidativo presente en el daño inducido con etanol en ratas hiperglicémicas.

Por ello se planteó en este trabajo caracterizar el efecto gastroprotector de la glibenclamida en ratas normoglicémicas y determinar la posible participación de mediadores endógenos de gastroprotección, de marcadores de estrés oxidativo e inflamación en su mecanismo de acción en el modelo de inducción de úlcera con etanol. Adicionalmente evaluar una posible actividad gastroprotectora y la modulación de algún mediador de estrés oxidativo en el modelo de inducción de úlcera con etanol en ratas hiperglicémicas.

5. HIPÓTESIS

En estudios previos se encontró que la glibenclamida presenta actividad gastroprotectora cuando es administrada en dosis altas, estando este efecto no relacionado con su propiedad hipoglucemiante, por lo que se espera que la glibenclamida será capaz de prevenir el daño gástrico inducido con etanol a través de un mecanismo regulador de los mediadores químicos involucrados en la protección de la mucosa elevando los niveles de óxido nítrico, prostaglandina E₂, sulfuro de hidrógeno y glutatión; así como mediante la disminución del nivel del factor de necrosis tumoral alfa y malondialdehído en ratas normo e hiperglicémicas.

6. OBJETIVOS

6.1. General

Caracterizar el efecto gastroprotector de la glibenclamida en el modelo de inducción de daño gástrico con etanol en ratas normoglicémicas e hiperglicémicas.

6.2. Particulares

- Evaluar el efecto gastroprotector de glibenclamida en el modelo de daño gástrico inducido con etanol en ratas normoglicémicas y determinar si existe una relación dosis dependiente.
- Determinar la posible participación de los canales K⁺_{ATP} en el efecto gastroprotector de glibenclamida en el modelo de inducción de úlcera con etanol.
- Investigar el efecto de la administración de glibenclamida en el modelo de daño gástrico inducido con etanol sobre los niveles de los mediadores endógenos en estómago prostaglandina E₂, óxido nítrico, sulfuro de hidrógeno, glutatión, el indicador de estrés oxidativo malondialdehído. Así como del mediador de inflamación factor de necrosis tumoral alfa, en ratas normoglicémicas.
- Valorar el efecto gastroprotector de glibenclamida en el modelo de daño gástrico inducido con etanol en ratas hiperglicémicas tratadas con aloxan o estreptozotocina.
- Evaluar el efecto de la administración de glibenclamida en el modelo de daño gástrico inducido con etanol sobre los niveles de los mediadores endógenos en estómago: glutatión y malondialdehído en ratas hiperglicémicas tratadas con aloxan o estreptozotocina.

7. MATERIAL Y MÉTODO

7.1. Animales

Para los experimentos se utilizaron ratas macho Wistar del Centro de Producción UNAM-Harlan, Harlan México, S.A. de C.V. de entre 170-190 g tratados según la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidados y usos de animales de laboratorio). En el caso de los experimentos con modelos de hiperglicemia las ratas macho Wistar empleadas tuvieron un peso inicial de entre 170-190 g. El número de ratas por grupo fue de al menos 6. Antes del experimento los animales fueron colocados en jaulas individuales con piso de malla para evitar la coprofagia, privándolos de alimento por 18 horas y con libre acceso de agua.

7.2. Fármacos y reactivos

La glibenclamida, diazoxido, aloxan y estreptozotocina se adquirieron en Sigma-Aldrich corporation (St. Louis MO, USA). Las soluciones se prepararon minutos antes de ser utilizadas. El etanol se obtuvo de J.T. Baker. El producto comercial para la determinación de PGE₂ EIA fue adquirido de Cayman Chemical y el de TNF- α ELISA de ALPCO inmunoanálisis. El resto de las sustancias fueron de grado analítico.

7.3. Equipo e instrumentos

Para determinar el índice de úlcera, se empleó un microscopio estereoscópico SZ4045 OLYMPUS de 10X provisto con micrómetro ocular. Los niveles de glucosa de los animales fueron medidos con un glucómetro GLUCOLAB (Infopiac. LTD). Para leer las placas de las técnicas analíticas fue empleado un lector ELISA modelo 680 Microplate Reader de la marca BIO-RAD.

7.4. Inducción y evaluación del daño gástrico

La úlcera fue inducida como se describe a continuación: se administró intragástricamente 1mL de etanol absoluto. Dos horas más tarde el animal fue sacrificado en cámara de CO₂, y de forma inmediata el estómago fue disectado y llenado con 10 mL de formol al 4%. Para fijar las lesiones se colocó el tejido en un recipiente que contenía formol al 4%, transcurridos 15 minutos el estómago fue abierto por la curvatura mayor y colocado de forma extendida. Se midió el área dañada (mm²) de cada lesión con un microscopio estereoscopio (10x) provisto con micrómetro ocular. El índice de úlcera se calculó como la suma del área de todas las lesiones en el cuerpo del estómago de cada animal (Navarrete *et al.*, 1998).

7.5. Modelo de inducción de hiperglicemia

Las ratas con niveles normales de glucosa fueron inducidas al estado hiperglicémico mediante la administración de los fármacos aloxan (150 mg/Kg i.p) o estreptozotocina (50 mg/Kg i.p). Al noveno día de esta administración los niveles de glucosa fueron medidos usando un glucómetro (Glucolab). Las ratas que fueron consideradas hiperglicémicas presentaron niveles de glucosa en sangre mayores a 250 mg/dL. Dicho procedimiento es descrito en la Figura 7-1.

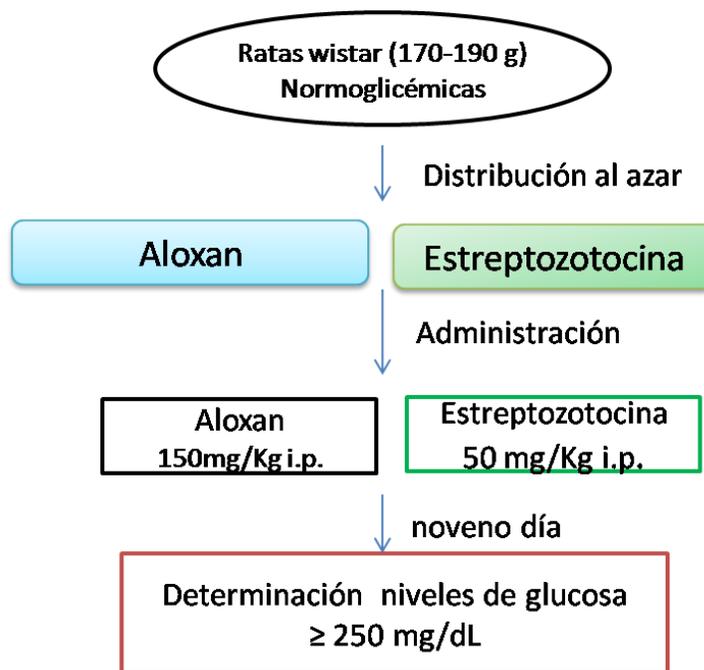


Figura 7-1. Esquema de la metodología empleada en el modelo de inducción de hiperglicemia en los animales de experimentación.

7.6. Caracterización del efecto gastroprotector de glibenclamida en el daño gástrico inducido con etanol en ratas normoglicémicas.

Los animales de experimentación normoglicémicos fueron divididos al azar en 6 grupos ($n \geq 6$) (Figura 7-2). Las ratas del grupo 1 (vehículo) y 2 (etanol) recibieron un pre-tratamiento con NaOH 0.05M a dosis de 0.1mL/100g vía i.p. Mientras que los grupos del 3 al 6 (glibenclamida) fueron administrados con dosis diferentes de glibenclamida 1, 1.7, 3, 10 mg/kg en NaOH 0.05 M vía i.p. La inducción de la úlcera péptica se realizó pasadas 3 horas y media de acuerdo al procedimiento antes descrito (7.4 inducción y evaluación del daño gástrico). En el caso del grupo 1 (vehículo) se administró solución salina en lugar de etanol. El procedimiento antes descrito se representa en la Figura 7-2.

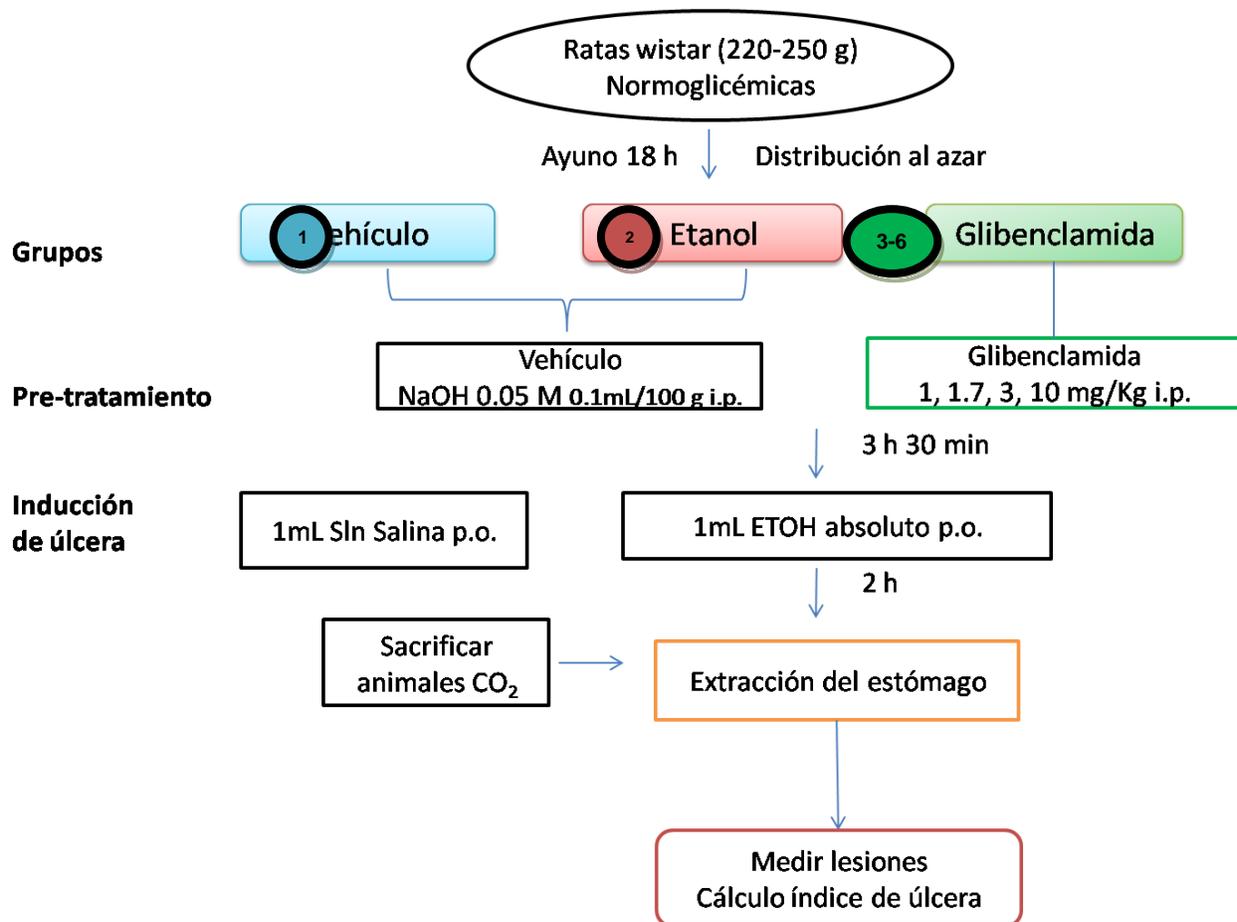


Figura 7-2. Esquema de la metodología empleada en la caracterización del efecto gastroprotector de glibenclamida en ratas normoglicémicas con el modelo de inducción de úlcera con etanol.

7.7. Participación de los canales de K^+_{ATP} en el mecanismo de acción gastroprotector de glibenclamida.

La evaluación del efecto del pre-tratamiento de diazoxido en la actividad gastroprotectora de la glibenclamida se realizó de la siguiente manera: los animales de experimentación fueron divididos al azar en 4 grupos (n=6-12) (Figura 7-3). Las ratas del grupo 1 (etanol), 2 (diazoxido) y 3 (glibenclamida) recibieron un pre-tratamiento con NaOH 0.05M a dosis de 0.1mL/100g vía i.p.; mientras que las del grupo 4 (diazoxido + glibenclamida) fueron tratadas con diazoxido a dosis de 3 mg/Kg i.p. Un segundo tratamiento fue administrado después de transcurridos 30 min. Las ratas del grupo 1 recibieron NaOH 0.05M a dosis de 0.1mL/100g vía i.p., el grupo 2 recibió diazoxido a dosis de 3 mg/Kg i.p. y el grupo 3 - 4 fue administrado con glibenclamida a dosis de 3 mg/Kg i.p. La inducción de la úlcera péptica se realizó transcurridas 3 horas y media de acuerdo al procedimiento antes descrito (5.5 inducción y evaluación del daño gástrico) (Figura 7-3).

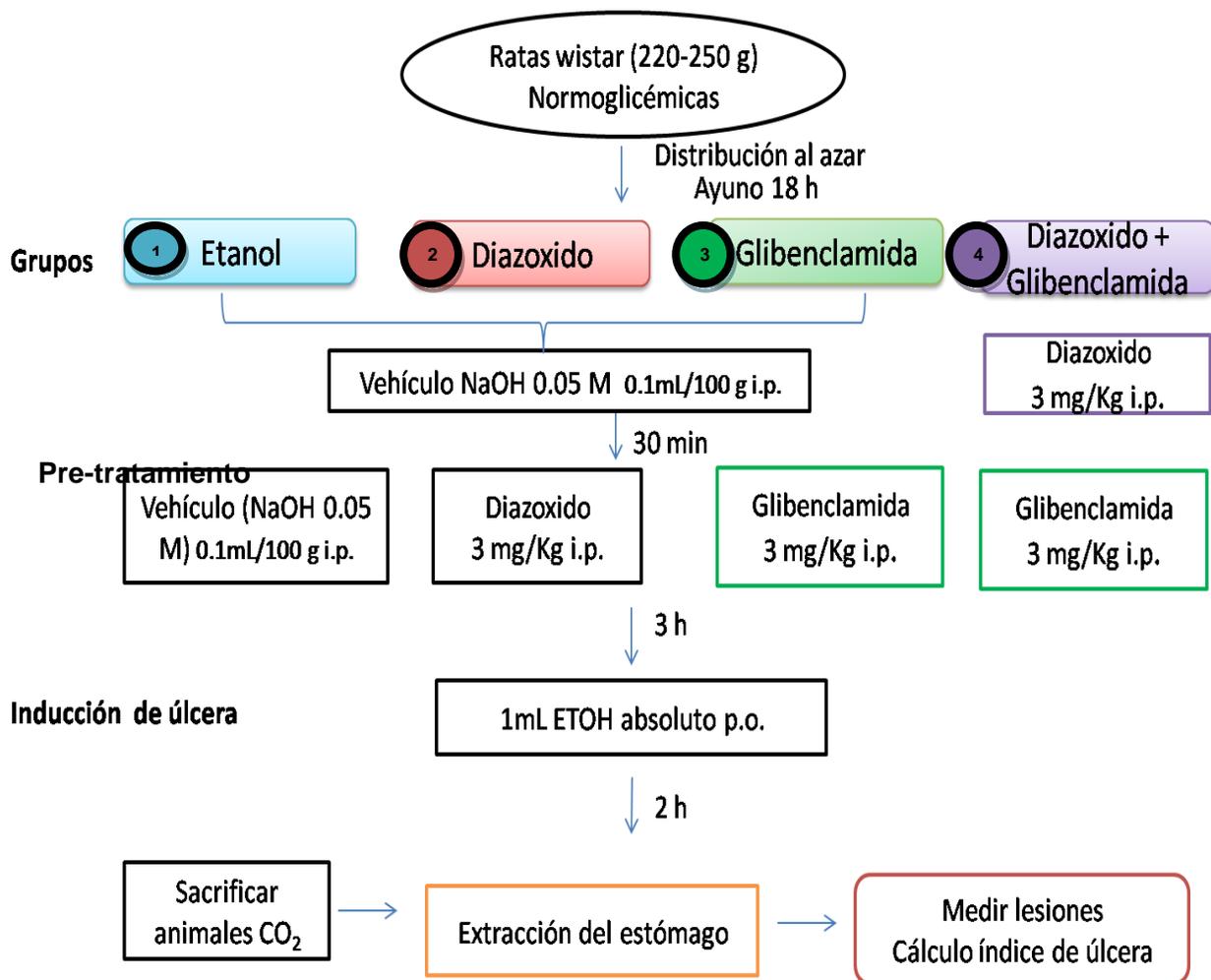


Figura 7-3. Esquema de la metodología empleada en la determinación de la participación de los canales K^+_{ATP} en el mecanismo gastroprotector de glibenclamida

7.8. Influencia de glibenclamida sobre mediadores endógenos de gastroprotección normoglicémicas.

7.8.1. Tratamiento de animales de experimentación

Los animales de experimentación normoglicémicos (Figura 7-4) fueron divididos al azar en 3 grupos $n \geq 6$. Las ratas del grupo 1 (vehículo) y 2 (etanol) recibieron un pre-tratamiento con NaOH 0.05M a la dosis de 0.1mL/100g vía i.p. Mientras que el grupo 3 (glibenclamida) fue administrado con glibenclamida a la dosis de 10 mg/kg en NaOH 0.05 M vía i.p. La inducción de la úlcera péptica se realizó después de 3 horas y media para lo cual se administró intragástricamente 1mL de etanol absoluto. En el caso del grupo 1 (vehículo) se administró solución salina en lugar de etanol. Dos horas mas tarde el animal fue sacrificado en cámara de CO₂, y de forma inmediata el estómago fue disectado y lavado con solución salina.

El tejido gástrico fue almacenado en el congelador (Thermo Scientific Revco® Value Series Model ULT390-3-A35) a -72°C hasta las determinaciones de sulfuro de hidrógeno, glutatión, MDA y TFN- α . Para la determinación de óxido nítrico y prostaglandina E₂ se empleó tejido gástrico recién extraído. 300 mg de tejido gástrico fueron seccionados con tijeras dentro de un tubo eppendorf con 1 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio (10 mmol/L; pH 7.4).

El tubo eppendorf fue colocado en un baño de agua a 37°C por 20 minutos. Posteriormente el tubo con muestra fue centrifugado a 9000 g por 1 minuto. El sobrenadante fue conservado en el congelador (Thermo Scientific Revco® Value Series Model ULT390-3-A35) a -72°C hasta su análisis.

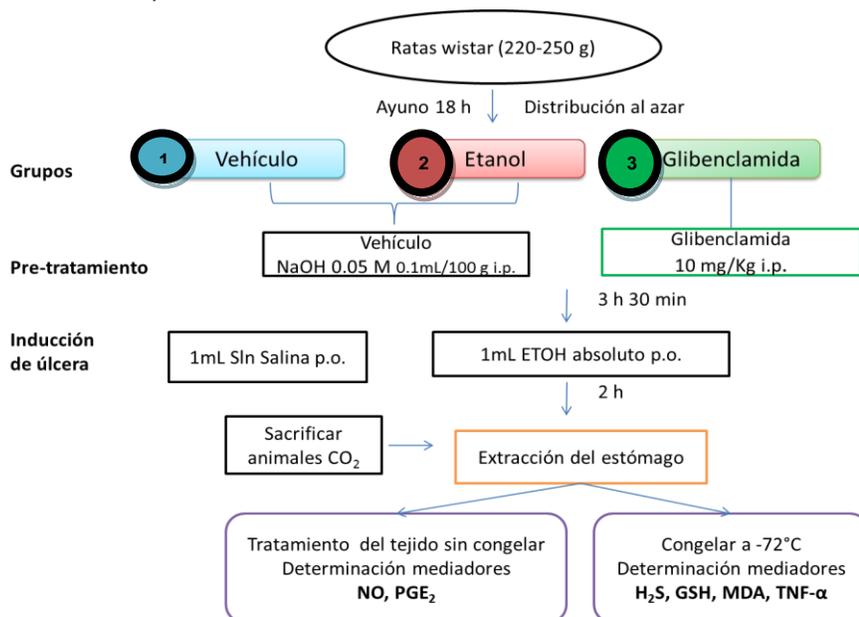


Figura 7-4. Esquema de la metodología empleada en los tratamientos de los animales de experimentación para la determinación de la influencia de glibenclamida en los mediadores endógenos de gastroprotección en animales normoglicémicos.

7.8.2. Determinación espectrofotométrica de los niveles endógenos de óxido nítrico en estómago.

- Preparación de la curva estándar

Se colocó en un tubo de ensaye 0.9 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio (10 mmol/L; pH 7.4) y se adicionaron 0.1 mL de estándar reconstituido de nitratos para obtener una concentración stock de 200 μ M. Posteriormente se construyó una curva estándar de nitratos con las siguientes concentraciones 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 μ M; las soluciones control solamente contenían solución amortiguadora. Cada concentración de la curva fue trabajada por triplicado.

- Preparación de la muestras de tejido gástrico

El sobrenadante proveniente de las muestras de tejido gástrico fue descongelado a temperatura ambiente (Ver 7.8.1).

- Desarrollo del ensayo

La determinación del óxido nítrico se realizó mediante la reacción colorimétrica de Griess (Green *et al.*, 1982). Se colocó una alícuota de 80 μ L de las soluciones estándar o sobrenadante de muestra en pozos de una microplaca para BIO-RAD, en cada uno de ellos se agregó 10 μ L de sustancia Co-factor y 10 μ L de mezcla nitrato reductasa, se dejó incubar por 3 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se les adicionó 50 μ L de sulfanilamida y 50 μ L de N(1-naftil)-etilendiamina, incubando por 10 minutos a temperatura ambiente; tiempo suficiente para la formación de un color azul. La placa fue leída a 540 nm utilizando para ello un lector ELISA modelo 680 Microplate Reader de la marca BIO-RAD (Chavez-Piña *et al.*, 2011).

7.8.3. Determinación inmuno-enzimática de los niveles endógenos de prostaglandina E₂ en estómago.

La determinación de PGE₂ se llevo a cabo empleando el producto comercial EIA Cayman Chemical como se describe a continuación.

- Preparación de la curva estándar

Se realizó una curva patrón de PGE₂, en un rango de 7.8 pg de PGE₂/mL a 500 de PGE₂/mL (Figura 7-5).

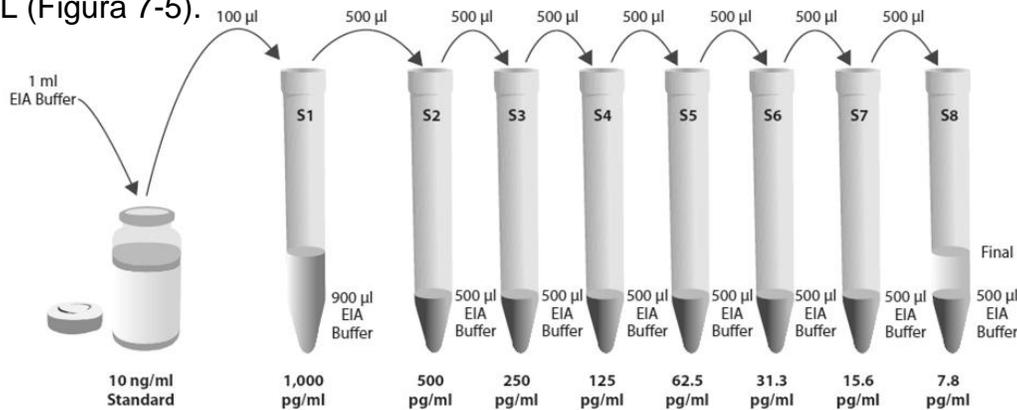


Figura 7-5. Diagrama de la preparación de las soluciones de la curva patrón de PGE₂

- Preparación de la muestras de tejido gástrico

Del sobrenadante del tejido gástrico (apartado 7.8.1) descongelado a temperatura ambiente, fueron tomados 20 µL que fueron diluidos con 980 µL de solución amortiguadora de EIA.

- Desarrollo del ensayo

La adición de reactivos y cantidades en cada pozo de la placa EIA se efectuó considerando la muestra a analizar (blancos Blk, celdas de unión no específica NSB, celda de actividad total TA, celdas de unión máxima B₀, estándar o muestra de sobrenadante). El orden se muestra en la Figura 7-6.

Reactivo	Blanco (Blk)	Actividad total (TA)	Unión no específica (NSB)	Máxima unión (B ₀)	Estándar (S1-S8)	Muestras analizadas
1. Buffer EIA	-----	-----	100 µL	50 µL	-----	-----
2. Soluciones de la curva patrón	-----	-----	-----	-----	50 µL	-----
3. Muestras	-----	-----	-----	-----	-----	50 µL
4. Trazador	-----	-----	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
5. Anticuerpo	-----	-----	-----	50 µL	50 µL	50 µL

Figura 7-6. Orden y cantidades de los reactivos adicionados para cada tratamiento antes de incubar la placa

La distribución de las posiciones en la placa se muestra en la Figura 7-7.

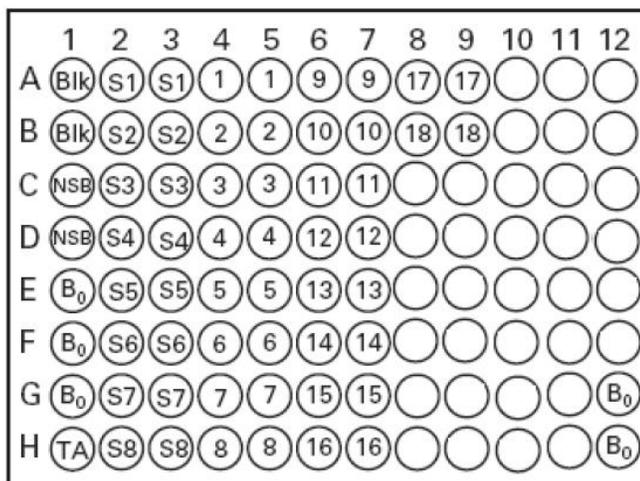


Figura 7-7. Asignación de la posición para cada ensayo realizado en la placa de EIA: 2 pozos para blancos (Blk), 2 para celdas de unión no específica (NSB), 5 para celdas de unión máxima (B₀), 1 para celda de actividad total (TA), 8 para concentraciones de la curva patrón elaboradas por duplicado (S1-S8), 6 para muestras por duplicado de tejido gástrico tratado sólo con vehículo (1-6), 6 para muestras por duplicado de tejido gástrico tratado con etanol (7-12), 6 para muestras por duplicado de tejido gástrico tratado con glibenclamida/etanol (13-18).

Al finalizar la adición de reactivos (Figura 7-6 y 7-7) la placa fue cubierta con una tapa plástica adhesiva y se incubó a 4°C durante 18 horas. Trascurrido el tiempo de incubación, se vació el contenido de los pozos y la placa fue lavada en 5 ocasiones consecutivas, empleando la solución amortiguadora de lavado.

Posteriormente se adicionaron 5 µL de trazador al pozo TA (Figura 7-7) y 200 µL de reactivo de Ellman's a todos los pozos. Se cubrió la placa con aluminio y se incubó a temperatura ambiente con agitación ligera por un periodo de 60-90 minutos. Finalmente se registró la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 412 nm en un lector ELISA modelo 680 Microplate Reader de la marca BIO-RAD.

7.8.4. Determinación espectrofotométrica de los niveles endógenos de sulfuro de hidrógeno en estómago.

- Preparación de la curva estándar

Se pesaron 17.9 mg de NaHS y se disolvieron en 50 mL de acetato de zinc 0.05%. A partir de éste stock se preparó una solución con una concentración final de 192 $\mu\text{mol/L}$. Posteriormente se realizó una curva estándar, en el rango de concentraciones entre 0 y 192 $\mu\text{mol/L}$ de H_2S .

- Preparación de las muestras de tejido gástrico

1g de tejido gástrico descongelado a temperatura ambiente, se homogeneizó en frío agregando 900 μL de acetato de zinc 0.05%. El homogeneizado fue centrifugado a 14000g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se conservó para el desarrollo del ensayo.

- Desarrollo del ensayo

La determinación del sulfuro de hidrógeno se realizó mediante la reacción colorimétrica de formación del azul de metileno (Bulatov *et al.*, 2006). 350 μL de la solución estándar o de homogeneizado de muestra de tejido fueron colocados en tubos eppendorf. A los tubos eppendorf se les adicionó 50 μL de ácido tricloroacético 10%. Seguidamente fueron mezclados y centrifugados a 14 000g por 10 minutos a 4°C.

Del sobrenadante obtenido de las soluciones estándar fueron colocados 170 μL en otros tubos eppendorf. En el caso de las muestras de tejido, fueron colocados 120 μL de sobrenadante y 50 μL de solución estándar (48 $\mu\text{mol/L}$). A los tubos se añadieron 40 μL de sulfato de N,N-dimetil-*p*-fenilendiamina 20mmol/L (disuelta en HCl 7.2 M) y fueron agitados en vortex por 1 minuto. Seguidamente se adicionaron 40 μL de cloruro férrico 30mmol/L (disuelto en HCl 1.2 M) y fueron agitados en vortex por 1 minuto.

Los tubos fueron incubados por 20 minutos para el desarrollo de una coloración azul-verde. Transcurrido este tiempo se les realizó una extracción con 500 μL de cloroformo. 450 μL de la fase orgánica fueron evaporados en un tubo de vidrio a 60°C en una estufa a presión reducida. Una vez que el tubo de vidrio llegó a temperatura ambiente, el contenido fue re-suspendido con 220 μL de alcohol etílico 96°. Del alcohol etílico fueron tomados 190 μL para colocar en la placa para lector ELISA modelo 680 Microplate Reader de la marca BIO-RAD, determinándose las absorbancias a 655 nm.

7.8.5. Determinación espectrofotométrica de los niveles endógenos de glutatión en estómago

- Preparación de la curva estándar

Se preparó una solución stock pesando 9.22 mg de GSH reducido y disolviéndolos en 10 mL de EDTA 0.02 M. A partir de ella se preparó una solución con una concentración final de 504 μ mol/L de GSH. Posteriormente se realizó una curva estándar en un rango de concentraciones entre 0 y 378 μ mol/L de GSH.

- Preparación de la muestra de tejido gástrico

200 mg de tejido gástrico descongelados a temperatura ambiente, fueron homogeneizados con 1.5 mL de EDTA 0.02M. El homogeneizado fue centrifugado a 3000g por 5 minutos. El sobrenadante se conservó para el desarrollo del ensayo.

- Desarrollo del ensayo

La determinación de glutatión se realizó mediante la reacción colorimétrica de los grupos sulfhidrilos no proteicos (Lindsay y Sedlak, 1968). 400 μ L de la solución estándar o sobrenadante de muestra de tejido gástrico fueron colocados en un tubo ependorf con 320 μ L de agua destilada y 80 μ L de ácido tricloroacético 50%. Los tubos fueron mezclados y centrifugados a 3000g por 15 minutos. De éstos sobrenadantes se tomaron 80 μ L que fueron colocados en una placa para BIO-RAD, con la siguiente adición de 160 μ L de Buffer TRIS 0.4M pH 9 y 20 μ L de ácido 5,5-ditio-bis 2-nitrobenzoico (DTNB) 0.002M (disuelto en metanol). La placa fue agitada en el BIO-RAD 680 por 5 minutos y finalmente leída a 412 nm.

7.8.6. Determinación espectrofotométrica de los niveles endógenos de malondialdehído en estómago.

- Preparación de la curva estándar

Se preparó una solución stock pesando 7.8 mg de malondialdehído tetrametilamonio y disolviéndolos en 25 mL de agua destilada. A partir de ella se preparó la solución S0 con una concentración final de 125 $\mu\text{mol/L}$ de MDA. Posteriormente se realizó una curva estándar en un rango de concentraciones entre 0 y 60.62 $\mu\text{mol/L}$ de MDA.

- Preparación de la muestras de tejido gástrico

Un conjunto de 5 tejidos gástricos fue descongelado a temperatura ambiente, fueron homogeneizados con 2 mL de cloruro de potasio (1.15%). El homogeneizado fue centrifugado a 10 000g por 5 minutos. El sobrenadante del homogeneizado fue conservado para el desarrollo del ensayo.

- Desarrollo del ensayo

La determinación de malondialdehído se realizó mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico (Yagi, 1998; Armstrong y Browne, 1994). 200 μL de las soluciones estándar fueron colocados en tubos ependorf. En el caso de las muestras de tejido fueron colocados 150 μL del sobrenadante y 50 μL de estándar (26.25 μM).

A los tubos les fue adicionado 100 μL de lauril sulfato de sodio 8.1% y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se les adicionó 350 μL de ácido tiobarbitúrico 5.2 mg/mL (disuelto en ácido acético 20% pH 3.5). Los tubos fueron mezclados e incubados a 95°C por 60 minutos. Trascurrido éste tiempo, se les dejó enfriar en frío por 5 minutos y fueron centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. 400 μL de éste sobrenadante fueron extraídos con 300 μL de n-butanol. Después de una centrifugación a 10 000g por 5 minutos, 200 μL de n-butanol fueron puestos en una placa para BIO-RAD y leídos a 540 nm.

7.8.7. Determinación inmunoenzimática de los niveles endógenos de TNF- α en estómago.

La determinación del TNF- α se realizó con el producto comercial ALPCO como se describe a continuación.

- Preparación de la curva estándar

Se realizó una curva patrón de TNF- α , en un rango de 0 a 375 pg de TNF- α /mL (Figura 7-8).

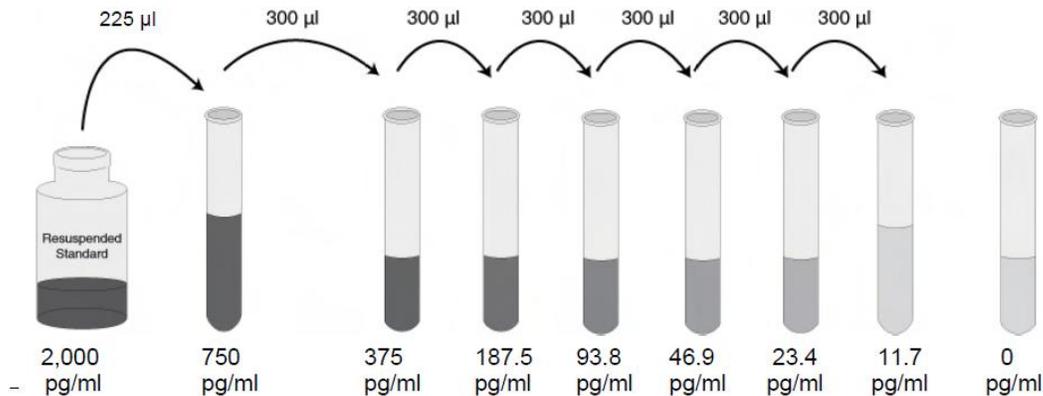


Figura 7-8. Procedimiento para la preparación de las soluciones de la curva patrón de TNF- α

- Preparación de la muestras de tejido gástrico

100 mg de tejido gástrico fue homogeneizado con 700 μ L de buffer de azida de sodio 0.1%. El homogeneizado fue centrifugado a 10 000 rpm por 10 minutos. 500 μ L del sobrenadante fueron diluidos según el tratamiento. Vehículo: 1:1:1; EtOH: 1:1:2; Gli 10: 1:1:8

- Desarrollo del ensayo

80 μ L de muestra diluida o 100 μ L de solución estándar fueron adicionados en los pozos de la placa de ELISA. Después de cada adición de reactivos, la placa se cubrió y dejó en incubación a temperatura ambiente. Una vez transcurrido éste tiempo, la placa fue decantada y lavada con la solución amortiguadora-lavado en 4 ocasiones consecutivas.

En el ensayo se realizaron las siguientes adiciones: 100 μ L del conjugado de biotina, incubación por 1 hora; 100 μ L de la solución de trabajo de streptavidin-HRP, incubación por 30 minutos; 100 μ L de cromógeno estabilizador, incubación por 30 minutos en la oscuridad; 100 μ L de la solución stop (ácido sulfúrico 0.2 N) con agitación suave.

Finalmente la lectura de las absorbancias se realizó a 450 nm en un equipo BIO-RAD 680

7.9. Caracterización del efecto de la administración de glibenclamida sobre el daño gástrico inducido con etanol en ratas hiperglicémicas.

Al décimo día después de la administración del agente hiperglicemiante (aloxan ó estreptozotocina) los animales hiperglicémicos (glucosa noveno día mayor a 250 mg/mL) fueron destinados para la evaluación del efecto de la glibenclamida sobre el daño gástrico inducido con etanol en ratas hiperglicémicas o la determinación de la influencia de glibenclamida en los niveles de glutatión y MDA en ratas hiperglicémicas.

En esta parte de la investigación se realizó un diseño de experimentos factorial (tipo de agente hiperglicemiante y tratamiento experimental, con tres niveles respectivamente) con la finalidad de obtener información sobre la posible interacción de éstos factores.

Para la caracterización del efecto de la administración de glibenclamida sobre el daño gástrico inducido con etanol en ratas hiperglicémicas, los animales de experimentación hiperglicémicos se dividieron al azar en 3 grupos (n≥6) (Figura 7-9). Las ratas del grupo 1 (vehículo) y 2 (Etanol) fueron pre-tratadas con NaOH 0.05M 0.1mL/100g vía i.p., las del grupo 3 (glibenclamida) fueron administradas con glibenclamida a dosis de 10 mg/Kg en NaOH 0.05 M vía i.p. La inducción de la úlcera péptica se realizó pasadas 3 horas y media de acuerdo al procedimiento antes descrito (inducción y evaluación del daño gástrico). En el caso del grupo 1 (vehículo) se administró solución salina en lugar de etanol. El procedimiento antes descrito se representa en la Figura 7-9.

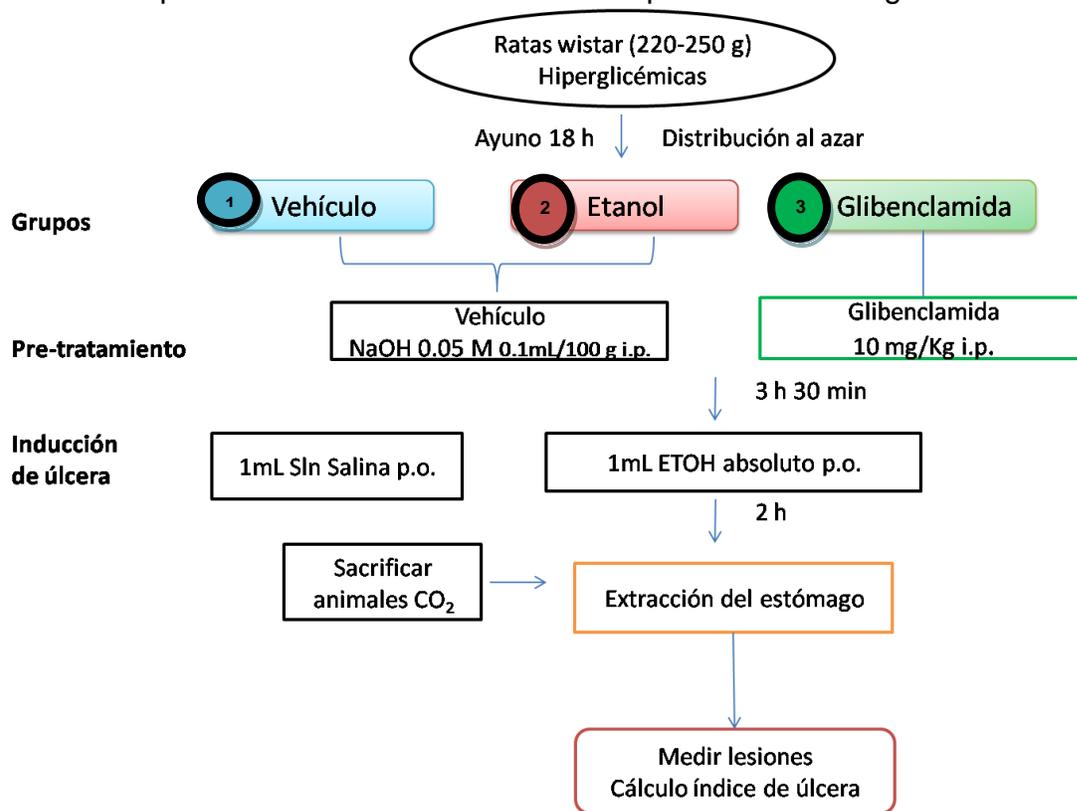


Figura 7-9. Metodología empleada para la caracterización del efecto de la administración de glibenclamida sobre el daño gástrico inducido con etanol en ratas hiperglicémicas

7.10. Influencia de glibenclamida en mediadores de estrés oxidativo en ratas hiperglicémicas.

Los animales de experimentación hiperglicémicos (Figura 7-10) fueron divididos al azar en 3 grupos $n \geq 6$. Las ratas del grupo 1 (vehículo) y 2 (etanol) recibieron un pre-tratamiento con NaOH 0.05M a la dosis de 0.1mL/100g vía i.p. Mientras que el grupo 3 (glibenclamida) fue administrado con glibenclamida a la dosis de 10 mg/kg en NaOH 0.05 M vía i.p. La inducción de la úlcera péptica se realizó después de 3 horas y media para lo cual se administró intragástricamente 1mL de etanol absoluto. En el caso del grupo 1 (vehículo) se administró solución salina en lugar de etanol. Dos horas más tarde el animal fue sacrificado en cámara de CO₂, y de forma inmediata el estómago fue disectado y lavado con solución salina.

El tejido gástrico fue almacenado en el congelador (Thermo Scientific Revco® Value Series Model ULT390-3-A35) a -72°C hasta las determinaciones de glutatión y malondialdehído. Las cuales se realizaron como se describió previamente en otros apartados. Lo anterior se representa en la siguiente Figura 7-10.

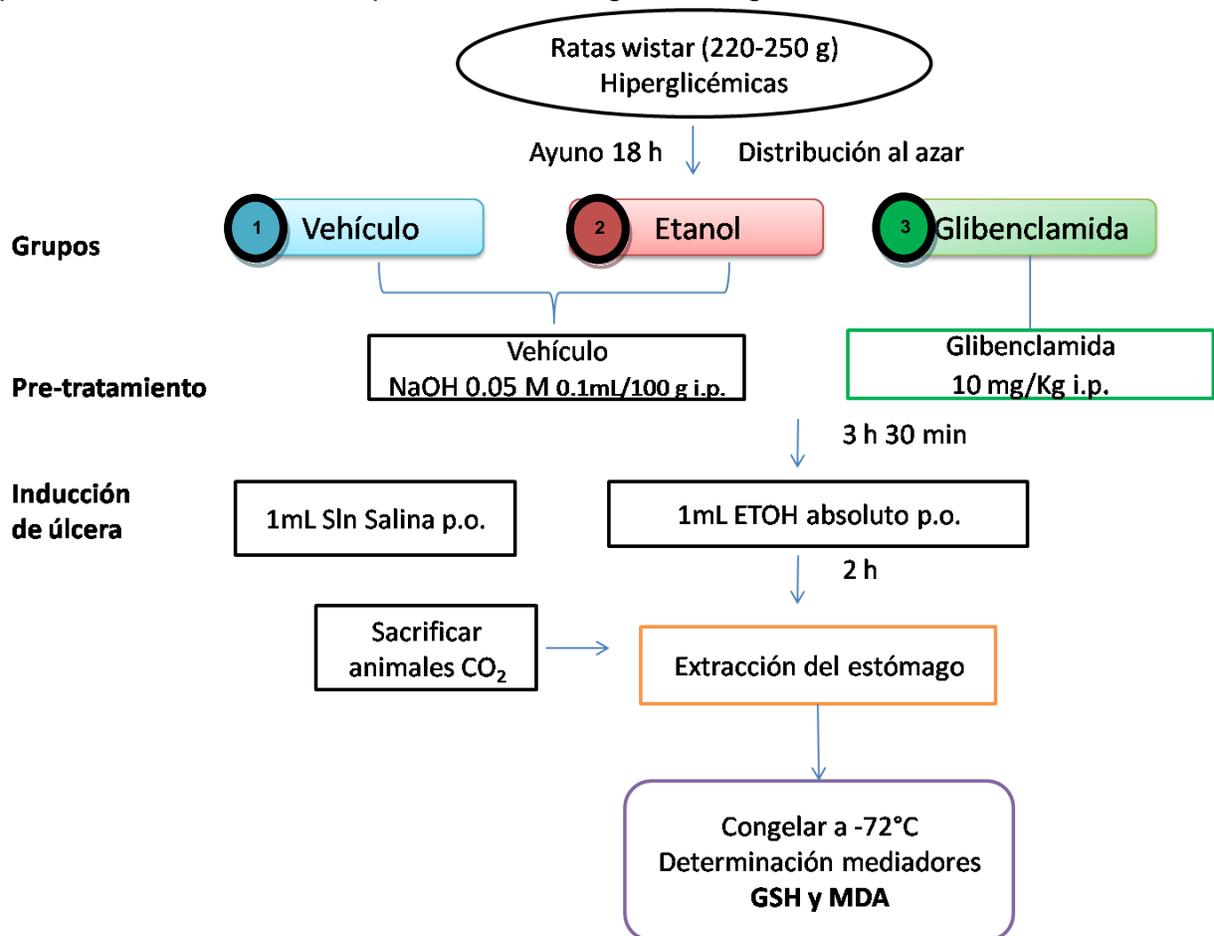


Figura 7-10. Metodología empleada para la determinación del efecto de glibenclamida en los mediadores de estrés oxidativo en ratas hiperglicémicas.

7.11. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se presentan como la media \pm el error estándar de la media (ESM). La comparación entre dos o más grupos se determinó mediante la prueba de análisis de varianza de una vía por rangos Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Tukey según corresponda. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados como muestra de la existencia de diferencias significativas entre medias.

Para la evaluación de la significancia estadística en los experimentos factoriales, se realizó el análisis de varianza de dos vías seguido de la prueba de Holm/Sidack. Empleándose el software estadístico SigmaPlot 11.0.

8. RESULTADOS

Glibenclamida en dosis mayores a 1 mg/kg, mostró efecto gastroprotector significativo ($p < 0.05$) pero no dosis dependiente contra el daño inducido con etanol en animales normoglicémicos (Gráfico 8-1).

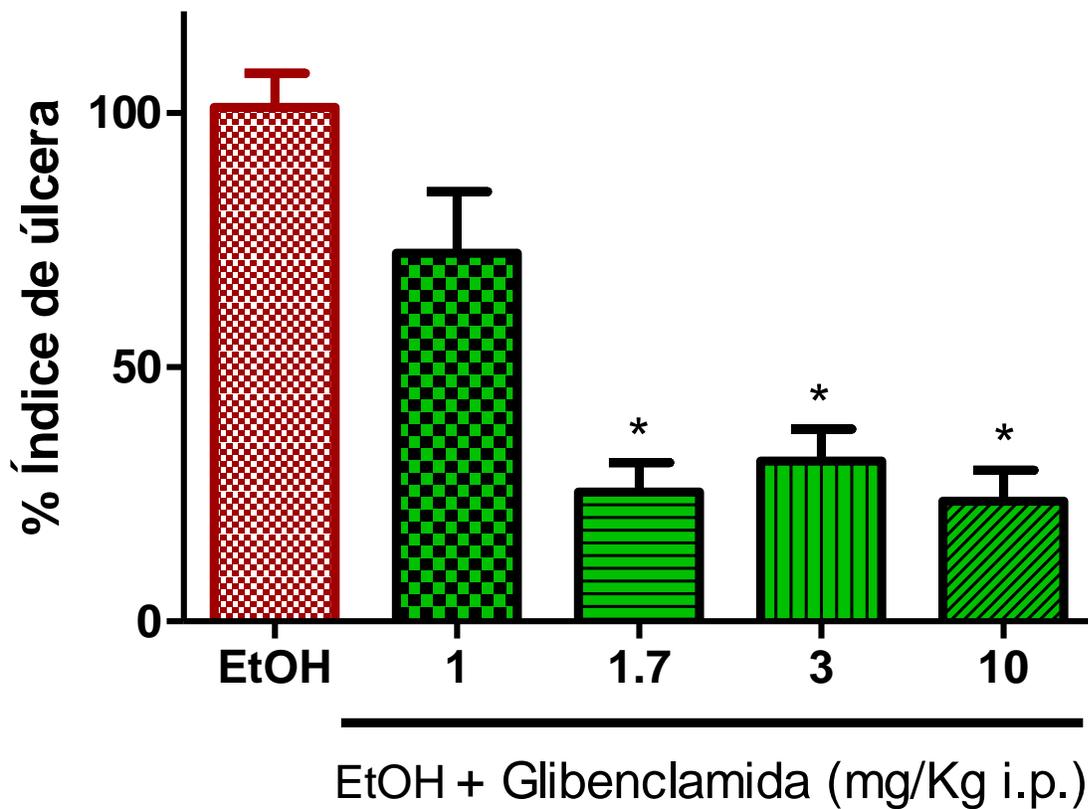


Gráfico 8-1. Efecto gastroprotector de glibenclamida en el daño gástrico inducido con etanol absoluto en ratas normoglicémicas. Los resultados se presentan como % índice de úlcera promedio \pm ESM ($n=8-10$). *Diferencia significativa por la Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn ($p \leq 0.05$) con respecto al grupo tratado únicamente con Etanol.

La glibenclamida (3mg/Kg) presentó un efecto gastroprotector en el modelo de inducción de daño con etanol. El pre-tratamiento con diazoxido no revirtió la actividad protectora de glibenclamida (Gráfico 8-2).

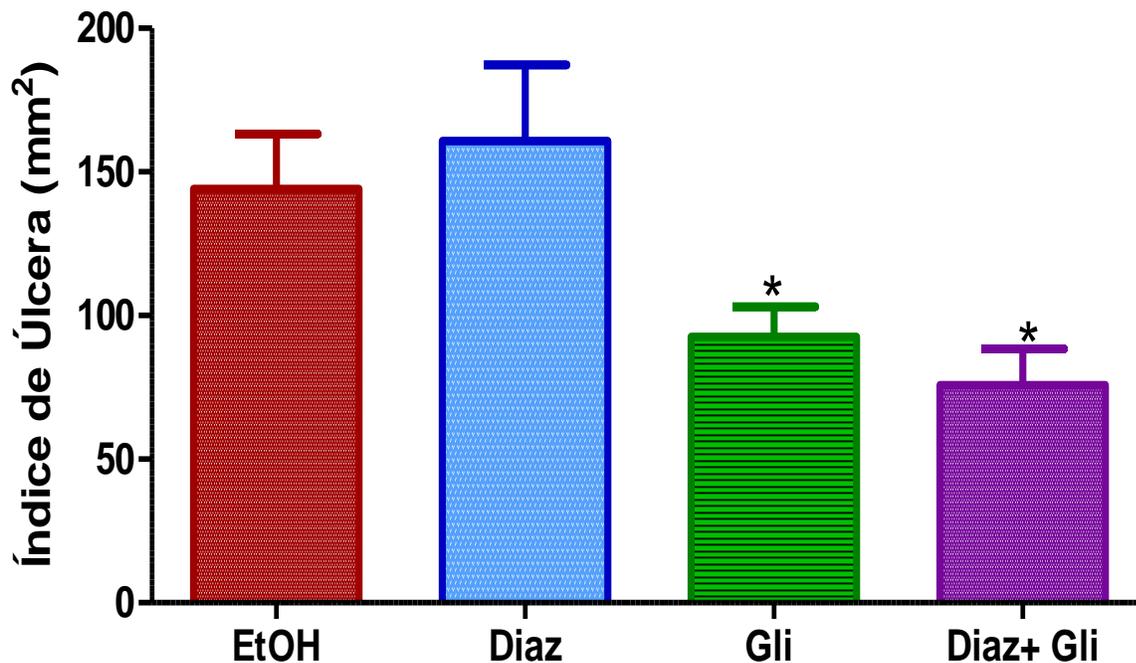


Gráfico 8-2. Efecto del pretratamiento con diazoxido (3mg/Kg i.p.) de glibenclamida (3mg/Kg i.p.) en el daño gástrico inducido con etanol absoluto en ratas normoglicémicas. Los resultados se presentan como la media \pm ESM (n=6). *Diferencia significativa por la Prueba de Kruskal-Wallis/Dunns ($p \leq 0.05$) con respecto al grupo tratado únicamente con Etanol.

La administración de etanol en la mucosa gástrica reveló la disminución de los niveles de diferentes mediadores endógenos como PGE₂, NO (nitritos/nitratos) y glutatión; Adicionalmente elevó los niveles de sulfuro de hidrógeno y MDA en comparación con los grupos tratados con vehículo (Cuadro 8-1). La glibenclamida en este modelo de inducción de úlcera, restableció los niveles gástricos de PGE₂, NO (nitritos/nitratos) y glutatión; así mismo disminuyó el nivel de sulfuro de hidrógeno a niveles basales. Sin embargo la glibenclamida no ejerció influencia sobre los niveles de MDA, ni sobre los de TNF- α en la mucosa gástrica (Cuadro 8-1).

Cuadro 8-1. Efecto de glibenclamida (10 mg/Kg, i.p.) en la modulación de mediadores endógenos en el modelo de inducción de úlcera con etanol absoluto en ratas normoglicémicas. Los resultados se presentan como niveles promedio \pm ESM en estómago de ratas wistar (n=8-10).^aDiferencia significativa por la Prueba de ANDEVA por rangos Kruskal-Wallis/Tukey ($p \leq 0.05$) con respecto al grupo tratado únicamente con vehículo, ^bP ≤ 0.05 vs. glibenclamida.

Tratamiento experimental	Mediadores gastroprotección			Mediadores estrés oxidativo		Mediador en inflamación
	PGE2 (ng/ g tejido)	Nitritos/nitratos (ng/ g tejido)	Sulfuro de hidrógeno (μ mol/ g tejido)	Glutatión (μ mol/ g tejido)	Lipoperoxidación MDA (nmol/ g tejido)	TNF- α (nmol/ g tejido)
Vehículo	139.20 \pm 34.4	119.6 \pm 18.7	4.99 \pm 0.16	105.2 \pm 2.62	33.06 \pm 0.91	1.18 \pm 0.13
Etanol	68.26 \pm 4.7 ^a	61.4 \pm 4.4 ^{a,b}	5.83 \pm 0.25 ^b	66.07 \pm 7.16 ^{a,b}	62.19 \pm 0.94 ^a	1.55 \pm 0.09
EtOH + Glibenclamida (10mg/Kg)	167.0 \pm 8.7	107.9 \pm 14.1	4.77 \pm 0.09	116.2 \pm 14.16	58.30 \pm 1.42	1.18 \pm 0.08

La Glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) no presentó efecto gastroprotector en los animales hiperglicémicos tratados con aloxan (150 mg/Kg) o con estreptozotocina (50mg/Kg) (Gráfico 8-3) como lo presentó en los animales normoglicémicos. En este respecto el tratamiento estadístico de los resultados mostró que existe una interacción significativa entre los factores animales normoglicémicos y animales hiperglicémicos, pero no entre los tipos de agentes hiperglicemiantes empleados aloxan y estreptozotocina

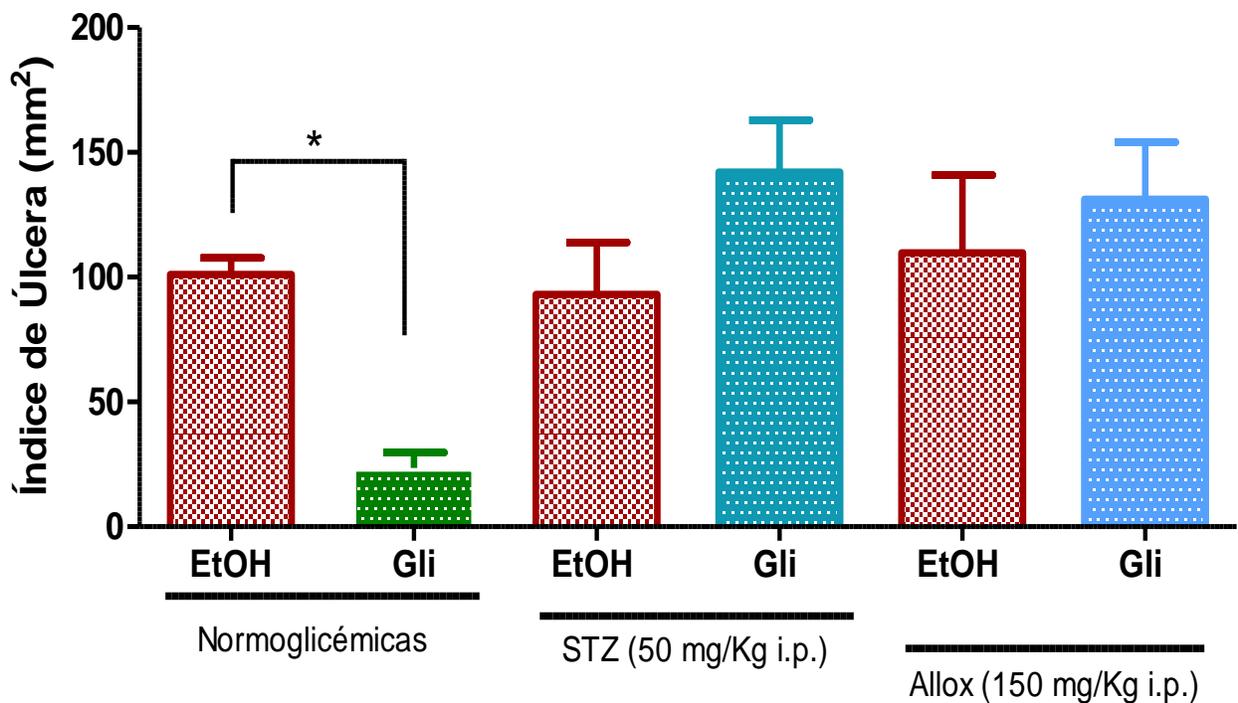


Gráfico 8-3. Efecto de glibenclamida (10 mg/Kg i.p.) en el daño gástrico inducido con etanol absoluto en ratas tratadas con diferentes agentes hiperglicemiantes (STZ ó Allox). Los resultados se presentan como índice de úlcera promedio \pm ESM (n=8-10). Diferencia significativa por la prueba de ANDEVA de dos vías/Holm-sidack ($p \leq 0.05$) con respecto al grupo de ratas normoglicémicas tratado únicamente con glibenclamida.

El tratamiento con los agentes hiperglicemiantes aloxan y estreptozotocina redujo los niveles basales gástricos de glutatión (Cuadro 8-2). También la inducción de la úlcera con etanol disminuyó los niveles de glutatión presentes en la mucosa gástrica de los animales normoglicémicos así como en los hiperglicémicos (Cuadro 8-2). El pre-tratamiento con glibenclamida (10mg/Kg) no restaura los niveles de glutatión gástricos en las ratas (Cuadro 8-2).

Cuadro 8-2. Efecto de glibenclamida (10 mg/Kg) en la modulación de niveles de glutatión en el modelo de inducción de úlcera con etanol absoluto en ratas tratadas con diferentes agentes hiperglicemiantes. Los resultados se presentan como niveles promedio \pm ESM en estómago de ratas wistar (n=6). ^aDiferencia estadísticamente significativa por la prueba de ANDEVA de dos vías/ Holm-Sidak ($P \leq 0.05$) con respecto al grupo tratado con vehículo normoglicémicas, ^b $P \leq 0.05$ vs.glibenclamida normoglicémicas, ^c $P \leq 0.05$ vs.etanol estreptozocina, ^d $P \leq 0.05$ vs.glibenclamida estreptozotocina, ^e $P \leq 0.05$ vs.vehículo estreptozotocina, ^f $P \leq 0.05$ vs.vehículo aloxan, ^g $P \leq 0.05$ vs.glibenclamida aloxan

Niveles de glutatión ($\mu\text{mol/g}$ tejido)

Tratamiento experimental	Agente hiperglicemiante		
	Ninguno (normoglicémicas)	Estreptozotocina STZ	Aloxan
Vehículo	105.2 \pm 2.62 ^{e, f}	70.63 \pm 19.87 ^{c, d}	53.34 \pm 10.71
Etanol	66.79 \pm 8.22 ^{a, b}	31.90 \pm 4.99	36.94 \pm 4.80
EtOH + Glibenclamida (10 mg/Kg)	122.57 \pm 14.60 ^{d, g}	24.77 \pm 3.19	33.88 \pm 8.38

El nivel de MDA (indicador de lipo-peroxidación) fue aumentado ($p < 0.05$) por el agente hiperglicemiante estreptozotocina pero no por aloxan con respecto al nivel de las normoglicémicas (Cuadro 8-3). La inducción de la úlcera con etanol en animales normoglicémicos así como en los hiperglicémicos aloxan incrementó la concentración de MDA gástrico ($p < 0.05$) pero no en los tratados con estreptozotocina (Cuadro 8-3). El pre-tratamiento de glibenclamida no modificó los niveles de MDA en la mucosa gástrica en el modelo de inducción de daño gástrico con etanol tanto en animales normoglicémicos como en los animales hiperglicémicos tratados con aloxan o estreptozotocina (Cuadro 8-3).

Cuadro 8-3. Efecto de glibenclamida (10 mg/Kg) en la modulación de niveles de malondialdehído (MDA) en estómago en el modelo de inducción de úlcera con etanol absoluto en ratas hiperglicémicas. Los resultados se presentan como niveles promedio \pm ESM en estómago de ratas wistar ($n=6$). ^aDiferencia significativa por la prueba de ANDEVA de dos vías/ Holm-Sidak ($P \leq 0.05$) con respecto al grupo tratado con etanol normoglicémicas, ^b $P \leq 0.05$ vs glibenclamida normoglicémicas, ^c $P \leq 0.05$ vs glibenclamida estreptozotocina, ^d $P \leq 0.05$ vs. etanol aloxan, ^e $P \leq 0.05$ vs. glibenclamida aloxan, ^f $P \leq 0.05$ vs. vehículo estreptozotocina, ^g $P \leq 0.05$ vs. etanol estreptozotocina.

Niveles de malondialdehído (MDA) (nmol/ g tejido)

Tratamiento experimental	Agente hiperglicemiante		
	Ninguno (normoglicémicas)	Estreptozotocina STZ	Aloxan
Vehículo	33.06 \pm 0.90 ^{a,b, f}	38.18 \pm 0.98 ^c	36.25 \pm 0.95 ^{d, e}
Etanol	62.19 \pm 0.94 ^{b, d, g}	41.20 \pm 1.11	40.21 \pm 0.51
EtOH + Glibenclamida (10 mg/Kg)	58.30 \pm 1.42 ^{c, e}	43.86 \pm 1.27	42.11 \pm 0.64

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La glibenclamida presentó actividad gastroprotectora significativa en el modelo de inducción de úlcera con etanol en ratas Wistar macho normoglicémicas (Gráfica 8-1). El mecanismo de acción gastroprotector de la glibenclamida está relacionado con la modulación de los niveles de los mediadores endógenos: prostaglandina E₂, óxido nítrico, sulfuro de hidrógeno y glutatión en la mucosa gástrica (Cuadro 8-1). Este efecto gastroprotector de la glibenclamida está de acuerdo con Peskar *et al.*, 2002. Estos autores reportan que la actividad gastroprotectora de este fármaco se presentó a dosis mayores de 10mg/Kg en un modelo de inducción de úlcera con etanol al 70%.

Existen diversos estudios en donde la glibenclamida se ha empleado como una herramienta útil para comprender la participación de los canales K⁺_{ATP} en el mecanismo de acción de diversas sustancias antiulcerosas (Medeiros *et al.*, 2008; Chávez-Piña *et al.*, 2010; Pazoki-Toroudi *et al.*, 1999; Akar *et al.*, 1999). El 16,16-dimetil-PGE₂, etanol 20%, salicilato de sodio, cloruro de litio, dietilmaleato, dimercaprol, cromakalima y diazoxido activan el canal K⁺_{ATP} aumentando el flujo sanguíneo gástrico, permitiendo la llegada de nutrientes y removiendo las sustancias tóxicas de la mucosa gástrica (Peskar *et al.*, 2002; Doi *et al.*, 1998). Pazoki-Toroudi *et al.*, 1999 reportaron que la activación de los canales K⁺_{ATP} presentes en la microcirculación gástrica, desarrolló efectos protectores en varios modelos de inducción de daño gástrico. Por otro lado la glibenclamida ha sido ampliamente usada como antagonista de los canales K⁺_{ATP}, revirtiendo el efecto protector de sustancias activadoras (Peskar *et al.*, 2002; Doi *et al.*, 1998). En el presente trabajo el pre-tratamiento a la dosis de 3mg/Kg con diazoxido no revirtió el efecto gastroprotector de la glibenclamida (Gráfico 8-2). Esto sugiere que el efecto gastroprotector de glibenclamida no está relacionado con la participación de los canales K⁺_{ATP} en la microcirculación gástrica.

Gribble y Reiman, 2003 demostraron que la glibenclamida posee diferentes velocidades de disociación de los canales K⁺_{ATP}. En los canales localizados en las células β del páncreas su velocidad de disociación es baja, debido a que su unión a la subunidad SUR1 se realiza por sus grupos químicos sulfonilurea y benzamino. Por otro lado en los canales K⁺_{ATP} del tejido vascular la unión de la glibenclamida es rápidamente reversible, debido a que se une con la subunidad SUR2 únicamente mediante su grupo benzamino (Gribble y Reiman, 2003).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la unión de la glibenclamida a las venas de la mucosa gástrica se ve rápidamente revertida, por lo que no participa en su actividad gastroprotectora.

En estudios previos se ha reportado que la inducción de la úlcera con etanol origina zonas de lesiones hemorrágicas con congestión vascular y necrosis (Al-Shabanah *et al.*, 2000). Estas lesiones son causadas por distintos factores: daño directo sobre las células epiteliales, solubilización de la superficie de la mucosa gástrica (Szabo, 1990) y constricción de vénulas submucosas (Yonei y Guth, 1991).

Por consiguiente existe alteración de los niveles de las sustancias endógenas de gastroprotección, como la disminución de los niveles de prostaglandinas (Chávez-Piña y Navarrete, 2009); una reducción en la actividad de la enzima NOS y consecuentemente una reducción de los niveles de óxido nítrico (Chávez-Piña *et al.*, 2011) y también la sobreproducción de sulfuro de hidrógeno en la mucosa gástrica (Chávez-Piña *et al.*, 2010).

Los resultados del presente trabajo corroboran lo antes mencionado ya que la inducción de la úlcera con etanol disminuyó los niveles de PGs y óxido nítrico; en contraste incrementó los niveles de sulfuro de hidrógeno (Cuadro 8-1). La glibenclamida a 10mg/kg restauró los niveles de PGE₂ y óxido nítrico, mientras que disminuyó el sulfuro de hidrógeno a niveles basales (Cuadro 8-1). Por lo tanto se puede considerar que los efectos gastroprotectores de la glibenclamida están relacionados con un incremento de los factores de defensa de la mucosa, los cuales incluyen la regulación de la secreción de moco-bicarbonato y el aumento en el flujo sanguíneo por parte de las prostaglandinas y el óxido nítrico gástrico (Laine *et al.*, 2008; Wallace y Granger, 1996). Simultáneamente el sulfuro de hidrógeno evita la adherencia de leucocitos al endotelio vascular (Fiorucci *et al.*, 2005) y medía la microcirculación gástrica mediante la activación directa de los canales K⁺_{ATP} (Tang *et al.*, 2010).

Es necesario considerar al estrés oxidativo como un factor importante en el desarrollo del daño gástrico con etanol (Nagy *et al.*, 2007). En este aspecto, la generación de radicales libres y el aumento de la lipido peroxidación llevan al daño endotelial y a su vez abaten los niveles de la sustancia antioxidante glutatión (Nagy *et al.*, 2007).

El pre-tratamiento con la glibenclamida ejerció un efecto regulador sobre los niveles de glutatión en la mucosa gástrica (Cuadro 8-1), promoviendo un incremento en las defensas antioxidantes endógenas que neutralizan a estos radicales libres. A pesar de que el pre-tratamiento de la glibenclamida incrementó los niveles de glutatión, no modificó el nivel del malondialdehído; indicador de estrés oxidativo (Cuadro 8-1). Lo que sugiere que la administración de etanol impacta sobre otros sistemas antioxidantes del estómago y aparentemente la glibenclamida no ejerce modulación sobre los mismos.

Adicionalmente el TNF- α también se relaciona en el daño con etanol, por ser una citoquina característica de las primeras fases de la inflamación (Appleyard *et al.*, 1996; Santucci *et al.*, 1984). En el presente estudio el nivel del TNF- α no fue modulado por el pre-tratamiento con glibenclamida (Cuadro 8-1). Con base en esto se propone que su expresión no es participe del mecanismo gastroprotector de la glibenclamida.

Por otra parte, los resultados de la investigación sobre el efecto de la glibenclamida en modelos de hiperglicemia con aloxan o estreptozotocina contra el daño gástrico inducido con etanol, muestran que no se presenta actividad gastroprotectora en ninguno de los modelos de hiperglicemia empleados (Gráfico 8-3).

Los modelos animales para el estudio de la diabetes aloxan y estreptozotocina causan un estado hiperglicémico por una disminución de las células beta, que ocasiona una reducción de la liberación de insulina (Gupta *et al.*, 2004).

La hiperglicemia produce daño oxidativo por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) desarrollando complicaciones (Mohamed *et al.*, 1999). El estrés oxidativo en la diabetes coexiste con una reducción de la capacidad antioxidante endógena, lo cual puede aumentar los efectos negativos de los radicales libres (Oberley, 1988). En relación con este desbalance redox, los resultados del presente estudio demuestran que los niveles de glutatión basales en los modelos de hiperglicemia se encontraron por debajo de los correspondientes a los animales normoglicémicos (Cuadro 8-2). Esta disminución en los niveles de glutatión representa un incremento en su uso por parte del estrés oxidativo (Matcovis *et al.*, 1982); aunado a esta situación la inducción de la úlcera con etanol agravó la reducción de los niveles de glutatión en la mucosa gástrica. Contrariamente a lo esperado, la glibenclamida no reguló los niveles de glutatión en los animales hiperglicémicos (Cuadro 8-2).

A pesar de que en estudios previos la glibenclamida mostró propiedades para: normalizar los niveles de la catalasa en los tejidos de ratas diabéticas (pulmones, corazón, cerebro, riñón) (Tüzun *et al.*, 1999) y de la actividad de la superóxido dismutasa en hígado de ratas diabetizadas con aloxan (Altan *et al.*, 1994); estas actividades no pudieron ser relacionadas con algún efecto protector de la mucosa en las ratas hiperglicémicas, como lo observado con los fármacos antidiabéticos metformina y rosiglitazona (Morsy *et al.*, 2010).

Además los resultados obtenidos sobre los niveles de lipido peroxidación basales en el estómago de las ratas hiperglicémicas tratadas con estreptozotocina muestran un incremento en comparación con las ratas normoglicémicas, lo cual está relacionado con el desarrollado estrés oxidativo que se presenta durante el estado hiperglicémico (Tunali y Yanardag, 2006). En contraste, con aloxan los niveles de MDA no se modificaron (Cuadro 8-3). A su vez la glibenclamida tampoco mostró efecto regulador sobre la concentración de MDA en la mucosa gástrica en los modelos de hiperglicemia evaluados en este trabajo.

Siguiendo con los efectos del estrés oxidativo en los modelos de hiperglicemia empleados, destaca la observación de que el nivel de MDA gástrico no fue elevado con la inducción de la úlcera con etanol.

Debido a que en el estado hiperglicémico la capacidad plasmática antioxidante se ve significativamente incrementada, viéndose reflejada principalmente en un aumento del nivel de la vitamina E, lo que es pertinente pues ésta sustancia modula el estrés oxidativo e incrementa la resistencia de los eritrocitos a la oxidación (Feillet-Coudray *et al.*, 1999).

En resumen, el estado hiperglicémico caracterizado por un desarrollado estrés oxidativo ocasiona diversos daños a los tejidos, la severidad de éste daño depende del tipo de células involucradas. Se ha reportado que las células del tejido vascular endotelial son más susceptibles al daño causado por los radicales libres (Giacco y Brownlee, 2010). Esta situación repercute en la integridad de la microcirculación sanguínea, que es un mecanismo de gastroprotección principal contra el daño inducido por agentes químicos (Wallace y Granger, 1996). Lo cual puede desencadenar en una afectación en la actividad de los mediadores endógenos protectores como las prostaglandinas, sulfuro de hidrógeno y óxido nítrico, que son moduladores del flujo sanguíneo gástrico.

Aunado a esto la disminución del sistema antioxidante glutatión y el incremento de los niveles de malondialdehído agravan el deterioro de los factores de defensa de la mucosa y la hace más susceptible al daño. Lo que explica que la glibenclamida no ejerciera actividad gastroprotectora en ninguno de los modelos de hiperglicemia probados en este trabajo; dado que su mecanismo de acción gastroprotector está relacionado con la regulación de los mediadores endógenos protectores de la mucosa gástrica.

Cabe destacar que el presente estudio es el primero en demostrar el efecto gastroprotector de la glibenclamida en los animales normoglicémicos en el modelo de inducción de úlcera con etanol. Así como de la modulación de los mediadores endógenos prostaglandinas E₂, óxido nítrico, sulfuro de hidrógeno y glutatión en su mecanismo de acción protector de la mucosa gástrica. Por el contrario en ratas hiperglicémicas inducidas con aloxan ó estreptozotocina no se observó ningún efecto gastroprotector por parte de la glibenclamida.

10. CONCLUSIONES

- La glibenclamida presenta un efecto gastroprotector en el modelo de inducción de úlcera con etanol en ratas normoglicémicas.
- El efecto gastroprotector de glibenclamida en ratas normoglicémicas está relacionado con la regulación de los mediadores endógenos prostaglandina E₂, óxido nítrico, sulfuro de hidrógeno y glutatión; pero no con los canales de K⁺_{ATP} ni con la regulación del malondialdehído y factor de necrosis tumoral alfa.
- La glibenclamida no presenta efecto gastroprotector ni modulador de los mediadores de glutatión y malondialdehído en el modelo de inducción de úlcera con etanol en ratas hiperglicémicas con aloxan y estreptozotocina.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar la actividad gastroprotectora de la glibenclamida utilizando inhibidores de NO, PGE₂, H₂S, GSH, respectivamente; sobre lesiones gástricas inducidas con etanol en ratas normoglicémicas, con la finalidad de tener más información acerca de su mecanismo de acción gastroprotector y determinar su posible blanco farmacológico.

- Determinar si la glibenclamida estimula la producción de moco mediante la regulación de los mediadores de gastroprotección PGE₂ y óxido nítrico como parte de su mecanismo gastroprotector.

12. ANEXOS

A. Fundamento de la determinación espectrofotométrica de óxido nítrico en una muestra.

La determinación del óxido nítrico por la reacción de Griess se basa en la formación de un compuesto colorido a partir de los metabolitos estables del óxido nítrico: los nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-) (Green *et al.*, 1982). El nitrato es liberado del tejido a través de fragmentación mecánica con tijeras. Seguidamente es convertido a nitritos por acción de la enzima nitrato reductasa (Tenorio *et al.*, 2005) (Figura 12-1.A). El nitrito reacciona con la sulfanilamida para formar un intermediario sal de diazonio (Figura 12-1.B), el cual en presencia de la N-(1-naftil) etilendiamina produce un compuesto de diazonio de color purpura intenso (Figura 12-1.C) (Green *et al.*, 1982).

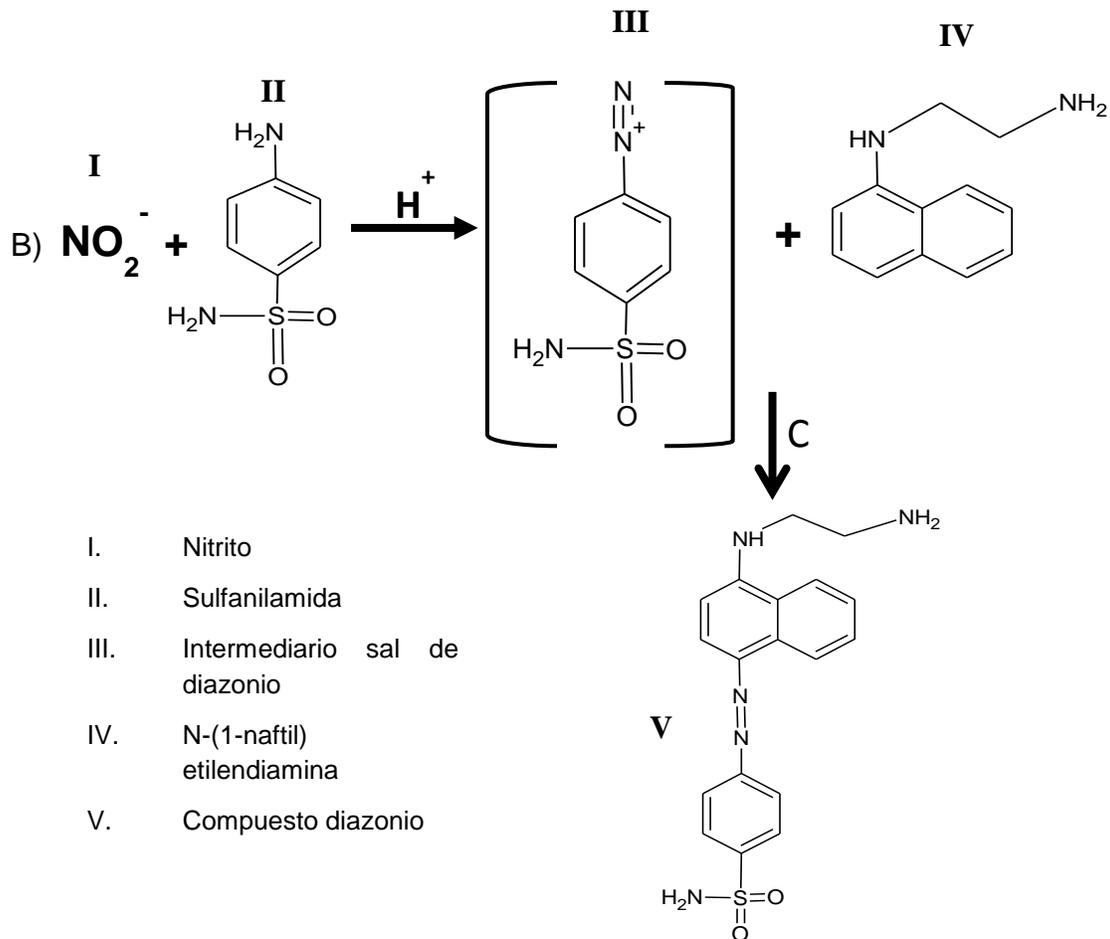


Figura 12-1. Reacciones involucradas en la determinación de óxido nítrico en estómago.

B. Fundamento de la determinación inmuno-enzimática de prostaglandina E₂.

El inmunoensayo-enzimático (EIA) consiste en la competencia entre la prostaglandina E₂ (PGE₂) y el trazador de PGE₂ (conjugado de PGE₂-acetilcolinesterasa) por una cantidad limitada del anticuerpo monoclonal de PGE₂. La concentración de PGE₂ en la celda es inversamente proporcional a la cantidad del trazador de PGE₂ que fue desplazado por la unión del PGE₂ al anticuerpo PGE₂.

En el presente ensayo es necesario considerar la conversión de los metabolitos de PGE₂ en un derivado estable, el cual puede ser cuantificado fácilmente por el EIA (Figura 12-2).

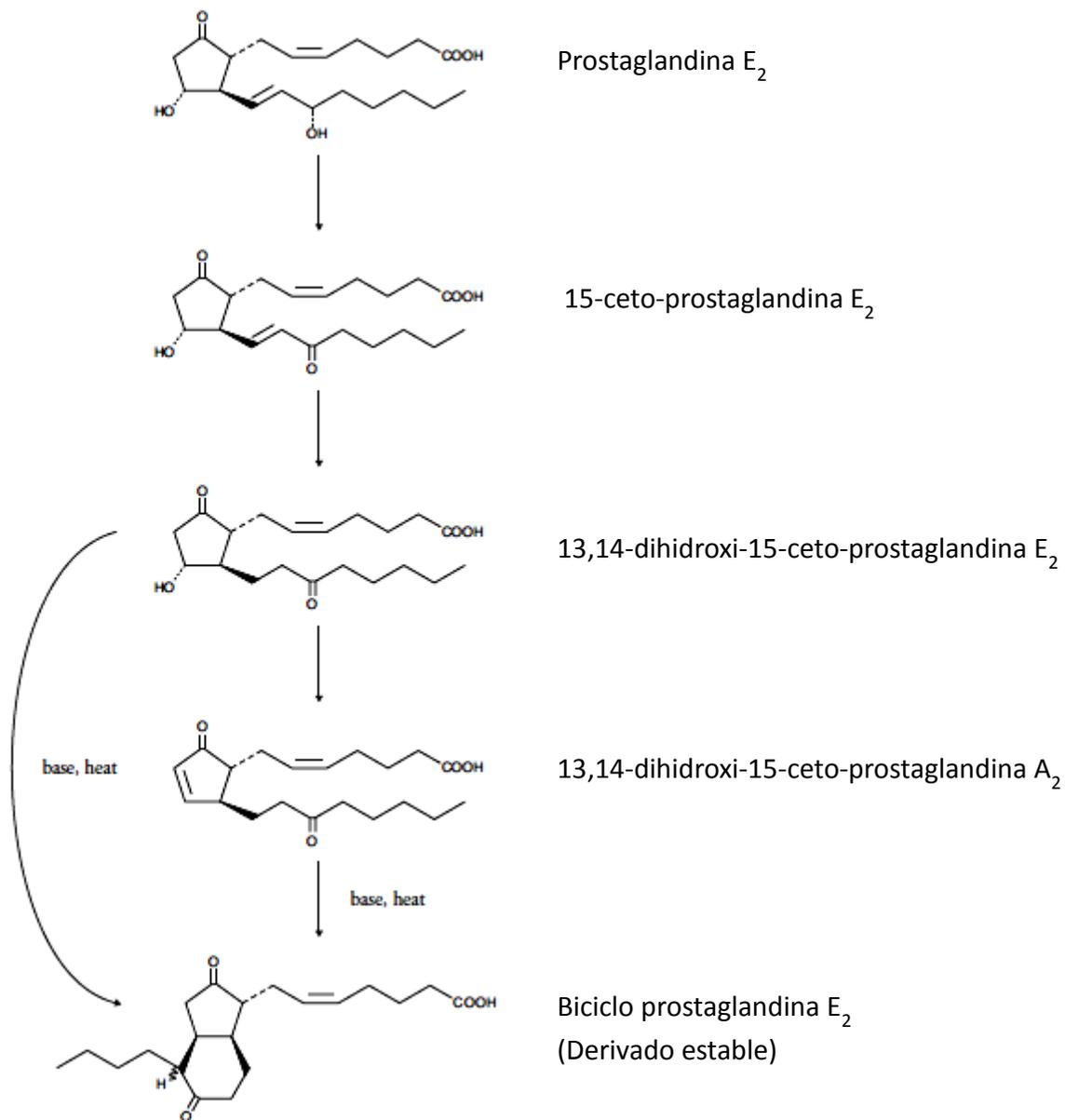


Figura 12-2. Formación del biciclo de PGE₂

Al adicionar la mezcla de reacción, el anticuerpo IgG-policlonal de cabra que se encuentra en las placas se une al anti-PGE₂. Seguidamente el PGE₂ de las muestras ó el trazador (por la parte PGE₂) se enlaza al anti-PGE₂. El trazador unido con anti- PGE₂ se cuantifica mediante la medición de la actividad de la acetilcolinesterasa con el reactivo de Ellman (acetiltiocolina + ácido 5,5-ditio-bis 2-nitrobenzoico). Para ello la acetiltiocolina es hidrolizada por la acetilcolinesterasa del trazador con la consiguiente producción de tiocolina. La reacción no enzimática de la tiocolina con el DTNB produce el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (Figura 12-3), que es de color amarillo y absorbe a 412 nm.

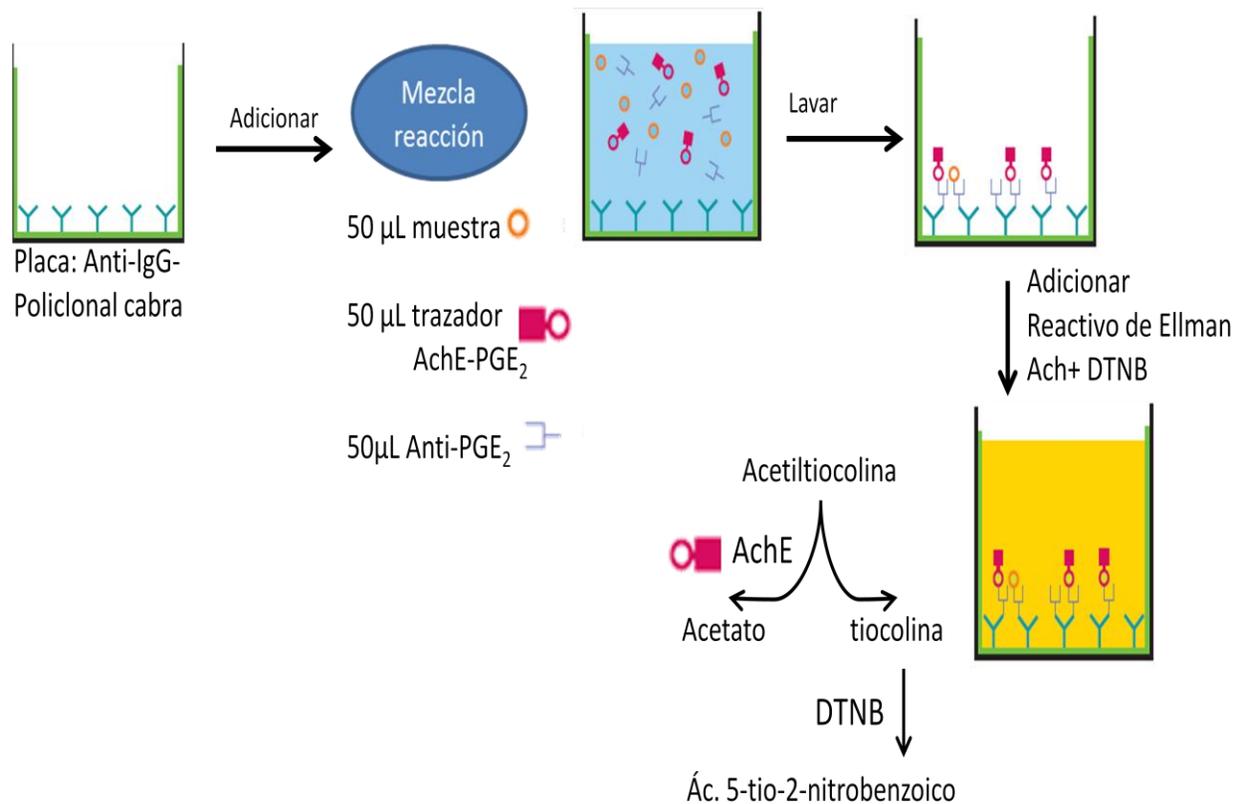


Figura 12-3. Secuencia de pasos para la determinación por EIA de PGE₂

C. Fundamento de la determinación espectrofotométrica de sulfuro de hidrógeno en una muestra.

El fundamento de la presente determinación se basa en la transformación del sulfuro de hidrógeno en un compuesto estable que reacciona para producir azul de metileno (Bulatov *et al.*, 2006). El sulfuro de hidrógeno volátil liberado del tejido reacciona con acetato de zinc en exceso para producir sulfuro de zinc (Figura 12-4.A). La N,N-dimetil-p-fenilendiamina es oxidada por el cloruro férrico generando un intermediario reactivo (Figura 12-4.B). El ion sulfuro reacciona con el intermediario reactivo para formar el compuesto azul de metileno (Figura 12-4.C) (Bulatov *et al.*, 2006).

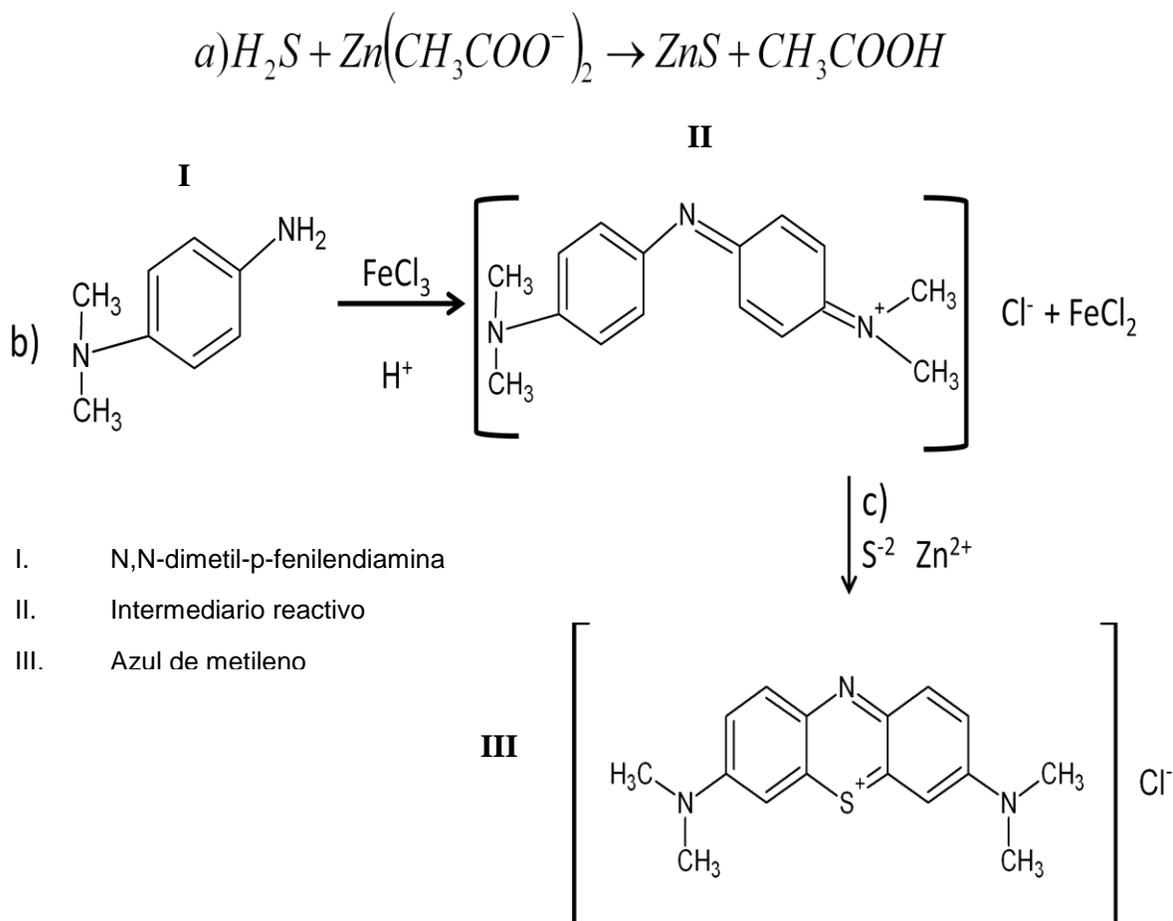


Figura 12-4. Reacciones involucradas en la determinación de sulfuro de hidrógeno en estómago.

D. Fundamento de la determinación espectrofotométrica de glutatión en una muestra.

La determinación espectrofotométrica del glutatión se fundamenta en la formación de un compuesto colorido a partir de la reacción de reducción del glutatión y el ácido 5,5-ditio-bis 2-nitrobenzoico. El glutatión proveniente de las muestras funciona como agente reductor del ácido 5,5-ditio-bis 2-nitrobenzoico (DTNB) con la consiguiente producción del anión ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico y la forma oxidada del glutatión (Figura 12-5). El ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico es un cromóforo de color amarillo, estable a pH mayores a 8 (Lindsay y Sedlak, 1968).

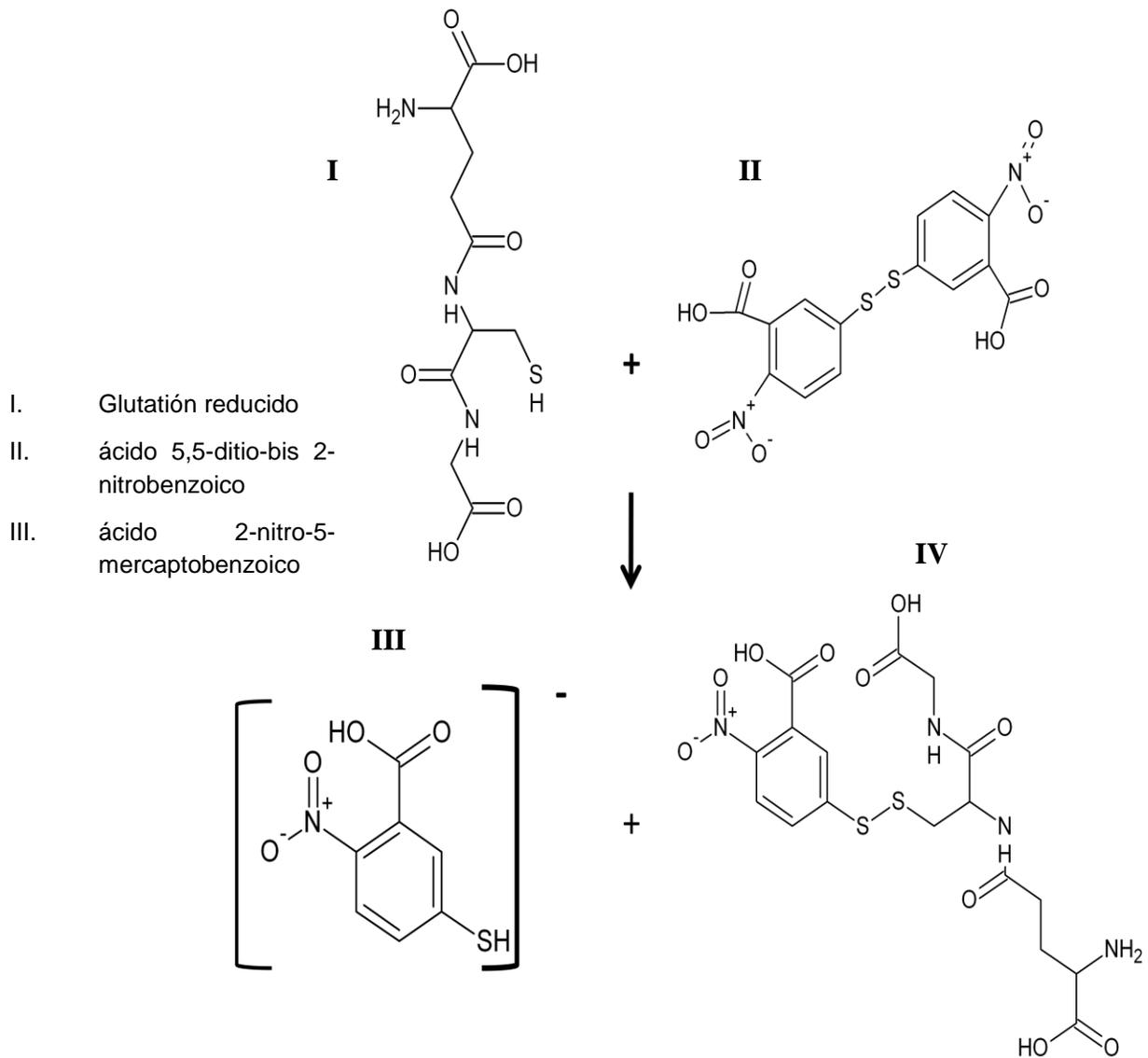


Figura 12-5. Reacciones involucradas en la determinación de glutatión en estómago.

E. Fundamento de la determinación espectrofotométrica de malondialdehído (MDA) en una muestra.

El presente ensayo se basa en la formación de un compuesto colorido por la reacción entre el malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico. El ácido tiobarbitúrico (TBA) y el malondialdehído reaccionan a temperatura elevada y medio ácido para producir un aducto de MDA-TBA colorido (Yagi, 1998; Armstrong y Browne, 1994) (Figura 12-6).

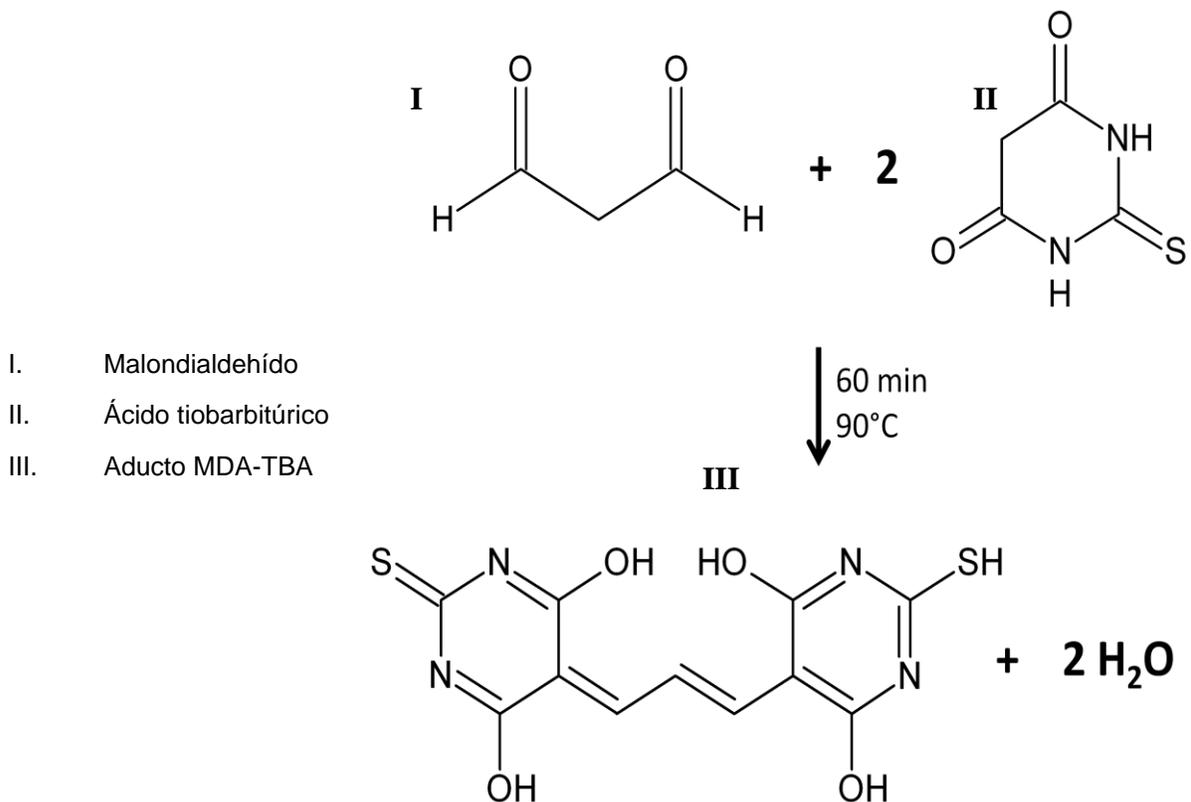


Figura 12-6. Reacciones involucradas en la determinación de malondialdehído en estómago.

F. Fundamento de la determinación espectrofotométrica de TNF- α en una muestra.

La determinación del factor de necrosis tumoral alfa se fundamenta en el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) tipo sandwich. En este método, un primer anticuerpo específico se encuentra absorbido en la placa. Cuando la sustancia de interés (antígeno) está presente se enlaza al anticuerpo de la placa. Seguidamente un segundo anticuerpo específico-ligado a enzima se une al antígeno. La enzima ligada al anticuerpo cataliza una reacción para producir un compuesto colorido. Entonces la presencia del producto colorido es indicador de la presencia del antígeno (Goldsby *et al.*, 2000).

El TNF- α liberado del tejido se une al anticuerpo específico Anti TNF- α de la placa. Después el conjugado de biotina Anti TNF- α se enlaza también con el TNF- α de las muestras. Posteriormente, al conjugado de biotina del Anti- TNF- α se une la enzima streptavidin-Horseradish peroxidasa (HRP) formando un complejo anticuerpo ligado a enzima. Dicha enzima HRP cataliza la reacción de la tetrametilbenzidina (TMB) con la siguiente formación de un crómoforo. El color es directamente proporcional a la concentración del antígeno TNF- α en las muestras (Figura 12-7).

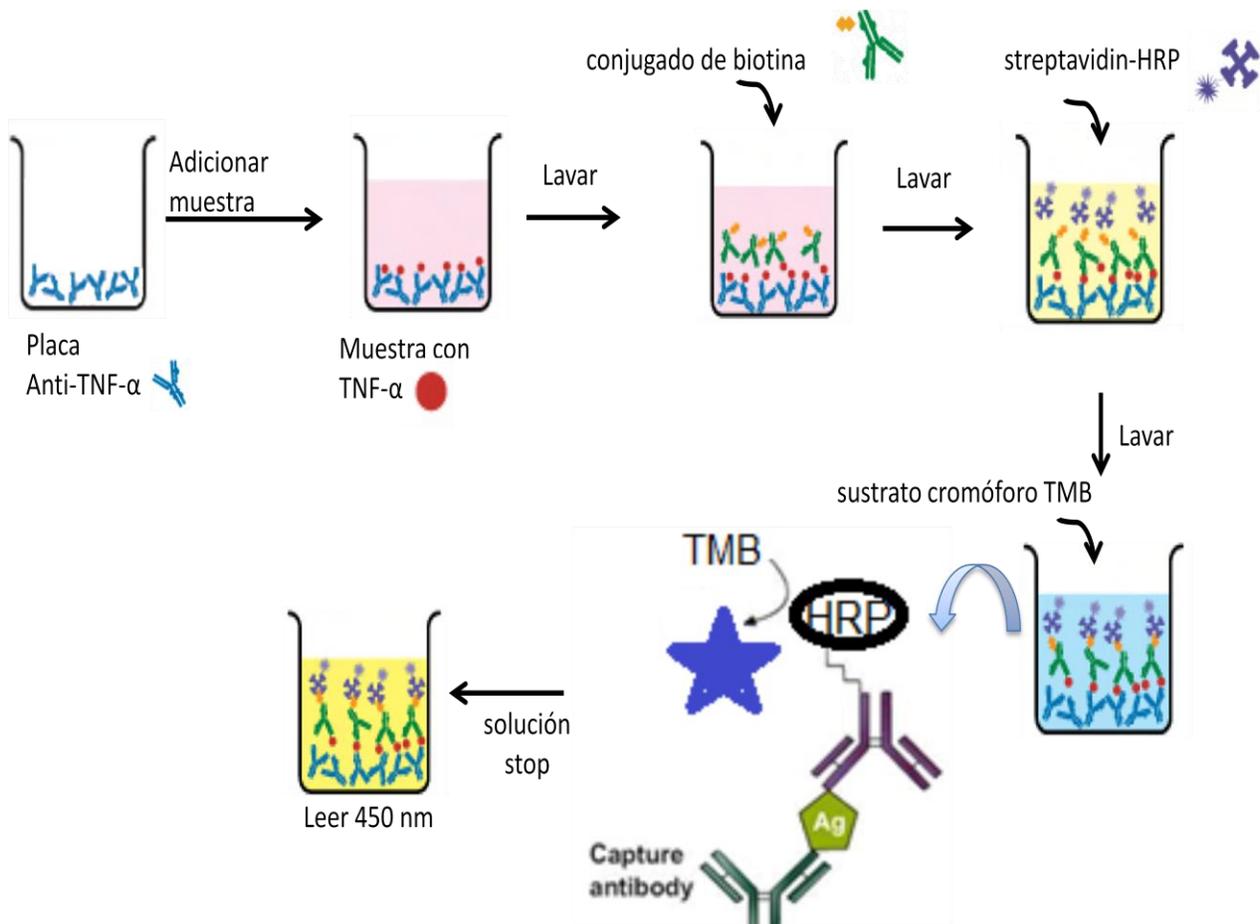


Figura 12-7. Pasos para la prueba de ELISA en la determinación del TNF- α

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abell TL, Camilleri M, Hench VS, Malagelada J-R. (1991). Gastric electromechanical function and gastric emptying in diabetic gastroparesis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 3:163-167
- Aguilar-Bryan L, Bryan J, Nakazaki M. (2001). Of mice and men: K_{ATP} channels and insulin secretion. *Recent Prog Horm Res*; 56:47-68
- Akar F, Uydes-Dogan B.S, Buharahoglu C.K, Abban G, Heinemann A, Holzer P, Van de Voorde J. (1999). Protective effect of cromakalim and diazoxide, and proulcerogenic effect of glibenclamide on indomethacin-induced gastric injury. *European Journal of Pharmacology*; 374: 461-470
- Allen, A, Flemstrom, G.(2005). Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*;288: C1-C19.
- Al-Shabanah O.A., Raza M., Al-Harbi M.M., Al-Bekairi A.M. (2000). Effect of ninhydrin on the biochemical and histopathological changes induced by ethanol in gastric mucosa of rats. *Life Sci*;67: 559-566
- Altan N, Ongun Cö, Hasanoglu E. (1994). Effect of sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase activity in alloxan induced diabetic rat hepatocytes. *Diabetes research and clinical practice*; 22: 95-98
- American diabetes association. (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*; 34 supl 1: S62-S69
- Appleyard C.B, McCafferty D.M, Tigley A.W, Swain M.G, Wallace J.L. (1996). Tumor necrosis factor mediation of NSAID-induced gastric damage: role of leukocyte adherence. *AmJ. Physiol*; 270: G42-G48
- Armstrong D, Browne R. (1994).The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Free Radicals in Diagnostic Medicine*; 366: 43-58
- Ashcroft F.M, Gribble F.M (2000). Tissue-specific effects of sulfonylureas. Lessons from studies of cloned K_{ATP} channels. *Journal of diabetes and its complications*; 14: 192-196
- Ashcroft F.M, Gribble F.M. (2000). Sulfonylurea sensitivity of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels from β cells and extrapancreatic tissues. *Metabolism*; 49 (10-suppl 2): 3-6

-
-
- Atuma C; Strugala V; Allen A; et al. (2001). The adherent gastric mucus gel layer: thickness and Physical state in vivo. *American Journal of Physiology and Gastrointestinal Liver Physiology*; 280: G922-929.
- Balint GA, Varro V. (1982). On the cytoprotective action of sulfhydryl-containing substances. *Acta Physiol Acad Sci Hung*; 60: 139-142
- Boehme MW, Autschbach F, Ell C, Raeth U. (2007). Prevalence of silent gastric ulcer erosions or severe acute gastritis in patients with type 2 diabetes mellitus: A cross-sectional study. *Hepatogastroenterology*; 54: 643-648
- Bou-Abboud, CF; Wayland, H Paulsen, G; Guth PH. (1988). Microcirculatory stasis precedes in ethanol-induced gastric mucosal injury in the rat. *Digestive Disease and Sciences*, 33; 872-877
- Brownlee M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*; 414: 813-820
- Bruton L, Chabner B, Knollman B (eds). (2010). Pharmacotherapy of gastric acidity, peptic ulcers and gastroesophageal reflux disease. In Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. United States of America. McGraw-Hill 12ed. Consultado en línea: <http://accessmedicine.com>
- Brzozowski I., Targosz A., Sliwowski Z., Kwiecien S., Drozdowicz D., Pajdo R., Konturek P.C., Brzozowski T., Pawlik M., Konturek S.J., Pawlik W.W., Hahn E.G. (2004). Healing of chronic gastric ulcers in diabetic rats treated with native aspirin, nitric oxide (NO)-derivate of aspirin and cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor. *Journal of physiology and pharmacology*; 55 (4): 773-790
- Bulatov A.V, Goldvirt D.K, Moskvin A.L, Vaskova E.A (2006). Stepwise injection photometric determination of hydrogen sulfide in natural gas. *J.Flow Injection Anal*; 23 (2): 102-106
- Calatayud, S; Barrachina, D; Esplugues, JV. (2001), Nitric oxide: relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa. *Microscopy Research and Technique*, 53; 325-335.
- Campbell J.D, Sansom M.S.P, Ashcroft F.M. (2003).Potassium channel regulation.Structural insights into the function of the nucleotide-binding domains of the human sulphonylurea receptor.*European Molecular Biology organization*; 4 (11): 1038-1042
- Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC).(2008). Manejo de úlcera péptica en adultos en el primer y segundo niveles de atención. Secretaría de Salud catálogo maestro de guías de práctica clínica; SSA-150-08: 9-29
- Chan FK, Leung WK. (2002). Peptic ulcer disease. *Lancet*; 360: 933–941.
-
-

-
-
- Chávez-Piña A.E y Navarrete A. (2009). Gastroprotective triterpenoids: pharmacological mechanism. In Varela A y Ibañez J (Eds), Medical plants classification, biosynthesis and pharmacology. Biotechnology in agriculture, industry and medicine series, United States of America, Nova publishers, 97-138.
- Chávez-Piña A.E, Tapia G.R., Reyes A., Navarrete A. (2011). Carbenoxolone gastroprotective mechanism: participation of nitric oxide/cGMP/KATP pathway in ethanol-induced gastric injury in the rat. *Fundamental & clinical pharmacology*; 25: 717-722
- Chávez-Piña A.E, Tapia-Álvarez G.R, Navarrete A. (2010). Inhibition of endogenous hydrogen sulfide synthesis by PAG protects against ethanol-induced gastric damage in the rat. *European Journal of Pharmacology*; 630: 131-136
- Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R. (2004). Hydrogen sulfide induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*; 287: H2316–23
- Cole WC, Clement-Chomienne O. (2003). ATP-sensitive K channels of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Electrophysiol*;14:94–103
- Dart C, Standen NB. (1993). Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J Physiol Lond*;471:767–786
- Davis, N. W., Standen, N. B., Stanfield, P. R. (1991). ATP-dependent potassium channels of muscle cells: their properties, regulation, and possible functions. *J Bioenerg Biomembr*; 23: 509 – 535
- De La Cruz JP, Guerrero A, Paniego MJ, et al. (2002). Effect of aspirin on prostanoids and nitric oxide production in streptozotocin-diabetic rats with ischemic retinopathy. *Arch Pharmacol*; 365: 96-101.
- Del Soldato P., Foschi D., Benoni G., Scarpignato C. (1985). Oxygen free radicals interact with indomethacin to cause gastrointestinal injury. *Agents Actions*; 17: 484–488
- Del Valle J.D. (2012). Chapter 293. Peptic Ulcer Disease and Related Disorders. In: Longo D.L, Fauci A.S., Kasper D.L, Hauser S.L., Jameson J.L., Loscalzo J. (Eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, United States of America, McGraw-Hill 18ed. Consultado en línea: <http://accessmedicine.com>
- Doi K, Nagao T, Kawakubo K, Ibayashi S, Aoyagi K, Yano Y, Yamamoto C, Kanamoto K, Iida M, Sadoshima S, Fujishima M. (1998). Calcitonin gene related peptide affords gastric mucosal protection by activating potassium channel in wistar rat. *Gastroenterology*; 114: 71-76
-
-

-
-
- Duncan C, Li H, Dykhuizen R, Frazer R, Johnston P, MacKnight G, Smith L, Lamza K, McKenzie H, Batt L, Kelly D, Golden M, Benjamin N, Leifert C. (1997). Protection against oral gastrointestinal diseases: importance of dietary nitrate intake, oral nitrate reduction and enterosalivary nitrate circulation: *Comparative Biochemistry and Physiology A*; 118: 939-948.
- Dupuy D, Raza A, Szabo S. (1989). The role of endogenous nonprotein and protein sulfhydryls in gastric mucosal injury and protection. In: Szabo S, Pfeiffer CJ (eds). *Ulcer Disease: New aspects of pathogenesis and pharmacology*, United States of America, CRC Press, 421-434
- Elliot S.N., Wallace J.L. (1998). Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. *Can. J. Gastroenterol.*;12: 559–568
- Feillet-Coudray C, Rock E, Coudray C, Grzclkowska K, Azais-Bracso V, Dardevet D, Mazur A. (1999). Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. *Clinica Chimica Acta*; 284: 31-43
- Ferraz, JG, Tigley AW, Appletard CB, Wallace JL. (1997), TNF- α contributes to the pathogenesis of ethanol-induced gastric damage in cirrhotic rats. *American Journal Physiology*; 272: G809- 814.
- Filaretova L; Podvigina T, Bagaeva T, Bobryshev P. (2007), Gastroprotective role of glucorticoid hormones. *Journal of Pharmacological Sciences*; 104: 195-201.
- Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A.(2005). Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury cause by anti-inflammatory non-steroidal drugs. *Gastroenterology*; 129:1210-122
- Freeman BA, Crapo JD. (1982). Biology of disease.Free radicals and tissue injury.*Lab Invest*; 47: 412-426
- Fujita A, KurachiY. (2000). Molecular aspects of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system and K⁺ channel openers. *Pharmacol Ther*; 85:39–53
- Ganong B, Browning J,O’Brien P. (1984). Mucosal microvascular architecture of the fundus and body of the human stomach.*Gastroenterology*; 86: 866-875.
- Gazzieri D, Trevisani M, Springer J, Harrison S, Conttrel GS, Andre E, Nicoletti P, Massi D. (2007).Substance P released by TRPV-1 expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. *Free Radical Biology y Medicine*;43:581-589.
- Giacco F, Brownlee M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*; 107 (9): 1058-1070
-
-

-
-
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. (2006). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation Review*; 114:597–605
- Goldin E, Ardite E, Elizalde JI, et al. (1997). Gastric mucosal damage in experimental diabetes in rats: role of endogenous glutathione. *Gastroenterology*; 112: 855-863
- Goldsby R.A, Kindt T.J, Osborne B. A. (2000). Antigen-antibody interactions. In *Kuby Immunology*, United States of America, Freeman and Company, 4th ed, 162
- Goodwin RD, Murray BS. (2002). Generalized anxiety disorder and peptic ulcer disease among adults in the United States. *Psychosomatic medicine*; 64: 862-866
- Goyal RK, Hirano I. (1996). The enteric nervous system. *The New England Journal of Medicine*; 334: 1106-1115.
- Green L.C, Wagner D. A, Glogowski J. et al. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal.Biochem*; 126: 131-138
- Gribble F.M, Ashcroft F.M., (1999). Differential sensitivity of cell and extrapancreatic K_{ATP} channels to gliclazide, *Diabetologia*; 42: 845– 848.
- Gribble F.M, Reimann F.(2003). K_{ATP} channel pharmacology in the pancreas and the cardiovascular system. *International Congress series*; 1253: 279-287.
- Gribble F.M., Tucker S.J., Seino S., Ashcroft F.M., (1998). Tissue specificity of sulphonylureas: studies on cloned cardiac and beta-cell K_{ATP} channels, *Diabetes*; 47: 1412– 1418
- Gupta S, Kataria M, Gupta PK, Murganandan RC, Yashroy RC. (2004). Protective role of extracts of neem seeds in diabetes caused by streptozotocin in rats. *J Ethnopharmacol*;90:185–189
- Hawkey CJ, Jones JL, Atherson CT, Skelly MM, Bebb JR, Fagerholm U, Jonzon B, Karlsson P, Bjarnason IT. (2003). Gastrointestinal safety of AZD3582, a cyclooxygenase inhibiting nitric oxide donator: proof of concept study in humans. *Gut*; 52: 1537-1542
- Henriksnas J, Phillipson M, Storm M, Engstrad L, Manooche S, Holm L. (2006) Impaired mucus-bicarbonate barriers in *Helicobacter Pylori*- infected mice. *American Journal Of Physiology and Gastrointestinal Liver Physiology*; 291: G396-G403.
- Holzer P. (2007), Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. *Current Opinion in Pharmacology*; 7: 563-569
- IMSS. (2010). Padece úlcera péptica el 20% de la población mayor de 50 años. Instituto Mexicano de Seguridad Social, Comunicado Coordinación de Seguridad social [en línea]
-
-

-
-
- Iwata F, Koo A, Itoh M, Lam K, Leung J.W.C, Leung F.W. (1997). Functional evidence linking potassium channels and afferent nerve-mediated mucosal protection in rat stomach. *Life Sciences*; 61 (17): 1713-1720
- Jahangir A, Terzic A. (2005). KATP channels therapeutics at the bedside. *JMCC*; 39: 99-112
- Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. (1990). Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett*; 268(1):69–71
- Kahn C.R, Weir C.G, King L.G, Jacobson M.A, Moses C.A.,Smith J.R.(2006). *Joslin's diabetes mellitus*, United States of America, Lippincott Williams & Wilkins, 14 ed, 35
- Kalyanakrishnan R, Salinas RC. (2007). Peptic Ulcer Disease. *Am Fam Physician*; 76 (7): 1005-1012
- Kang JY, Teng CH, Wee A, Chen FC. (1995). Effect of capsaicin and chilli on ethanol induced gastric mucosal injury in the rat. *Gut*; 36: 664-669
- Kasperek, MS; Linden, DR; Kreis, ME; Sarr, MG. (2008). Gasotransmitters in the gastrointestinal tract. *Surgery*; 143(4): 455-459.
- Kawamura M, Heinecke JW, Chait A. (1994). Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide dependent pathway. *J Clin Invest*;94 (2):771–778
- Kellow J. (2001). Organic causes of dyspepsia, and discriminating functional from organic dyspepsia. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*; 15 :447-487
- Koch KL, Stern RM, Stewart WR, Vasey MW. (1989). Gastric emptying and gastric myoelectrical activity in patients with diabetic gastroparesis: Effect of long-term domperidone treatment. *Am J Gastroenterol*;84:1069 - 1075
- Konturek PC, Brzozowski T, Kani J, Konturek SJ, Hahn Eg. (2003). Nitric oxide-releasing aspirin protects gastric mucosa against ethanol damage in rats with functional ablation of sensory nerves, *Inflammation research*; 52: 359-365
- Kowicka E, Beltowski J. (2007). Hydrogen sulfide (H₂S) the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports*; 59: 4-24.
- Kurata J H, Nogawa A N. (1997). A meta-analysis of risk factors for peptic ulcer: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Helicobacter pylori* and smoking. *J Clin Gastroenterol*; 24 (1): 2-17
- Laine F.L. Takeuchi K, Tarnawski A. (2008). Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. *Gastroenterology*; 135: 41-60
-
-

-
-
- Lew E. (2009). Peptic Ulcer Disease. In: Greenberger NJ, Blumberg RS, eds. CURRENT Diagnosis & Treatment: Gastroenterology, Hepatology, & Endoscopy. United States of America, McGraw-Hill. Consultado en línea: <http://www.accessmedicine.com>
- Li DS, Raybould HE, Quintero E, Guth PH. (1992). Calcitonin gene-related peptide mediates the gastric hyperemic response to acid back-diffusion. *Gastroenterology*;102:1124–112
- Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK. (2005). Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB Journal*;9:1196-1213
- Li Y; Smith, T; Gasbski, S.(1998). The membrane association sequences of the prostaglandin endoperoxide synthases-1 and 2 isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 273; 29830-29837.
- Lin HC, Hasler WL.(1995). Disorders of gastric emptying. In Yamada T(ed). *Textbook of Gastroenterology*, United States of America, JB Lippincott, 2^a ed, 1318 – 1346.
- Lindsay R, Sedlak J. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's Reagent. *Analytical Biochemistry*; 25: 192-205
- Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K. (1994). Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut*; 35: 1543-1546
- MacNaughton WK, Cirino G, Wallace JL. (1989). Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. *Life Science*; 45: 1869-1876.
- Malagelada J-R, Rees WDW, Mazzotta LJ, Go VLW. (1980). Gastric motor abnormalities in diabetic and postvagotomy gastroparesis: Effect of metoclopramide and bethanechol. *Gastroenterology*; 78:286–293
- Malfertheiner P, Chan F KL, McColl K EL. (2009). Peptic ulcer disease. *Lancet*; 374: 1449-1461
- Mannhold R. (2003). KATP channel openers: structure-activity relationships and therapeutic potential. *Medicinal Research Reviews*; 24 (2): 213-266
- Maritim A.C, Sanders R.A, Watkins III J.B. (2003). Diabetes, Oxidative stress and antioxidants: a review. *J Biochem molecular toxicology*; 17: 24-38
- Matcovis B, Varga SI, Szaluo L, Witsas H. (1982). The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolic enzymes. *Horm Metab Res*;14:77
-
-

-
- McQuaid K.R. (2012). Gastrointestinal Disorders. In McPhee SJ, Papadakis MA, Rabow (Eds), CURRENT Medical Diagnosis & Treatment, United States of America, McGraw-Hill. Consultado en línea: <http://www.accessmedicine.com>
- Medeiros J.V., Gadelha G.G., Lima S.J. (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
- Miller TA, Li D, Kuo YJ, Schmidt KL, Shanbour LL. (1985). Nonprotein sulfhydryl compounds in canine gastric mucosa: effects of PGE2 and ethanol. *Am J Physiol*; 249: G137-G144
- Minami K, Miki T, Kadowaki T, Seino S. (2004). Roles of ATP-sensitive K⁺ channels as metabolic sensors: studies of Kir6.x null mice. *Diabetes*;53:S176–80.
- Mizuno H, Sakamoto C, Matsuda K, Uchida T, Noguchi H, Akamatsu T, Kasuga M. (1997) Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesion and its inhibition by the specific antagonist delays healing mice. *Gastroenterology*; 112: 387-397.
- Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofer S, Tritschler H, Ziegler H, Nawroth PP. (1999).The role of oxidative stress and NF kappa B activation in late diabetic complications. *Biofactors*;10:157–167
- Morsy M., Ashour O.M, Fouad A.A, Abdel-Gaber S.A. (2010). Gastroprotective effects of the insulin sensitizers rosiglitazone and metformin against indomethacin-induced gastric ulcers in type 2 diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*; 37: 173-177
- Muller W.A. (2003). Leukocyte–endothelial–cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response.*Trends Immunol*; 24: 327–334
- Murphy EM, Brayden JE. (1995). Nitric oxide hyperpolarized rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol Lond*;486:47–58
- Nagy L, Nagata M, Szabo S. (2007). Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrototoxic chemicals and sucralfate: posible new targets of pharmacologic agents. *World J Gastroenterol*; 13(14): 2053-2060
- Navarrete A, Martínez Uribe LS, Reyes B. (1998). Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats.*Phytotherapy Research*; 12:1-4
- Nichols, C. G., Lederer, W. J. (1991). Adenosine-triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol*; 261: H1675 - H1686
- Oberley LW. (1988). Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* ;5:113–124
- Pazoki-Torudi P.H, Rahgozar M., Bakhtiarian A., Djahanguiri B. (1999). Potassium channel modulators and indomethacin-induced gastric ulceration in rats. *Scand J Gastroenterol*; 10: 962-966
-

-
-
- Peskar B.M, Ehrlich K, Peskar B.A. (2002). Role of ATP-Sensitive Potassium Channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. *JPET*; 301 (3): 969-974
- Pietzsch M, Theuer S, Haase G, Plath F, Keyser M, Riethling AK. (2002). Results of systematic screening for serious gastrointestinal bleeding associated with NSAIDs in Rostock hospitals. *Int J Clin Pharmacol Ther*; 40: 111-115.
- Quast U, Guillon JM, Cavero I. (1994). Cellular pharmacology of potassium channel openers in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res*; 28:805–10.
- Quatrini M, Boarino V, Ghidoni A, Baldassarri AR, Bianchi PA, Bardella MT. (2001). *Helicobacter pylori* prevalence in patients with diabetes and its relationship to dyspeptic symptoms. *J Clin Gastroenterol*; 32: 215-217.
- Quayle, J. M., Nelson, M. T., Standen, N. B. (1997). ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Ver*; 77: 1165-1232
- Rang H.P, Dale M.M. (2008). *Rang y Dale Farmacología*. España, Elsevier, 6ed: 397-405
- Rothstein RD, Alavi A, Reynolds JC. (1993). Electrogastrography in patients with gastroparesis and effect of long-term cisapride. *Dig Dis Sci*; 38:1518 - 1524
- Saeki T, Ohno T, Kamata K, Arai K, Mizuguchi S, Katori M, Saigenji K. (2004). Mild irritant prevents ethanol-induced gastric mucosal microcirculatory disturbances. *Journal of physiology and Gastrointestinal liver physiology*; 286: G68-G75
- Santucci L, Fiorucci S, Giansanti M, Di Matteo F.M, Morelli A. (1984). Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumor necrosis factor alpha. *Gut*; 35: 909-915
- Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ. (1993). Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochem Pharmacol*; 45(3):539–542.
- Schubert ML, Peura DA. (2008). Control of gastric acid secretion in health and disease *Reviews in Basic and Clinical Gastroenterology*; 134:1842-1860.
- Secretaría de salud (2011). SINAVE/DGE/SALUD Información epidemiológica de morbilidad. Anuario 2009. México. Secretaría de salud. 61-62
- Serhan CN. (2001). Eicosanoids, In Koopman WJ, *Arthritis and allied conditions*. United States of America, Lippincott Williams y Wilkins, 15 ed, 516-520
- Song D.K., Ashcroft F.M., (2001). Glimepiride block of cloned cell, cardiac and smooth muscle K-ATP channels, *Br. J. Pharmacol.* ;133:193– 199
- Soria B. (1998). Potencial role of the pharmacology of K⁺ channels in therapeutics. In Soria B, Cena V (eds). *Ion channel pharmacology*, United States of America, Oxford University Press, 229-245
-
-

-
-
- Strubelt O, Hoppenkamps R. (1983). Relations between gastric glutathione and the ulcerogenic action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Arch Int Pharmacodyn Ther*; 262: 268-278
- Szabo S, Goldberg I. (1990). Experimental pathogenesis: drugs and chemical lesions in the gastric mucosa. *Scand J Gastroenterology Suppl.*;174: 1-8
- Szabo S, Nagy L, Plebani M. (1992). Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. *Clinica Chimica Acta*; 206: 95-105
- Szabo S, Pihan G, Raza A, Muller AE, Hauschka PV. (1987). Multiple mechanisms of cell injury in the gastric mucosa. *Fed Proc*; 46: 1152
- Szabo S, Trier JS, Frankel PW.(1981). Sulfhydry compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science*; 241: 200-202
- Szabo S. (1984). Peptides, sulfhydryls, and glucocorticoids in gastric mucosal defense: coincidence or conection?. *Gastroenterology*; 87: 228-229
- Takehara K, Tashima K, Takeuchi K. (1997). Alterations in duodenal bicarbonate secretion and mucosal susceptibility to acid in diabetic rats. *Gastroenterology*; 112: 418-428
- Takeuchi K, Takehara K, Tajima K, Kato S, Hirata T. (1997). Impaired healing of gastric lesions in streptozotocin-induced diabetic rats: effect of basic fibroblast growth factor. *J Pharm Exp Ther*; 281: 200-207.
- Tanaka T, Guth PH. (1994). Role of gastric mucosal blood flow in gastroprotective effect of novel xanthine derivative. *Digestive Disease Science*;39(3): 587-592.
- Tang G, Wu L, Wang R. (2010). Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *CEEP*; 37: 753-763
- Tannenbaum, SR; Weisman, M; Fett, D. (1976), The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Food and Cosmetics Toxicology*; 14: 549-552.
- Tarnawski A, Stachura J, Durbin T. (1992). Increased expression of epidermal growth factor receptor during gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology*; 102: 695-698
- Tashima K, Korolkiewicz R, Kubomi M, Takeuchi K. (1998). Increased susceptibility of gastric mucosa to ulcerogenic stimulation in diabetic rats-role of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Br J Pharmacol*; 124: 1359-1402.
- Tenorio F.A, Del Valle L., Pastelín G.(2005). Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*; 36 (001): 31-41
-

-
-
- Tsukimi Y, Okabe S.(2001).Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosa defense and ulcer healing. *Biol Pharm Bull*; 24:1-9
- Tunali S, Yanardag R. (2006). Effect of vanadyl sulfate on the status of lipid parameters and on stomach and spleen tissues of streptozotocin-induced diabetic rats.*Pharmacological Reserch*; 53: 271-277
- Tünzün S., Girgin F.K., Sözmen E.Y, Menten G, Ersöz B. (1999). Antioxidant status in experimental type 2 diabetes mellitus: effects of glibenclamide and glipizide on various rats tissues. *Exp Toxic Pathol*; 51: 436-441
- Undeland KA, Hausken T, Svebak S, Aanderud S, Berstad A. (1996). Wide gastric antrum and low vagal tone in patients with diabetes mellitus type I compared to patients with functional dyspepsia and healthy individuals. *Dig Dis Sci*; 41: 9–16
- Véliz L.P., González F.G., Duling B.R., Sáez J.C., Boric M.P. (2008). Functional role of gap junctions in cytokine-induced leukocyte adhesion to endothelium in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*; 295: H1056–H1066
- Wallace J, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N. (2000). NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*; 119 (3): 706-714.
- Wallace J.L, Bak A., McKnight W., Ashafa S., Sharkey K.A., MacNaughton W.K. (1998). Cyclooxygenase-1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for GI toxicity. *Gastroenterology*; 115: 101–109
- Wallace J.L, Devchand PR. (2005). Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense, *British Journal of Pharmacology*; 145: 275-282.
- Wallace J.L; Caliendo G; Santagada, V; Cirino, G; Florucci, S. (2007), Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulfide- releasing diclofenac derivative in the rat. *Gastroenterology*; 132(1): 261-271.
- Wallace J.L; Granger D.N. (1996). The cellular and molecular basis for gastroduodenal mucosal defense. *FASEB Journal*; 10: 731-740.
- Wallace JL, Cirino G. (1994).The Development of gastrointestinal-sparing non-Steroidal antiinflammatory drugs.*Trends in Pharmacological Sciences*; 15: 405-406
- Wallace JL, Dickey M, McKnight W, Martin G. (2007). Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. *FASEB J*; 21: 4070-4076
- Wallace JL, Kennan CM, Granger DN. (1990). Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *American Journal of Physiology*;259: G462-G467.
-
-

-
-
- Wallace JL, Muscará, MN; de Nucci, G; Zamuner, S; Cririno, G; del Soldato, P; Omgini, E. (2004). Gastric tolerability and prolonged prostaglandin inhibition in the brain with a nitric oxide-releasing flurbiprofen derivative NCX-2216 [3-[4-(2-fluoro- α -methyl-[1,1'-biphenyl]-4-acetyloxy)-3-methoxyphenyl]-2-propenoic acid 4-nitrooxy butyl ester]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 309: 626-633.
- Wang R. (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous mediator? *FASEB Journal*; 16:1792-1798
- Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukada A, Mitchell JÁ, Vane JR. (1999). Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proceedings National Academy of Sciences*; 96: 7563-7568.
- Whittle BJR, López- Belmonte J. (1993). Action and interaction of endothelins, prostacyclin and nitric oxide in the gastric mucosa. *Journal of Physiology and Pharmacology*; 44: 91-107.
- Wilson D.E. (1991). Role of prostaglandins in gastroduodenal mucosal protection. *J Clin Gastroenterology*; 13: S65-S71.
- Wu W, Cho C. (2004). The pharmacological actions of nicotine on the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Sci*; 94: 348-358
- Yagi K. (1998). Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods in molecular biology*; 108: 101-106
- Yamada K, Ji JJ, Yuan HJ, Miki T, Sato S, Horimoto N. (2001). Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science*; 292:1543-1546
- Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S. (1997). Sulphonylurea receptor SUR2B and Kir6.1 form a sulphonylurea sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. *J Physiol*; 499: 715-720.
- Yonei Y, Guth P. (1991). Ethanol-induced gastric injury. Role of submucosal vasoconstriction and leukotrienes. *Digestive diseases and sciences*; 35 (5): 601-608
- Zamora-Rodriguez ZB, Gonzalez-Alvarez R, Guanche D, Merino N, Hernandez-Rosales F, Menendez-Cepero S, Alonso-Gonzalez Y, Schulz S. (2007). Antioxidant mechanism is involved in the gastroprotective effects of ozonized sunflower oil in ethanol-induced ulcers in rats. *Mediators of inflammation*; 65: 873-878
- Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J*; 20: 6008-6016
-
-

Zingman LV, Alekseev AE, Bienengraeber M, Hodgson D, Karger AB, Dzeja PP. (2002). Signaling in channel/enzyme multimers. ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K⁺ conductance. *Neuron*;31:233–245