

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11281
17



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

**Alteraciones en el Metabolismo Oxidativo de la Glucosa
y en la Secreción de HCl
en un Modelo de Gastritis Subcrónica Experimental
Inducida por el Etanol en Ratas:
Posible Papel del Calcio**

T E S I S

Que se sustenta para optar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presentada por la

Med. Cir. Ileana Margarita Hernández Rincón

Tutor:

Dr. Rolando Hernández Muñoz

Cotutores:

Dr. Edmundo Chávez Cosío

Dr. Luis Vaca Domínguez

México, D. F.,

Junio de 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2

**La presente tesis fue realizada en el laboratorio del Dr. Rolando
Hernández Muñoz, del Departamento de Biología Celular,
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.**

La Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
resultado de los trabajos investigativos
AUTOR: ILEANA HERNANDEZ

FECHA: 16-06-03
FIRMA: Ileana Hernández

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3

**Esta tesis está dedicada a mi familia
y a los amigos
de Venezuela y México,
quienes con su apoyo
hicieron posible el logro de esta meta.**

AGRADECIMIENTO

**A Dios:
por la fe, las circunstancias y las personas
que colocó en el camino
para ayudarme a alcanzar esta meta.**

**A Venezuela, mi patria,
por esperar pacientemente
mi aporte a la construcción del país.**

**Al Instituto de Investigaciones Biológicas
(LUZ-Venezuela),
por el apoyo incondicional de sus miembros.**

**A mi maestro en Venezuela,
Dr. Jesús Chacín,
por iniciarme como Investigador.**

**A mi maestro en México,
Dr. Rolando Hernández Muñoz,
por acompañarme en el camino
hacia la madurez como Investigador.**

**A México,
por compartir conmigo
el derecho de los mexicanos
a la educación.**

**“Alteraciones en el Metabolismo Oxidativo de la Glucosa
y en la Secreción de HCl en un Modelo de Gastritis
Subcrónica Experimental Inducida por el Etanol en
Ratas: Posible Papel del Calcio”**

**MIEMBROS DEL JURADO EN LA PRESENTACIÓN DE LA
TESIS:**

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez

Dr. Edmundo Chávez Cosío

Dr. Luis Vaca Domínguez

Dr. Rolando Hernández Muñoz

Dr. Rafael Villalobos Molina

Dra. Alicia Ortega Aguilar

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

RECONOCIMIENTOS

Durante mi participación como estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, varias Instituciones y personas contribuyeron oportunamente al desarrollo de este proyecto, razón por la cual expreso un especial reconocimiento:

A La Universidad del Zulia, mi casa de estudios y de trabajo, y al **FONACIT – Venezuela**, por el apoyo institucional y por el financiamiento de mi estancia en México.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la extraordinaria disposición de su personal científico y docente para impartir y compartir conocimientos, por el excelente trato de su personal administrativo y la aceptación de los compañeros de aula y de laboratorio, aspectos cruciales para mi desenvolvimiento en el postgrado, en mi condición de estudiante extranjera.

Al Dr. Rolando Hernández Muñoz, tutor principal de mis estudios de Doctorado, por su excelente apoyo profesional y personal, con especial agradecimiento por: la confianza en mis capacidades, el respeto a la libertad responsable de pensamiento y acción, el fomento de la creatividad, y la orientación oportuna, cualidades que han contribuido a mi desarrollo como investigador.

A los Dres. Edmundo Chávez Cosío y Luis Vaca Domínguez, co-tutores durante mis estudios de Doctorado, por el tiempo dedicado al seguimiento de este proyecto y por sus oportunas recomendaciones.

Al Instituto de Fisiología Celular, especialmente al Dpto. de Biología Celular, Coordinación y Secretaría de Enseñanza, Biblioteca y Servicio de Cómputo, por el apoyo logístico de sus integrantes.

A los miembros del Lab. 326N y 305S del Dpto. de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular, por el permanente apoyo personal y/o la colaboración científica y técnica. En especial: a la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, Téc. Susana Vidrio, Mg. Sc. Lourdes Sánchez, Mg. Sc. Marisela Oiguín y Sr. Ernesto Pintor.

Al Sr. Jorge Sepúlveda, miembro del Servicio de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular, por su colaboración en el procesamiento y análisis de muestras para Microscopía Electrónica.

A la Mg. Sc. Pilar Fernández Lomelín, adscrita al Lab. de Análisis Físicos y Químicos del Ambiente, Instituto de Geografía-UNAM, por su valiosa colaboración técnica en las determinaciones mediante Espectrometría de Absorción Atómica.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
GLOSARIO.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN.....	15
ABSTRACT.....	16
INTRODUCCIÓN.....	17
1. Aspectos morfológicos y funcionales de la mucosa gástrica.....	18
1.1 La mucosa gástrica de los mamíferos. Características Generales.....	18
1.2 La célula oxíntica. Morfología y Función Secretoria de HCl.....	20
1.3 Regulación de la secreción ácida gástrica.....	23
1.4 El metabolismo oxidativo en la mucosa gástrica. Regulación.....	26
1.5 Rutas metabólicas para la oxidación de la glucosa.....	30
1.5.1 La Glucólisis.....	31
1.5.2 La Vía de las Pentosas.....	33
1.5.3 El Ciclo de Krebs.....	34
1.6 La integridad de la mucosa gástrica.....	35
2. Antecedentes.....	37
2.1 Etanol y mucosa gástrica.....	37
2.2 Etanol y calcio.....	40
3. Hipótesis.....	42
4. Objetivo general.....	42
5. Objetivos Específicos.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
1. Reactivos.....	44
2. Modelo animal.....	44
3. Aislamiento de la mucosa gástrica.....	45

4. Oxidación de glucosa.....	45
5. Consumo de O ₂	46
6. Acumulación de aminopirina.....	46
7. Microscopía electrónica de transmisión.....	48
8. Captación de calcio.....	49
9. Salida de calcio.....	49
10. Contenido de calcio total.....	50
11. Actividades enzimáticas.....	51
11.1 Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.....	51
11.2 Fosfofructocinasa-1.....	52
11.3 Succinato deshidrogenasa.....	53
11.4 Citocromo c oxidasa.....	54
12. Piruvato, Lactato, ADP, ATP y NADP ⁺	54
12.1 Piruvato y Lactato.....	55
12.2 ADP y ATP.....	55
12.3 NADP ⁺	56
13. Concentración tisular de ADN.....	56
14. Concentración de proteínas y relación proteínas/ peso seco.....	57
Análisis estadístico.....	57
RESULTADOS	58
1. Cambios inducidos por el etanol sobre la oxidación de la glucosa.....	58
2. Cambios inducidos por el etanol sobre la secreción ácida gástrica.....	62
3. Alteración en la homeostasis del calcio. Relación con los cambios metabólicos y secretorios inducidos por el etanol.....	66
4. Proteína tisular y mitocondrial, y estado de las mitocondrias.....	71
5. QO ₂ y producción de ATP, lactato y piruvato.....	73
DISCUSIÓN	76
CONCLUSIONES	89
PERSPECTIVAS	91
BIBLIOGRAFÍA	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
I	Oxidación de la [1- ¹⁴ C]-, [6- ¹⁴ C] – y [U- ¹⁴ C]-glucosa por la mucosa gástrica de ratas tratadas crónicamente con etanol.....	59
II	Efecto del tratamiento crónico con etanol, sobre la actividad de las Enzimas glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, fosfofructocinasa-1 y succinato deshidrogenasa, en la fracciones citosólicas correspondientes, obtenidas a partir de la mucosa gástrica de ratas.....	62
III	Efectos del LaCl ₃ 1Mm sobre el QO ₂ y la oxidación de glucosa en la mucosa gástrica de ratas tratadas con etanol.....	68
IV	Contenido de Ca ²⁺ total determinado mediante espectrometría de absorción atómica en fracciones subcelulares aisladas a partir de la mucosa gástrica de ratas.....	70
V	Actividad de la citocromo c oxidasa en homogeneizados y en la fracción mitocondrial purificada, obtenidos a partir de la mucosa gástrica de ratas normales y de ratas con gastritis alcohólica experimental.....	73
VI	Efecto de la administración de etanol <i>in vivo</i> sobre los niveles tisulares de lactato, piruvato, ATP, ADP y NADP ⁺ en fragmentos incubados de mucosa gástrica de rata.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	El estómago de los mamíferos: anatomía e histología.....	19
2	Características morfológicas de la célula oxíntica.....	21
3	La ATPasa de H^+K^+ : estructura y función.....	22
4	Regulación de la secreción ácida gástrica.....	25
5	Rutas metabólicas para la oxidación de la glucosa: La glucólisis.....	32
6	Rutas metabólicas para la oxidación de la glucosa: La vía de las pentosas.....	33
7	Rutas metabólicas para la oxidación de la glucosa: El ciclo de Krebs.....	35
8	La integridad de la mucosa gástrica: agresión vs. protección.....	36
9.	Efecto del tratamiento crónico con etanol sobre la acumulación de aminopirina..	64
10.	Cambios morfológicos inducidos por el etanol sobre las células oxínticas observadas al Microscopio Electrónico de Transmisión.....	65
11.	Efectos de agentes que modifican la disponibilidad de calcio extra e intracelular, sobre la oxidación de la glucosa estimulada por el etanol..	67
12	Efectos del tratamiento crónico con etanol, sobre la captación y salida de calcio en la mucosa gástrica de ratas.....	69
13	Esquema que integra algunos efectos del tratamiento crónico con etanol sobre la mucosa gástrica de ratas in vivo.....	88

GLOSARIO

Aminopirina: base débil capaz de ingresar a la célula oxíntica y de protonarse en presencia de hidrogeniones, quedando atrapada en el canalículo secretor.

Antro gástrico: región anatómica del estómago, que constituye la porción más caudal del mismo. La mucosa gástrica que lo recubre difiere histológica y funcionalmente, del *fundus* y el *corpus* gástrico.

Barrera mucosa gástrica: término que agrupa a todos los elementos preepiteliales, epiteliales y postepiteliales, tanto estructurales como funcionales, que impiden la retrodifusión de hidrogeniones, desde el lumen hacia la mucosa gástrica, y la salida de Na^+ desde las células epiteliales hacia el lumen gástrico. Entre estos elementos, se encuentran: las células epiteliales, la capa fosfolipídica, la barrera mucus-bicarbonato y otros.

Carbacol: análogo sintético de la acetilcolina y agonista de los receptores muscarínicos M_3 (colinérgicos) en las células oxínticas. Su mecanismo de acción involucra el aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} libre.

Cimetidina: antagonista competitivo de la histamina, con efecto inhibitorio sobre los receptores histamínicos de tipo 2, predominantes en la célula oxíntica.

Colecistocinina: hormona producida por células especiales del epitelio intestinal, con funciones reguladoras sobre la producción y secreción de bilis. Tiene similitud estructural con la gastrina.

Corpus gástrico: región anatómica del estómago, que constituye la mayor parte del mismo. Limita, en sentido cefálico, con el fundus y, en sentido caudal, con el antro gástrico. La mucosa gástrica que lo recubre, es histológica y funcionalmente similar a la del *fundus*.

Ex vivo: término que se refiere a preparaciones de órganos o aparatos que son sometidos a ensayo fuera del organismo de origen, pero preservando la integridad y conexiones de sus principales elementos vasculares y nerviosos.

Fundus gástrico: región anatómica del estómago, ubicada por encima de una línea horizontal imaginaria trazada a la altura del cardias o esfínter esofágico inferior. En los roedores, el fundus está ocupado por el proventrículo, el cual no cumple función secretoria.

Gavaje: administración de alimentos o medicamentos mediante sonda buco-esofago-gástrica.

Hiamina: base líquida utilizada para atrapar CO_2 en experimentos metabólicos, a fin de permitir la recolección del CO_2 radiactivo en una fase líquida, pudiendo así cuantificarlo en un contador de centelleo.

Histamina: derivado aminoacídico, formado por la decarboxilación de la histidina. Goza de propiedades paracrinas, es un importante mediador de las respuestas alérgicas e inflamatorias y un potente secretagogo gástrico, por su efecto agonista de los receptores histaminérgicos tipo 2 en la célula parietal y por su capacidad adicional para estimular a la célula productora de gastrina. Es producido por las células cebadas en la mayoría de los tejidos y, en la mucosa gástrica, por las células ECL.

Ionóforo de calcio: molécula que facilita el transporte de Ca^{2+} a través de las membranas biológicas.

Lipoato: cofactor imprescindible para la acción de la dihidrolipoil transacetilasa (E_2), segunda enzima del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa.

Muscarínico: tipo de receptores que responden a la muscarina, alcaloide con propiedades similares a las de la acetilcolina.

Muscularis mucosae: delgada capa muscular, incluida en la lámina propia de la mucosa gástrica.

Sacarosa: disacárido formado por la unión de una molécula de glucosa y una de fructosa. Por lo general, las células normales son impermeables a este azúcar. De allí que la ^{14}C -sacarosa pueda ser utilizada para determinaciones del volumen de agua extracelular e, indirectamente, del volumen de agua intracelular.

Omeprazole: derivado imidazólico con propiedades inhibitorias de la bomba de protones, por lo que es considerado un potente antisecretorio gástrico.

Secretagogo gástrico: compuesto químico capaz de estimular la secreción ácida gástrica, al actuar sobre la célula oxíntica.

Teofilina: compuesto químico de la familia de las xantinas, que tiene la propiedad de inhibir la fosfodiesterasa del AMP_c en la célula oxíntica. A través de este mecanismo, propicia la elevación en la concentración intracelular de AMP_c y la estimulación de la secreción ácida.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP:** adenosina difosfato
- AMP_c:** Adenosina monofosfato cíclico
- ATP:** Adenosina trifosfato
- BAPTA-AM:** éster acetoximetil del ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N, N, N',
 Ca²⁺: calcio [N'-tetraacético]
- Cl⁻:** cloruro.
- CoA:** coenzima A
- CO₂:** anhídrido carbónico
- DAG:** diacilglicerol
- DCIP:** 2,6-diclorofenol-indofenol
- DCIPH₂:** 2,6-diclorofenol-indofenol, reducido
- DHAP:** dihidroxiacetona fosfato
- DMSO:** dimetilsulfóxido.
- ECL:** Enterochromaffin like cells.
- EDTA:** ácido etilen diamino tetraacético
- EE:** error estándar
- EGTA:** ácido etilen glicol-bis (β-aminoetil eter)-N, N, N', N'-tetraacético
- FAD:** flavín adenín dinucleótido
- FADH₂:** flavín adenín dinucleótido, reducido
- FCE:** factor de crecimiento epidérmico
- F6P:** fructosa 6-fosfato
- GAP:** gliceraldehido fosfato
- G6P:** glucosa 6-fosfato
- G6P-DH:** glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- H⁺:** hidrogeniones
- HCl:** ácido clorhídrico.
- HEPES:** ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico
- H₂:** receptor histaminérgico tipo 2.
- IP₃:** inositol trifosfato.
- HPLC:** cromatografía líquida de alta resolución.

QO₂: consumo de oxígeno

LaCl₃: Cloruro de lantano.

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

MOPS: ácido 3-[N-morfolino propanosulfónico].

Na⁺: ión sodio.

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido.

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido, reducido.

NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, reducido.

PGE: prostaglandina E.

P_i: fosfato inorgánico

PMS: fenazina metosulfato

PMSH₂: fenazina metosulfato, reducida

PPO: 2,5-difeniloxazol.

TES: ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfónico

TMDP: N, N, N', N' – tetrametil – p – fenilenediamina

RESUMEN

La integridad de la mucosa gástrica es el resultado del equilibrio entre los factores agresivos y los mecanismos de defensa. Al etanol se le reconoce como un agente agresivo para la mucosa gástrica. No obstante, su mecanismo de patogenicidad no ha sido del todo dilucidado, aunque se ha sugerido la participación del Ca^{2+} como mediador intracelular de la lesión inducida por etanol. En el presente estudio se investigaron las posibles alteraciones en el metabolismo oxidativo de la glucosa y en la actividad secretoria ácida, y el papel que el Ca^{2+} podría jugar como mediador de tales perturbaciones, en la mucosa gástrica de ratas crónicamente tratadas con etanol. Se utilizó un modelo de lesión gástrica crónica inducida por la administración de etanol *in vivo* en ratas, en el cual se han detectado previamente, alteraciones en la membrana plasmática e inducción de la proliferación celular, luego de retirar el etanol. Los resultados obtenidos revelaron que la oxidación de la glucosa, el consumo de O_2 y la secreción de HCl, aumentaron significativamente en la mucosa gástrica proveniente de ratas tratadas con etanol. Adicionalmente, cambios morfológicos compatibles con un estado secretorio activo, predominaron en las células oxínticas de la mucosa gástrica tratada con etanol. El acoplamiento metabolismo-secreción se evidenció mediante la inhibición metabólica inducida por el omeprazole, un inhibidor de la ATPasa de $\text{H}^+\text{-K}^+$. La estimulación del metabolismo se asoció a un incremento en el ATP y NADP^+ tisular, mientras que la relación lactato/piruvato, no se modificó por el tratamiento con etanol. Los efectos secretorios y metabólicos inducidos por el etanol se inhibieron por la adición de quelantes del Ca^{2+} . La oxidación de glucosa también fue inhibida por el bloqueador de los canales de Ca^{2+} , LaCl_3 . El carbacol, un secretagogo gástrico que actúa vía Ca^{2+} , no estimuló ni la oxidación de la glucosa ni la secreción ácida en la mucosa gástrica lesionada por el etanol. La captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ y el contenido de Ca^{2+} total en las fracciones citosólica y mitocondrial, aumentaron significativamente por el tratamiento con etanol. En conclusión, los cambios en la homeostasis del Ca^{2+} , probablemente inducidos por el ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular, parecen mediar los efectos de estimulación metabólica y

secretoria inducidos por la exposición crónica *in vivo* de la mucosa gástrica al etanol.

ABSTRACT

The integrity of the gastric mucosa is dependent on the balance between noxious agents and defensive mechanisms. Ethanol has been recognized like an exogenous aggressive factor for the gastric mucosa. In spite of the fact that its mechanism of patogenicity has not been totally elucidated, a role of Ca^{2+} as a mediator of the ethanol-induced injury has been postulated. Therefore, the present study explored possible changes in the glucose oxidative metabolism and acid secretory activity, and the possible role that Ca^{2+} might play in mediating such disturbances, in the rat gastric mucosa chronically ethanol-treated *in vivo*. These parameters were investigated in a model of ethanol-induced chronic gastric injury in rats, characterized by marked alterations in plasma membranes from gastric mucosa and a compensatory cell proliferation, which follows ethanol withdrawal. The results revealed that glucose oxidation, O_2 consumption and HCl secretion, were significantly increased in the ethanol-injured gastric mucosa. Additionally, morphological changes observed by electron microscopy, suggested a predominating secretory status in the oxyntic cells of gastric mucosa from ethanol-treated rats. The coupling metabolism-secretion was demonstrated by the metabolic inhibition induced by omeprazole, a proton pump blocker. Enhanced glucose and oxygen consumptions were associated with higher ATP and NADP^+ tissue levels, whereas cytosolic lactate/pyruvate ratio was not significantly modified by the chronic ethanol administration. Secretory and metabolic effects induced by ethanol, were also diminished by addition of Ca^{2+} chelators. The LaCl_3 , a Ca^{2+} channel blocker, also inhibited ethanol-promoted increase of oxidative metabolism. In addition, a stimulated Ca^{2+} uptake by mucosal minces and increased *in vivo* Ca^{2+} levels in cytosolic and mitochondrial fractions, were also detected. In conclusion, changes in Ca^{2+} homeostasis, mainly due to increased extracellular Ca^{2+} uptake, could mediate secretory and metabolic disturbances found in the gastric mucosa from rats chronically treated with ethanol.

INTRODUCCIÓN

Desde hace más de tres décadas, se han estudiado los posibles mecanismos de lesión inducidos por agentes externos en la mucosa gástrica. El etanol reviste un interés especial, debido a los crecientes índices de hábito alcohólico que se registran en América Latina y a nivel mundial (86), y a las numerosas enfermedades digestivas que de éste se derivan (83, 86). No obstante, el conocimiento actual sobre la patogénesis de las gastritis y las úlceras gástricas de etiología alcohólica aún es insuficiente y esto se debe en parte al amplio espectro de perturbaciones morfológicas y funcionales que este agente parece ocasionar.

Con el presente trabajo se pretende contribuir al conocimiento de los mecanismos de lesión inducidos por el etanol en la mucosa gástrica, específicamente en lo que se refiere al metabolismo oxidativo de la glucosa, la función secretoria ácida y la homeostasis del Ca^{2+} . Asimismo, se describirá el posible papel del Ca^{2+} como mediador de las perturbaciones metabólicas y secretorias. Cabe señalar que el etanol se administró crónicamente *in vivo*, mientras que las determinaciones morfológicas y funcionales se practicaron *in vitro*, luego de haber retirado el etanol y cuando ya sus niveles sanguíneos y tisulares se consideran insuficientes para generar reacciones agudas. Por lo tanto, los efectos aquí descritos se refieren a las alteraciones inducidas por la exposición crónica al etanol, aspecto en el cual la información científica actual es particularmente escasa.

A continuación, se presentan aspectos generales acerca de la morfología y funciones de la mucosa gástrica, así como los antecedentes bibliográficos más relevantes, a fin de facilitar la comprensión del problema investigado.

1. Aspectos morfológicos y funcionales de la mucosa gástrica.

1.1 La mucosa gástrica de los mamíferos. Características generales.

La mucosa gástrica es la capa del tubo digestivo que recubre internamente el estómago y consta de: 1) un epitelio cilíndrico simple, que se invagina y especializa para formar glándulas, 2) una lámina propia de tejido conectivo, y 3) la *muscularis mucosae*. La mucosa gástrica de los mamíferos consta de dos regiones principales con características histológicas y funcionales diferentes: la región de las glándulas gástricas (correspondiente al *fundus* y *corpus* gástrico) y la región de las glándulas pilóricas (correspondiente al antro gástrico) (Fig. 1). En las glándulas gástricas predominan tanto las células oxínticas o parietales, productoras de HCl y factor intrínseco, como las células principales o zimogénicas productoras de pepsinógeno, precursor inactivo de la pepsina. En contraste, en las denominadas glándulas pilóricas predominan las células secretoras de mucus y las células "G", productoras de la hormona gastrina, potente secretagogo y factor trófico para la mucosa gástrica. Células epiteliales superficiales y del cuello (productoras de mucus), formas intermedias de diferenciación, maduración o degeneración celular y diversos tipos de células productoras de hormonas y péptidos paracrinos, son comunes a toda la mucosa gástrica, con variaciones en su densidad (43, 45). El estómago de las ratas, como el de otros roedores, tiene una particularidad respecto al de los humanos:

una región que antecede al estómago glandular (proventrículo o "forestomach"), el cual ocupa el tercio superior del estómago y es considerada una región "no glandular". El proventrículo no tiene equivalente en el humano y su epitelio es semejante al del esófago, aunque su significado funcional no está claro (7).

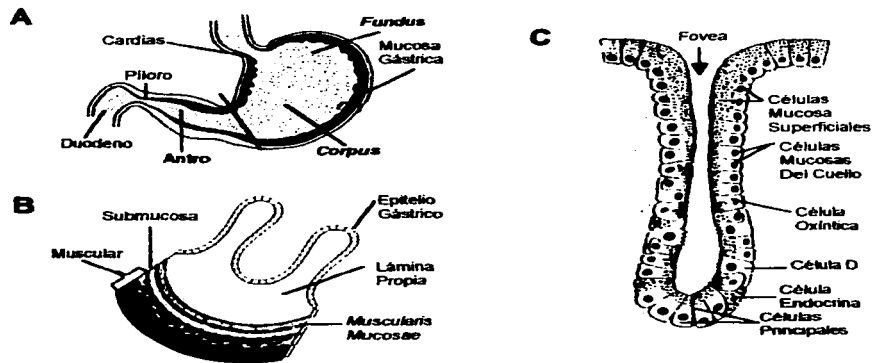


Fig. 1 El estómago de los mamíferos: Anatomía e histología. A. Regiones anatómicas. B. Elementos que conforman la pared gástrica. C. Representación esquemática de una glándula gástrica, característica del *fundus* y *corpus* gástrico (Wolfe y Soll, 1.988) (101).

La mucosa gástrica cumple funciones endocrinas, paracrinas y exocrinas. Entre sus productos endocrinos y paracrinos, figuran: la gastrina, la motilina, la histamina y la somatostatina, todos ellos con efectos reguladores sobre las funciones gastrointestinales. Por medio de su función exocrina, la mucosa gástrica produce el jugo gástrico, en cantidad de 1 a 2 litros por día. Sus más

importantes constituyentes, son: H^+ , mucus, bicarbonato, pepsina y el factor intrínseco indispensable para la absorción intestinal de la vitamina B_{12} . Algunas de las principales funciones del jugo gástrico, derivan de su elevada acidez: su efecto antimicrobiano (evitando la colonización anormal del tubo digestivo), la conversión del pepsinógeno en pepsina (forma activa), la predigestión de algunos alimentos conjuntamente con la pepsina y la estimulación del componente electrolítico de las secreciones pancreática y biliar, cuando el contenido gástrico ácido llega al duodeno. Además del papel fisiológico del jugo gástrico, éste participa en los mecanismos de patogenicidad de la mucosa gástrica como agente agresivo, cuando la hipersecreción ácida rebasa la capacidad citoprotectora de la mucosa (43).

1.2 La célula oxíntica. Morfología y función secretoria de HCl.

El estómago humano normal contiene cerca de un billón de células oxínticas, las cuales producen HCl a una concentración de hasta 160 mEq/L, confiriéndole la acidez característica al jugo gástrico. Las células oxínticas tienen forma de cono truncado, con su base dirigida hacia la lámina propia (lado nutriente) y el ápice dirigido hacia el lumen gástrico (lado luminal). Poseen un núcleo central redondeado, citoplasma con abundantes mitocondrias, un profuso sistema de túbulo-vesículas y un canalículo secretor cuya luz es casi virtual en estado de reposo y continua con el lumen gástrico (Fig. 2-A). En las membranas del sistema túbulo-vesicular de la célula oxíntica no estimulada, se encuentran las llamadas "bombas de protones", enzimas responsables del mecanismo secretor de H^+ . Conocida también como ATPasa de H^+-K^+ , la bomba de protones es una glucoproteína genéticamente relacionada con la familia de las ATPasas

fosforilantes transportadoras de iones, poseedora de una subunidad catalítica α grande y una pequeña subunidad β glucosilada (76) (Fig. 3-A).

En las células oxínticas, la transición del estado de reposo al estado estimulado comprende cambios morfológicos y bioquímicos, desencadenados por la interacción de los secretagogos gástricos con sus receptores específicos. Uno de los cambios morfológicos más significativos es la formación del canaliculo secretor dilatado y cubierto de microvellos, a partir de las membranas del sistema túbulo-vesicular (Fig. 2-B). El otro evento llamativo es la relocalización de las bombas de protones, las cuales pasan de las membranas túbulo-vesiculares al

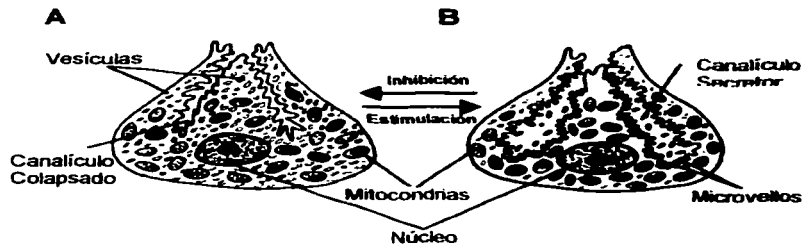


Fig. 2 Características Morfológicas de la Célula Oxíntica. A. En estado de reposo: abundantes túbulo-vesículas y un canaliculo secretor cuya luz es casi virtual. B. En condiciones de estimulación: disminuye el número de túbulo-vesículas y se aprecia un canaliculo secretor ensanchado, con microvellos en su superficie y en comunicación con el lumen glandular. En ambas condiciones destacan: abundante número de mitocondrias y núcleo redondeado y claro. (Forte et al, 1.990) (25).

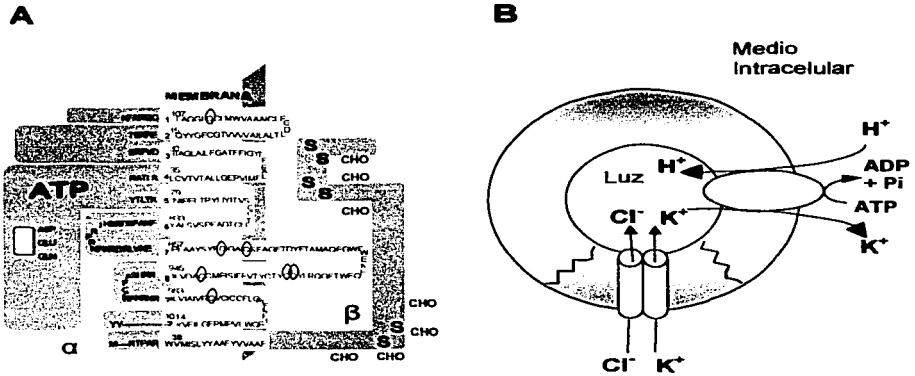


Fig. 3 La ATPasa de H⁺-K⁺: Estructura y Función. A. Representación esquemática del heterodímero de la ATPasa de H⁺-K⁺ en la membrana apical de la célula oxíntica. B. Para su activación, la ATPasa de H⁺-K⁺ requiere una alta concentración de K⁺ en la luz del canalículo secretor. A continuación, la enzima ejecuta el transporte de H⁺ en intercambio con K⁺. La hidrólisis del ATP proporciona la energía para el transporte activo de H⁺. (Sachs, 1.994) (76).

espesor de la membrana canalicular, gracias al reordenamiento del citoesqueleto. Esto permite que una de las caras de la ATPasa gástrica quede expuesta al lumen canalicular y, la otra, al citoplasma celular (Fig. 3-B). Seguidamente, se activan conductancias para iones de K⁺ y Cl⁻ en la membrana canalicular y es el K⁺ del lumen, el elemento activador de la ATPasa gástrica. Esta enzima ejecuta el transporte activo de los H⁺ desde el interior de la célula oxíntica hacia la luz del canalículo secretor, en intercambio electroneutro con K⁺, el cual reingresa a la célula. El gradiente que debe vencer la bomba de protones, es el originado por la

gran diferencia de concentración de H^+ existente entre la luz del canalículo (un pH hasta < 1) y el medio intracelular (pH ~ 7.1). La energía necesaria para vencer ese gradiente, procede de la hidrólisis del ATP, cuyo principal proveedor es el metabolismo oxidativo (76) (Fig. 3-B).

1.3 Regulación de la Secreción Ácida Gástrica.

Gracias a numerosas investigaciones se ha podido demostrar que la célula oxíntica posee receptores en la membrana basolateral, los cuales responden a la estimulación por agonistas específicos, dando lugar a efectos estimulantes o inhibitorios de la secreción ácida. Tres receptores destinados a la estimulación de la secreción ácida, han sido caracterizados hasta el momento: los muscarínicos de tipo M_3 , los histaminérgicos de tipo H_2 y los de gastrina/colecistocinina de tipo B. Estos responden fisiológicamente a los secretagogos acetilcolina, histamina y gastrina, respectivamente, y son capaces de potenciar sus acciones entre sí. Por otra parte, se han identificado tres receptores de tipo inhibitorio para la célula oxíntica: para el factor de crecimiento epidérmico, para la somatostatina y para la prostaglandina E (85) (Fig. 4).

Los secretagogos gástricos actúan sobre sus receptores específicos, desencadenando una serie de eventos intracelulares sólo parcialmente conocidos, que darán lugar, finalmente, a la secreción de HCl. Así, la estimulación de los receptores muscarínicos o de los gastrinérgicos, por mediación de proteínas G ligadas a trifosfato de guanosina, activa a la fosfolipasa C, enzima localizada en el espesor de la membrana celular, la cual cataliza la formación de IP_3 y DAG, a partir de la hidrólisis de fosfolípidos de membrana. El IP_3 media la

liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático, dando lugar a la elevación del Ca^{2+} libre citosólico. Por su parte, el DAG activa a la proteína cinasa C, una de cuyas funciones parece ser la fosforilación de proteínas que, probablemente, intervengan en el rearreglo del citoesqueleto para dar lugar a la conformación secretoria activa de la célula oxíntica. De persistir el estímulo prosecretorio, al agotarse el Ca^{2+} del retículo endoplasmático, tendría lugar la apertura de canales para el ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Aunque este aspecto aún no ha sido del todo esclarecido en las células oxínticas, en cultivos de células superficiales de mucosa gástrica humana, se ha descrito que el ingreso de Ca^{2+} procedente del medio extracelular, ocurre a través de los llamados SOCC, o canales de Ca^{2+} operados desde los depósitos intracelulares (no dependientes de voltaje), los cuales responden a la inhibición con LaCl_3 (50). Este mecanismo, denominado "entrada capacitativa de Ca^{2+} " sugiere que, una vez agotado el reservorio de Ca^{2+} del retículo endoplasmático, se genera una señal que resulta en la apertura de los SOCC de la membrana plasmática (50). Cabe señalar que la existencia de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, no ha podido ser demostrada en las células oxínticas. En resumen, el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular parece ser uno de los principales fenómenos que media la estimulación de la secreción ácida inducida por la acetilcolina y la gastrina, o sus equivalentes sintéticos, el carbacol y la pentagastrina (17, 85).

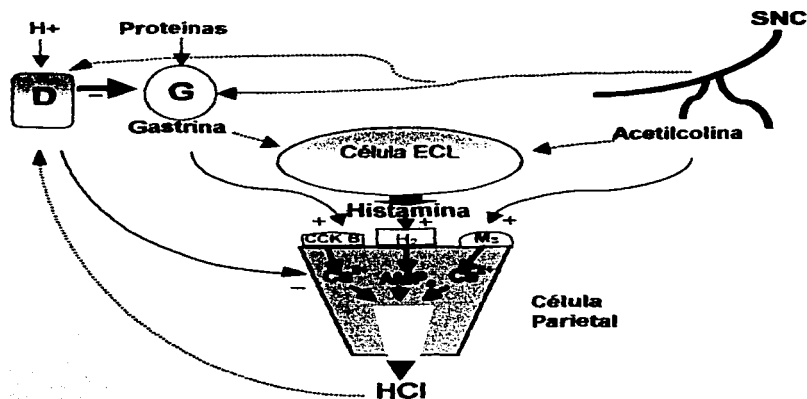


Fig. 4 Regulación de la secreción ácida gástrica. La gastrina (células G), la histamina (células ECL) y la acetilcolina liberada por las terminales colinérgicas del Sistema Nervioso Central (SNC), ejercen efectos estimulantes directos sobre la célula parietal. La somatostatina (producida en las células D), es un inhibidor de la secreción ácida, tanto por su efecto directo sobre la célula parietal, como por su capacidad para inhibir la liberación de gastrina e histamina. El Ca^{2+} y el AMP_c son los principales mensajeros intracelulares que median los estímulos secretorios (Soll y Berglinth, 1.994) (85).

Un mecanismo diferente parece estar presente en la estimulación del receptor H_2 por la histamina. Esta da lugar a la activación de la enzima adenilatoclasa de la membrana plasmática, aumentando así la concentración intracelular de AMP_c . Este, a su vez, se considera como el principal segundo mensajero involucrado en la estimulación de la actividad secretoria de la célula oxíntica por la histamina, a través de la activación de proteínas cinasas

dependientes de AMP_c (probablemente involucradas en la fusión, tráfico y reciclaje de membranas), y en la estimulación de la expresión genética de la subunidad α de la ATPasa gástrica (46, 59, 91). Aun cuando la estimulación de cada tipo de receptor conlleve a la elevación preferencial del AMP_c o del Ca²⁺ en la célula parietal, se ha sugerido la existencia de sinergismo entre estos dos mensajeros celulares, como parece indicarlo la discreta pero necesaria elevación en el Ca²⁺ intracelular que acompaña a la estimulación de los receptores H₂ por la histamina, y el requerimiento de niveles basales suficientes de AMP_c para que ocurra la estimulación por agentes colinérgicos o gastrina (54).

Otros elementos que participan en la regulación paracrina y endocrina de la secreción de HCl, son las células productoras de histamina en la mucosa gástrica, conocidas como ELC y las células G (productoras de gastrina), respectivamente. Las ELC liberan histamina en respuesta a estímulos específicos, entre los cuales se encuentran los agonistas gastrina y acetilcolina. Por su parte, las células G liberan gastrina, función estimulada por bombesina, acetilcolina y agentes β -adrenérgicos. Tanto la liberación de histamina por las ELC como la de gastrina por las células G, se inhiben por la somatostatina (Fig. 4). Como puede verse, la regulación de la secreción ácida gástrica es compleja, y depende de la coordinación de muchos elementos, tanto morfológicos como bioquímicos (33).

1.4 El Metabolismo Oxidativo en la Mucosa Gástrica. Regulación.

La célula oxíntica contiene mayor volumen de mitocondrias que cualquier otro tipo celular en los mamíferos, lo cual obedece a su intensa

actividad metabólica. En condiciones de estimulación, el ATP generado en las mitocondrias es utilizado principalmente para la secreción ácida (76). Diversos hallazgos parecen indicar que una actividad secretoria eficiente y prolongada sólo podría ocurrir en presencia de O_2 . Por ejemplo, en las glándulas gástricas del conejo, la glucólisis anaeróbica sólo aportaría el 1% del ATP proveniente del metabolismo oxidativo, el cual sustentaría tan sólo una pequeña fracción de la actividad secretoria (38). En general, se considera que la activación de la glucólisis y, probablemente, de la oxidación de ácidos grasos en la célula oxíntica estimulada, pudiera estar dirigida principalmente a proveer sustratos mitocondriales (77).

Un estrecho acoplamiento entre la secreción y el metabolismo parece estar presente en la mucosa gástrica normal. Parámetros tales como el consumo de O_2 (QO_2) y la velocidad de oxidación de sustratos preferenciales en preparaciones *in vitro*, se aceptan como indicadores eficientes de la actividad secretora ácida, ya que reflejan adecuadamente el intenso metabolismo de la célula oxíntica, más que el de cualquier otro tipo de célula epitelial gástrica (6, 26, 101). Así, en las glándulas gástricas de conejo se ha demostrado que el 90% de la oxidación de la glucosa se bloquea cuando se inhibe la secreción de HCl (26, 38), mientras que en biopsias de mucosa gástrica de perro, la estimulación de la secreción de HCl por histamina provoca un aumento generalizado de las vías oxidativas, consistentes con la producción de CO_2 a partir de la glucosa (77).

Existen diferencias en cuanto a los sustratos metabólicos preferentemente oxidados en la mucosa gástrica de cada especie animal, en función de factores,

tales como: la permeabilidad celular para los sustratos, la existencia o no de transportadores, la disponibilidad de sustratos endógenos o de cofactores para la actividad enzimática en diversas rutas metabólicas, etc., lo que se traduce en mayor o menor rendimiento energético para la secreción de HCl, a partir de un sustrato determinado. Así, en la mucosa gástrica aislada de ratas, la glucosa es el sustrato que sustenta más eficientemente la actividad secretoria ácida y su oxidación coincide con un aumento significativo del consumo de oxígeno (80). En contraste, en las células parietales aisladas de ratas en ayuno, cuya reserva de sustratos endógenos es menor, la combinación de glucosa con hidroxibutirato, lactato y/o isoleucina da lugar a un mayor rendimiento en la actividad secretoria medida a través de la acumulación de aminopirina (81). En el perro, la glucosa y los intermediarios del ciclo de Krebs constituyen los sustratos más eficientemente oxidados (77). En las glándulas gástricas aisladas de conejo, varios carbohidratos y ácidos grasos son oxidados preferentemente, por su eficiencia para sustentar el proceso secretor (piruvato, lactato, butirato e hidroxibutirato); en ausencia de ácidos grasos y cetonas, la glucosa también es un sustrato eficiente, ya que el nivel de sustratos endógenos es pobre (38, 39). En la mucosa gástrica humana, la oxidación de carbohidratos, especialmente la glucosa, resultó ser la más adecuada para la secreción de ácido tanto en condiciones basales, como en el caso de la estimulación por histamina (15). Por otra parte, en la mucosa gástrica de anfibios, la oxidación de ácidos grasos de cadena corta y mediana, tanto de origen endógeno como exógeno, así como la del glucógeno endógeno, parece ser más eficiente que la de la glucosa y los intermediarios glucolíticos, para

soportar energéticamente el proceso secretor ácido estimulado por la histamina o la teofilina (1, 14).

Además de las variaciones dependientes de cada especie animal en cuanto al tipo de sustrato preferentemente oxidado, también los diversos estímulos secretorios pueden dar lugar a respuestas metabólicas diferentes. En efecto, la oxidación de sustratos se puede estimular no sólo a través de la demanda energética impuesta por la actividad secretoria (relación ATP/ADP + P_i), sino por el efecto directo de los secretagogos, a través de sus mensajeros intracelulares específicos que modifican la actividad de algunas enzimas limitantes del flujo metabólico (34). En los anfibios, los efectos secretorios inducidos por la teofilina y la histamina, la velocidad de degradación del glucógeno inducida por la teofilina y la oxidación de la glucosa y el piruvato estudiados *in vitro*, demostraron su dependencia de la disponibilidad de Ca²⁺ extracelular (87). En las glándulas gástricas de conejo, la estimulación colinérgica de la secreción ácida se acopla fuertemente a la oxidación de la glucosa, la cual depende de la entrada de Ca²⁺ hacia las células. Aquí, el Ca²⁺ regula las actividades de algunas deshidrogenasas mitocondriales que forman parte del Ciclo de Krebs (34). El papel directo del AMP_c como regulador metabólico en la mucosa gástrica, también se ha estudiado. Este mensajero intracelular estimula la secreción ácida y el QO₂ en la mucosa gástrica de anfibios, pero la estimulación del QO₂ puede ocurrir aún en ausencia de actividad secretoria, lo cual sugiere un efecto metabólico directo (1). En esta misma preparación, el AMP_c aumentó también la actividad de fosforilasa y la glucógenolisis (2).

Las observaciones anteriores sugieren que el metabolismo oxidativo es una función complejamente regulada, en virtud de: las variaciones en los sustratos preferentemente oxidados para sustentar la actividad secretoria en cada especie animal, la respuesta metabólica diferencial a la estimulación por los secretagogos gástricos y los diferentes blancos de regulación metabólica para cada mensajero intracelular. No obstante, el estrecho acoplamiento estímulo-secreción-metabolismo se presenta como un elemento común a todos los hallazgos experimentales.

1.5 Rutas Metabólicas para la Oxidación de la Glucosa.

De los estudios metabólicos descritos anteriormente, se ha podido inferir la tendencia general en los mamíferos a oxidar con mayor eficiencia los carbohidratos, especialmente la glucosa y los intermediarios del ciclo de Krebs. Asimismo, el metabolismo mitocondrial constituiría la fuente energética fundamental para la secreción de ácido, mientras que los otros sustratos y rutas metabólicas aportarían intermediarios metabólicos al mismo. En tal sentido, la oxidación preferencial de la glucosa podría explicarse, al menos en parte, por su mayor facilidad para ingresar a la célula, respecto a otros sustratos, tales como el piruvato. No obstante, existen dos excepciones para esta generalización: 1) la mucosa gástrica de anfibio, cuya deficiencia de lipoato parece explicar por qué la oxidación de ácidos grasos, tanto endógenos como exógenos, es la ruta oxidativa preferencial, y 2) la mucosa gástrica de ratas, preparación en la cual, según lo sugerido por Sernka *et al.*, la vía de las pentosas es capaz de sustentar por sí misma la secreción ácida (80). Sin embargo, esta última consideración se ha puesto en duda, debido a las condiciones experimentales utilizadas y, en

particular, luego de que se descubriera que el mecanismo secretor de HCl es definitivamente dependiente de ATP.

Por lo anteriormente expuesto, a los fines de comprender mejor el presente trabajo, se presentan algunas generalidades en relación con las principales vías oxidativas de la glucosa (98).

1.5.1 La glucólisis.

La glucólisis es la ruta mediante la cual la glucosa se convierte a piruvato, vía fructosa-1,6-difosfato, con generación de 2 moles de ATP por mol de sustrato oxidado. Esta vía metabólica juega un papel fundamental en el metabolismo energético, por proveer una porción significativa de la energía utilizada por la mayoría de los organismos y por preparar a la glucosa para la degradación oxidativa. Bajo condiciones aeróbicas, el piruvato generado es adicionalmente oxidado por el complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, hasta obtener CO₂ y H₂O mientras que, bajo condiciones anaeróbicas, éste se convierte a lactato en el músculo y a etanol + CO₂ en las levaduras. La glucosa entra en la mayoría de las células gracias a un transportador específico que la traslada desde el medio extracelular hacia el citosol, donde están localizadas las enzimas glucolíticas. La fórmula general para la glucólisis, es:



Bajo condiciones aeróbicas, la oxidación mitocondrial de cada NADH a NAD⁺, genera 3 ATP. Por lo tanto, en la glucólisis aeróbica, el NADH puede considerarse

como un componente de alta energía, mientras que en la glucólisis anaeróbica, esta energía libre de oxidación, es disipada como calor. En líneas generales, las enzimas que controlan más fuertemente la glucólisis, y que por lo tanto son limitantes de la velocidad del flujo metabólico a través de esta vía, son la hexocinasa y la fosfofructocinasa. No obstante, en la mucosa gástrica canina, el control máximo parece ejercerlo esta última (77). El control ejercido por esta enzima es de tipo alostérico, y la misma es estimulada por mediadores como el AMP_c, e inhibida por ATP y citrato, entre otros (Fig. 5).

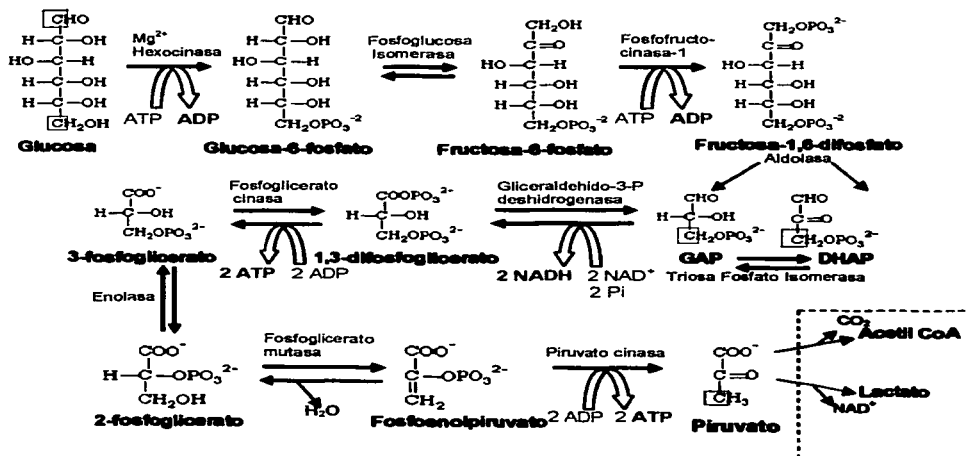


Fig. 5 Rutas Metabólicas para la Oxidación de la Glucosa: La Glucólisis. Esta vía cataboliza la glucosa, generando ATP, NADH e intermediarios metabólicos que pueden ingresar a otras vías oxidativas. Nótese que los carbonos 1 (□) y 6 (□) de la glucosa, pasan a ocupar la posición del carbono 3 del GAP y de la DHAP y, en consecuencia, del piruvato (□), con igual oportunidad de liberarse en las subsiguientes descarboxilaciones del Ciclo de Krebs.

1.5.2 La Vía de las Pentosas.

Esta vía, conocida también como la ruta del fosfogluconato, constituye una vía alternativa a la glucólisis. Su fórmula general, es:



Las enzimas de la vía de las pentosas están localizadas en el citosol y, en general, constituyen una ruta destinada a proveer intermediarios metabólicos para

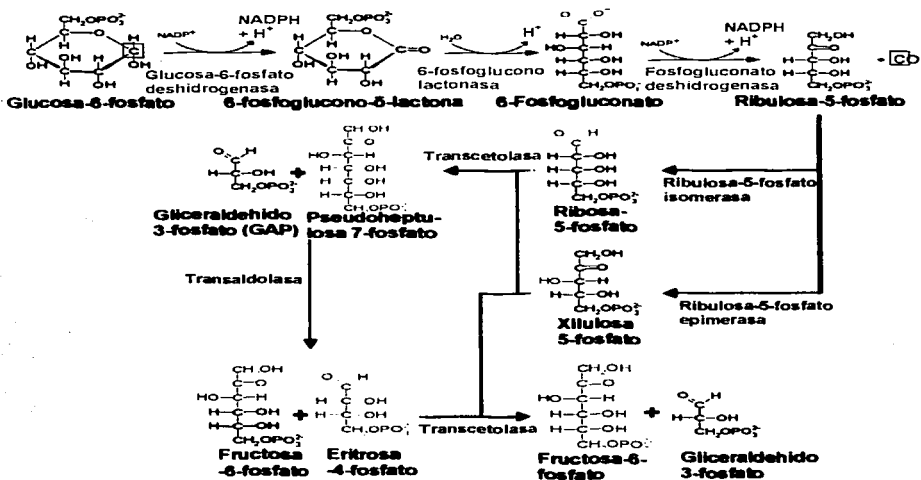
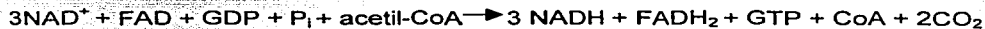


Fig. 6 Rutas metabólicas para la oxidación de la glucosa: la Vía de las Pentosas. Esta ruta alternativa para la oxidación de la glucosa, genera NADPH, CO_2 , Ribosa-5-fosfato, Fructosa-6-fosfato y GAP (este último puede ingresar a la vía glucolítica). El único paso decarboxilativo de esta vía, implica la liberación del carbono 1 de la glucosa-6-fosfato (□) previamente formada en la vía glucolítica, a partir de la glucosa.

otras reacciones celulares, tales como: el aporte de ribosa para la síntesis de ácidos nucleicos o el aporte de NADPH para la restauración del glutatión oxidado o para la síntesis de colesterol. A través de la vía de las pentosas, se libera el carbono 1 de la glucosa-6-fosfato, aunque un reciclaje del sustrato se asume que podría dar lugar a su oxidación total. Los metabolitos de la vía de las pentosas, luego de cumplir un ciclo degradativo completo, pueden derivar nuevamente hacia la glucólisis (Fig. 6). La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa parece ser la enzima que ejerce el mayor control en la velocidad de esta vía y su actividad es principalmente regulada por la relación $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ citoplásmica.

1.5.3 El Ciclo de Krebs.

El Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos o Ciclo de Krebs, consiste en una serie de reacciones que oxidan el grupo acetilo del acetil-CoA a dos moléculas de CO_2 , de modo tal que la energía libre es conservada para su utilización bajo la forma de ATP (Fig. 7). La fórmula general, es:



Este ciclo puede funcionar catalíticamente como una consecuencia de la regeneración del oxaloacetato. El NADH y el FADH_2 son productos vitales cuya reoxidación por el O_2 , por mediación de la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa, completa la degradación de los sustratos metabólicos, de modo tal que genera síntesis de ATP. Clásicamente, las enzimas que controlan más fuertemente el flujo metabólico a través del Ciclo de Krebs, son la citrato sintetasa, la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa, además del complejo de la piruvato deshidrogenasa, la cual no pertenece al ciclo,

pero lo regula fuertemente, a través de la disponibilidad de acetil-CoA para ingresar al mismo (Fig. 7).

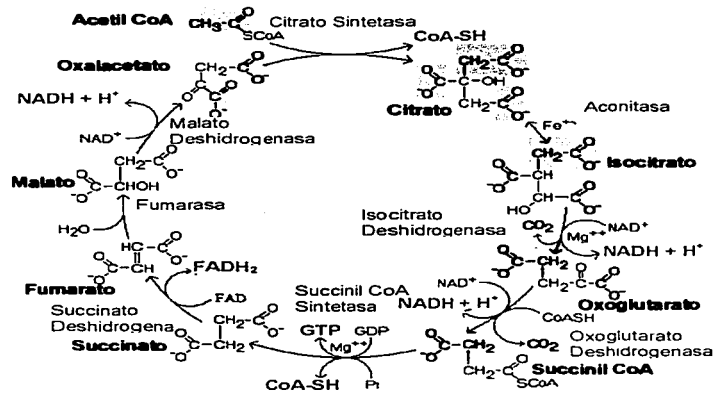


Fig. 7 Rutas metabólicas para la oxidación de la glucosa: El ciclo de Krebs. Este ciclo es considerado como la ruta catabólica de derivados glucolíticos, más eficiente para sustentar energéticamente la actividad secretoria ácida gástrica en la mayoría de los mamíferos, en función de los intermediarios de alta energía que éste aporta a la cadena respiratoria (NADH y FADH₂). En la gráfica, puede observarse cómo los carbonos procedentes del Acetil CoA () no son liberados en la primera vuelta del ciclo, sino los del oxalacetato (y). A partir de la segunda vuelta del ciclo, los carbonos del Acetil Coa ya están incorporados al oxalacetato y, entonces, pueden ser liberados en forma de CO₂.

1.6 La Integridad de la Mucosa Gástrica.

La mucosa gástrica, por su contacto con el contenido gástrico, así como a través del flujo sanguíneo, está expuesta a la acción agresiva de agentes

endógenos y exógenos. Entre los agentes endógenos, se encuentran: el HCl, la pepsina, las sales biliares, los radicales libres y la hipoxia generada por determinadas condiciones patológicas. Entre los agentes exógenos, podemos citar: las xantinas (Ej.: la cafeína), los ácidos fuertes, el etanol, la aspirina y demás antiinflamatorios no esteroideos (AINE), el hábito tabáquico, las bacterias patógenas (Ej.: *Helicobacter pylori*) y otros. Para hacer frente a estos factores, existen mecanismos de defensa en la mucosa gástrica, representados por: la producción de mucus y bicarbonato, la barrera mucosa, el factor de crecimiento epidérmico (FCE), las prostaglandinas citoprotectoras (PGE), el flujo sanguíneo (como proveedor de O_2 y como sistema de transporte de metabolitos tóxicos) y el sistema antioxidante, entre otros. La pérdida del equilibrio entre los factores agresivos y los defensivos, se considera actualmente el mecanismo fundamental que da lugar a las lesiones de la mucosa gástrica (Fig. 8) (11).

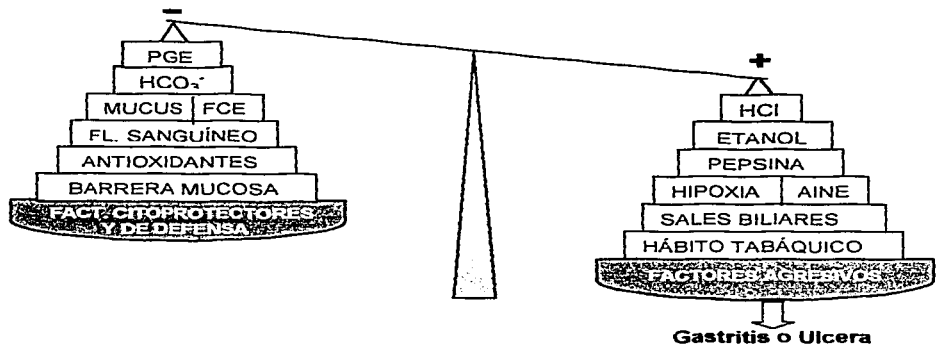


Fig. 8 La integridad de la mucosa gástrica: Agresión vs Protección.

2. Antecedentes

2.1 Etanol y Mucosa Gástrica.

Los primeros estudios realizados en torno a los efectos gástricos de la administración de etanol, consistieron en determinaciones electrofisiológicas y secretorias en el estómago de animales vivos. Los resultados coincidieron en señalar el tipo de cambios electrofisiológicos que la administración tópica de etanol genera en la llamada "barrera mucosa", algunos de los cuales son: alteraciones en el potencial transmucoso, retrodifusión de H^+ y Na^+ e inhibición del transporte activo de Cl^- , variando su intensidad en cada modelo experimental (21, 74, 78, 79).

No obstante, los efectos descritos para la acción del alcohol sobre la actividad secretoria, han resultado controversiales desde sus inicios. Mientras, según algunos autores, el tratamiento con alcohol no genera cambios en la secreción ácida (74, 82), otros han reportado efectos estimulantes en respuesta a la administración intragástrica o endovenosa de este agente (21, 24, 51, 72, 82), siendo atribuidos por algunos de ellos a la liberación de gastrina (51, 72, 82). En contraste, un efecto antsecretorio se ha reportado como una consecuencia de la administración tópica de etanol en el estómago de perros vivos (79), y en preparaciones *ex vivo* de estómago de ratas (19).

Estudios realizados predominantemente *in vitro*, han permitido investigar las perturbaciones metabólicas inducidas por el alcohol y su relación con el mecanismo secretorio de ácido, aunque aún sin resultados concluyentes. Así, la

incubación de fragmentos de mucosa gástrica canina en presencia de etanol al 20%, produjo una disminución significativa del contenido de ATP, sugiriendo que ésta es la causa de la inhibición del transporte activo de iones (89). Por otra parte, el tratamiento agudo *in vivo* con alcohol al 25%, no generó cambios en los niveles de nucleótidos de adenina en la mucosa gástrica de ratas, aislada inmediatamente después de retirado el agente, mientras que el etanol al 50% dio lugar a alteraciones en la fosforilación oxidativa (disminución en los niveles de ATP y aumento en los niveles de AMP_c), elevación del contenido tisular de glucosa y lactato y disminución del nivel de glucosa-6-fosfato. Estos efectos se atribuyeron a cambios en el flujo sanguíneo provocados por el alcohol, con subsiguiente hipoxia y activación de la glucólisis anaerobia, más que a efectos directos del agente sobre el metabolismo de la mucosa gástrica (97). En contraste, se ha propuesto un papel directo del alcohol a través de su oxidación por la alcohol deshidrogenasa gástrica, como responsable de los cambios secretorios y metabólicos observados en la mucosa gástrica de anfibios expuesta agudamente *in vitro* a este agente (12). En este estudio, concentraciones bajas de etanol (2-10%), estimularon significativamente la secreción ácida en la mucosa gástrica no estimulada, mientras que altas concentraciones ($\geq 20\%$) resultaron inhibitorias en la mucosa estimulada; la respiración aumentó progresivamente con concentraciones de etanol entre 2 y 20%, y éste efecto se asoció a disminución en la oxidación de algunos sustratos metabólicos y a un incremento en los niveles de lactato de la mucosa gástrica (12). Finalmente, en células aisladas de la mucosa gástrica de ratas, el alcohol a concentraciones $\geq 5\%$, indujo estrés

oxidativo y alteraciones mitocondriales, que se suponen preceden a la muerte celular (40).

Las investigaciones realizadas hasta ahora, coinciden en que no existe un mecanismo único de lesión del epitelio gástrico por el etanol, ya que dependiendo de su concentración, frecuencia y vía de administración, el etanol podría afectar a elementos intra- y extracelulares, para dar así lugar a grados variables de lesión de la mucosa gástrica. Lo anterior parece estar avalado por resultados experimentales según los cuales el etanol, además de los efectos electrofisiológicos, secretorios y metabólicos, sería capaz de alterar mecanismos citoprotectores de la mucosa gástrica, tales como el nivel de prostaglandinas (47), los factores de crecimiento (99, 64), el flujo sanguíneo (31, 68), la composición lipídica de la membrana plasmática y los niveles de peroxidación lipídica (36, 37), algunos de los cuales intervienen también en el fenómeno de regeneración epitelial gástrica.

Tal complejidad de efectos, unida a la variedad de condiciones experimentales y especies animales utilizadas, no han permitido precisar los efectos concretos del etanol sobre la secreción y el metabolismo. Además, muchas otras preguntas aún faltan por responder, tales como las que se refieren a los efectos de la administración crónica del etanol, los efectos independientes de su oxidación como sustrato y el papel mediador de los mensajeros intracelulares en la lesión del epitelio gástrico.

2.2 Etanol y Calcio.

En todos los organismos vivos, el calcio participa en importantes procesos fisiológicos, tales como: la contracción muscular, la acción hormonal y la regulación de la actividad enzimática (102). También en el epitelio gástrico, la homeostasis del Ca^{2+} contribuye a la modulación de la secreción ácida y del metabolismo en la célula oxíntica (16, 17, 34), al acoplamiento estímulo – secreción en las células zimogénicas (17) y a la recuperación de las lesiones de la mucosa gástrica (20, 90). Por otra parte, alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} parecen mediar ciertos procesos patológicos. Así, una elevación sostenida de la concentración del Ca^{2+} intracelular parece jugar un papel significativo en la degeneración patológica de varios tipos celulares, como las células musculares esqueléticas y cardíacas, los hepatocitos y las plaquetas (53, 71, 66, 62). En la mucosa gástrica, el Ca^{2+} también se ha implicado en los mecanismos de lesión epitelial. En apoyo a esta afirmación, existen resultados que revelan la participación del Ca^{2+} en el daño epitelial inducido por estrés (30, 95), indometacina (27, 95), alcohol (27, 30), ionóforos de Ca^{2+} (93), tromboxano B_2 (103) y sales biliares (23), entre otros. Algunos de los factores mediadores aparentemente involucrados, incluyen: las fosfolipasas (93), el factor activador plaquetario (69), la actividad de endonucleasas (92) y los radicales libres (58, 94), entre otros.

No obstante, el papel concreto del Ca^{2+} es controversial en cuanto al mecanismo de lesión inducido por el etanol en la mucosa gástrica. La administración oral de etanol en ratas, lesionó el epitelio gástrico y disminuyó el contenido de Ca^{2+} total de la mucosa gástrica, en forma dependiente de la

concentración (20 a 80% de alcohol) (102). En este mismo modelo, el tratamiento con los antagonistas de los canales de Ca^{2+} verapamil o felodipina, empeoró la magnitud de las lesiones (29, 56, 58, 70, 102), mientras que las sales de Ca^{2+} previnieron este efecto (58, 102), sugiriendo que la disminución inducida por el etanol en el contenido tisular de Ca^{2+} , forma parte de su mecanismo de lesión (102). En contraste, en otro estudio realizado también en ratas, el pretratamiento con diltiazem, Mg^{2+} o verapamil, redujo las lesiones inducidas por el etanol *in vivo* (27). En los experimentos *in vitro*, el pretratamiento con verapamil, nifedipina o MgCl_2 redujo la magnitud de las lesiones histológicas inducidas por el etanol en la mucosa gástrica de ratas (70). Tales contradicciones se atribuyen a los efectos sistémicos de los antagonistas de los canales de Ca^{2+} , adicionales a sus efectos sobre el ingreso de Ca^{2+} a las células (27, 29, 70) por lo que los experimentos *in vivo* con estos agentes, han resultado de utilidad limitada.

En otro tipo de experimentos, el ionóforo de Ca^{2+} A23187 aplicado *in vitro* a células aisladas de la mucosa gástrica, agravó las lesiones inducidas por el etanol, en forma dependiente del Ca^{2+} extracelular (96) mientras que la severidad de las lesiones pareció aumentar en presencia de Ca^{2+} en el medio de incubación (4) y disminuir en presencia de quelantes del Ca^{2+} extracelular (28, 30). En contraste, otros autores sugieren que las lesiones inducidas por el alcohol, disminuyen en un medio conteniendo Ca^{2+} (58, 90) o que la remoción del mismo no modifica las lesiones inducidas por el alcohol en células de la mucosa gástrica aislada de conejos (92). Una vez más se presentan resultados contradictorios que pudieran ser consecuencia de las variaciones entre las diversas preparaciones experimentales utilizadas, los diferentes esquemas de administración del etanol y

de los efectos sistémicos de los agentes utilizados para promover cambios en la concentración de Ca^{2+} .

3. Hipótesis

El etanol, administrado intragástricamente en ratas para provocar una gastritis subcrónica experimental, condiciona alteraciones en el metabolismo oxidativo de la glucosa y en la secreción de HCl en la mucosa gástrica y, en el mecanismo responsable de estos cambios, está involucrado el Ca^{2+} .

4. Objetivo General

Investigar las posibles alteraciones en el metabolismo oxidativo de la glucosa y en la función secretoria de ácido, y el papel que el Ca^{2+} podría jugar como mediador de estos cambios, en la mucosa gástrica de ratas con gastritis alcohólica subcrónica experimental.

5. Objetivos específicos

- Investigar posibles alteraciones en la oxidación de la glucosa, tanto por la vía glucolítica-ciclo de Krebs como por la vía de las pentosas, en la mucosa gástrica de ratas tratadas subcrónicamente con etanol. Correlacionar los hallazgos con otros parámetros metabólicos, tales como: el consumo de O_2 , los niveles de ATP, ADP, NADP⁺, lactato y piruvato, y las actividades enzimáticas.
- Investigar posibles alteraciones en la función secretoria de HCl, en la mucosa gástrica de ratas tratadas subcrónicamente con etanol.

- Determinar posibles alteraciones en el contenido de Ca^{2+} intracelular en la mucosa gástrica de ratas con gastritis alcohólica subcrónica experimental y tratar de dilucidar la naturaleza de estas alteraciones (movimientos de Ca^{2+} desde o hacia el medio extracelular, concentración de Ca^{2+} total en las fracciones subcelulares).
- Determinar si existe relación entre las posibles alteraciones en el estado secretor y metabólico, y las perturbaciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en la mucosa gástrica de ratas con gastritis alcohólica subcrónica experimental.
- Contribuir a dilucidar, al menos en parte, los mecanismos de lesión inducidos por la administración subcrónica de etanol en la mucosa gástrica de ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

El BAPTA-AM se obtuvo de Molecular Probes (Eugene, OR). Omeprazole (Losec®), fue adquirido comercialmente de Astra Chemicals, S.A. (México). La D-[U-¹⁴C] Glucosa (261mCi/mmol, uniformemente marcada), D-[1-¹⁴C] Glucosa (54.5mCi/mmol) y la D-[6-¹⁴C] Glucosa (56.0mCi/mmol), se obtuvieron de Amersham (UK), mientras que la aminopirina [dimetilamina-¹⁴C] (99.5mCi/mmol), [¹⁴C (U)] sacarosa (600mCi/mmol) y el ⁴⁵Ca²⁺, fueron de New England Nuclear Life Science Products, Inc. (Boston, MA). TES, HEPES, MOPS, EGTA, EDTA, hiamina, carbacol, dihidrocloruro de histamina, cimetidina y otros reactivos, fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

2. Modelo Animal.

El modelo de lesión subcrónica inducida por etanol en la mucosa gástrica de ratas Wistar, se describió en detalle anteriormente (36). En resumen, ratas macho con un peso corporal de 230 a 270 g, se sometieron a un ayuno por toda la noche con libre acceso al agua, luego de lo cual se trataron con: 1 ml de solución salina (grupo control) o 1 ml de etanol al 50% (grupo experimental), mediante gavaje intragástrico. Seguidamente, los animales tuvieron acceso libre al alimento, y al agua (grupo control) o a etanol al 5% en solución acuosa (grupo experimental). Este régimen se continuó por 5 días, al cabo de los cuales, el etanol se retiró y los animales se sacrificaron por decapitación bajo una dosis letal de anestesia general (pentobarbital sódico), previo ayuno nocturno y luego de dos horas de haber retirado el alcohol. Con este modelo experimental se induce una lesión no

hemorrágica de la mucosa gástrica, con características similares a las de una gastritis alcohólica subcrónica humana (36).

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la *Guía Institucional para la Experimentación Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México* (NOM-062-ZOO-1999).

3. Aislamiento de la mucosa gástrica.

La mucosa gástrica de ratas se aisló tal como se ha reportado anteriormente (80). Brevemente, se removieron los estómagos de ratas inmediatamente después del sacrificio, se abrieron por la curvatura menor y se lavaron en solución salina fría. El área glandular se separó de la capa muscular y se rebanó hasta obtener pequeños fragmentos o tiras, los cuales se lavaron tres veces y finalmente se resuspendieron en el medio de incubación (solución TES) conteniendo (en mM): TES, 10; NaCl, 133.3; KCl, 5.0; MgSO₄, 1.0; CaCl₂, 1.0; Na₂HPO₄, 1.0 y glucosa, 10 (pH 7.4), a menos que algún cambio fuera especificado.

4. Oxidación de glucosa

La velocidad de oxidación de la glucosa a través de la vía de las pentosas y de la vía glucolítica-ciclo de Krebs, fue estimada comparativamente, cuantificando la producción de ¹⁴CO₂ a partir de los isótopos de la glucosa [¹⁻¹⁴C] glucosa, [⁶⁻¹⁴C] glucosa y [^{U-14}C] glucosa, según lo descrito por Sernka *et al* (80). Fragmentos de mucosa gástrica suspendidos en solución TES, se incubaron con 0.4 a 0.8 µCi de un isótopo de la glucosa, con adición de los reactivos a probar,

en un volumen final de 2 ml, en una atmósfera con 95% O₂ - 5% CO₂, a 37° C, durante 90 minutos y en presencia de 0.2 ml de hiamina 100 mM como atrapador de ¹⁴CO₂. La reacción se detuvo mediante la adición de 0.5 ml de HClO₄ al 6% y la preparación continuó incubándose durante 30 minutos adicionales, a fin de permitir la completa liberación del CO₂. La hiamina contenida en el compartimiento central de los matraces, se transfirió a un vial de conteo en 10 ml de líquido de centelleo, conteniendo: PPO 0.3% (p/V), xileno al 60%, etanol al 10.6%, etilenglicol al 3.7% y Tritón X-100 al 25.7%. El tejido contenido en cada frasco se centrifugó y secó a 60° C durante la noche, para determinar el peso seco. La actividad específica se determinó en alícuotas del medio de incubación. Se incluyeron preparaciones sin tejido como blancos en todos los experimentos, con los cuales se efectuaron las correcciones del quencheo. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. La velocidad de oxidación se expresa como nanomoles de glucosa por hora y por miligramo de proteína tisular.

5. Consumo de O₂ (QO₂).

Alícuotas de la suspensión de fragmentos de mucosa gástrica se colocaron en la celda del oxímetro (Yellow Spring Inc, Ohio, USA), con agitación permanente, en solución TES gaseada (O₂ al 95% + CO₂ al 5%). Los cambios en la concentración de oxígeno fueron registrados con un electrodo y el QO₂ se calculó y expresó como nanoátomos de O₂ x min⁻¹ x mg proteína tisular⁻¹.

6. Acumulación de Aminopirina.

La acumulación de aminopirina se considera como un indicador de la región intraglandular de pH relativamente bajo (pH < 5) y de la formación de gradiente de

protones debido a transporte de H^+ (5, 15). Esta se determinó por la técnica descrita por Chacín et al (15) con modificaciones menores. Fragmentos de mucosa gástrica (6 – 8 mg de peso seco), fueron gaseados (O_2 al 95% – CO_2 al 5%) durante 2 minutos e incubados a $37^\circ C$ durante 1 hora en el medio de incubación descrito, incluyendo los reactivos a probar y [^{14}C]-aminopirina 0.1 $\mu Ci/ml$, en un volumen final de 5 ml. Luego de la incubación, el contenido de cada matraz se centrifugó para separar el sobrenadante. El sedimento se transfirió inmediatamente a viales de conteo, donde fue secado durante la noche a $80^\circ C$, para luego pesarse y solubilizarse en 1 ml de NaOH durante 24 horas. Después de la neutralización con HCl concentrado y adición de 15 ml de líquido de centelleo, la radiactividad fue determinada en un espectrofotómetro LS 5801 (Beckman Instruments, Inc., Irvine, U.S.A). 20 μl de los sobrenadantes por duplicado fueron contados de la misma manera. El agua intraglandular se determinó en fragmentos de mucosa gástrica tanto de animales sanos (controles) como de animales tratados con etanol, en series simultáneas de experimentos, utilizando [^{14}C]-sacarosa como un marcador para el espacio extraglandular (15). Los tejidos fueron incubados y procesados como fue descrito previamente, con 1 μCi de [^{14}C -sacarosa] por mililitro de tejido. El peso húmedo y el peso seco del tejido fueron determinados para calcular el contenido de agua total. El espacio extraglandular fue calculado a partir del contenido de [^{14}C] sacarosa del tejido y este valor fue restado del agua total, para estimar el agua intraglandular. Un valor promedio de $2.4 \pm 0.4 \mu l/mg$ (controles) y $2.6 \pm 0.4 \mu l/mg$ de peso seco (etanol) fue determinado para el agua intraglandular (12 experimentos). Luego de efectuar las correcciones para la aminopirina en el espacio extraglandular, se calculó la

relación entre la aminopirina en el agua intraglandular y la aminopirina en el agua extraglandular. Cuando se utilizó el BAPTA-AM, todas las muestras fueron preincubadas durante 15 minutos en ausencia de aminopirina para permitir la incorporación del reactivo a la célula y el solvente utilizado (DMSO) también se añadió a los controles.

7. Microscopía Electrónica de Transmisión.

Fragmentos de mucosa gástrica, aislada como se describió anteriormente, se procesaron para microscopía electrónica de transmisión, de acuerdo con la técnica reportada por Berglindh et al (5). Las muestras se fijaron durante 2 horas en glutaraldehído al 2.5% diluido en buffer de fosfatos 100mM, pH 7.4 y la post-fijación fue realizada con tetraóxido de osmio al 1% durante 1 hora, para luego practicar cortes de 600 a 800 Å. El contraste se obtuvo con citrato de plomo y acetato de uranilo, ambos al 2%. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (Jeol 1200 CX-II, Japón). En un total de 50 células parietales seleccionadas al azar, correspondientes a 3 muestras de tejidos de cada condición experimental (animales sanos y animales con gastritis alcohólica), el estado estimulado (secretante) o no estimulado (no secretante) de estas células fue identificado, de acuerdo con las características morfológicas descritas en la introducción y reportadas previamente (3, 5). El porcentaje del área celular ocupada por el canalículo intracelular dilatado, característico del estado estimulado, se determinó en el grupo experimental, comparado con el del grupo control.

8. Captación de Calcio.

La captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ se estudió como se describió previamente (13), con cambios menores. Para estos experimentos, fragmentos de mucosa gástrica se incubaron por diferentes períodos a 37°C , en la solución TES descrita, conteniendo $0.2\ \mu\text{Ci/ml}$ de $^{45}\text{CaCl}_2$, previo gaseado ($95\%\ \text{O}_2 - 5\%\ \text{CO}_2$). Inmediatamente después, el contenido de los matraces se transfirió a tubos de centrífuga conteniendo $\text{LaCl}_3\ 1\text{mM}$ y se centrifugó a $6,000\ \text{rpm}$ por 1 minuto. El sedimento se resuspendió en $\text{LaCl}_3\ 1\text{mM}$ y en solución TES sin Ca^{2+} y se centrifugó una vez más. El sedimento fue resuspendido en solución TES sin Ca^{2+} conteniendo EGTA 1mM , para ser centrifugado una vez más a $6,000\ \text{rpm}$. El sedimento final se secó durante la noche, se pesó y solubilizó en $1\ \text{ml}$ de $\text{NaOH}\ 1\text{N}$, fue neutralizado con $\text{HCl}\ 2\text{N}$ y $12\ \text{ml}$ de líquido de centelleo se añadieron para el conteo del centelleo. La captación se calculó en término de nanomoles de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por miligramo de proteína tisular, sobre la base de las determinaciones de la actividad específica.

9. Salida de Calcio

Las mediciones de la salida de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fueron realizadas como se describió previamente (13). Tiras de mucosa gástrica de ratas, previamente pesadas, se lavaron en solución TES sin Ca^{2+} y se incubaron a 37°C durante 2 horas, en solución TES con $0.2\ \mu\text{Ci/ml}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ y $\text{CaCl}_2\ 1.8\text{mM}$. Inmediatamente después de esta incubación, el tejido se escurrió suavemente sobre papel de filtro y se transfirió al primero de una serie de matraces conteniendo $2\ \text{ml}$ de solución TES libre de Ca^{2+} . Cada tira de mucosa gástrica fue subsecuentemente transferida a los siguientes frascos de la serie, a diferentes intervalos, hasta completar 90

minutos. La incubación se realizó a 37° C, con agitación continua y previo gaseado de los matraces (O₂ al 95% – CO₂ al 5%) y, una vez concluida, la mucosa fue digerida en NaOH concentrado y neutralizada con HCl, y la radioactividad del tejido fue contada en un vial con 12 ml de líquido de centelleo. Cada solución de lavado, por su parte, se secó por dos horas (80° C), el polvo ya seco fue disuelto en 0.5 ml de agua destilada y la radioactividad fue contada en un vial con 12 ml de líquido de centelleo. La radioactividad total del tejido al final de las mediciones de flujo, fue la suma de las cuentas totales en cada lavado, más las del tejido digerido. Los resultados se expresan como porcentaje del total de ⁴⁵Ca²⁺ incorporado.

10. Contenido de Calcio Total.

Para las determinaciones del contenido de Ca²⁺ total en fracciones subcelulares, 3 mucosas gástricas aisladas tanto de controles como de animales tratados con alcohol (3 por grupo experimental), se mezclaron y homogeneizaron en un buffer conteniendo 0.25 M de sacarosa y 10 mM HEPES/KOH (pH 7.4). Los homogeneizados se centrifugaron a 3,000 g x 10 minutos, a 4° C, y el sobrenadante resultante se centrifugó ahora a 10,000g x 10 minutos a 4° C. A continuación, el sedimento obtenido se resuspendió en 2 ml de H₂O tridestilada y esto constituyó la fracción mitocondrial cruda, mientras que el sobrenadante respectivo, fue centrifugado a 45,000 g x 1 hora a 4° C. El sobrenadante resultante de esta última centrifugación, constituyó la fracción citosólica. Para la medición del Ca²⁺ total, tanto la fracción mitocondrial como la citosólica se desproteinizaron mediante la adición de HClO₄ al 70% en proporción 1:10, y centrifugación a 10,000 r.p.m. por 10 minutos en una microcentrífuga. El LaCl₃ al

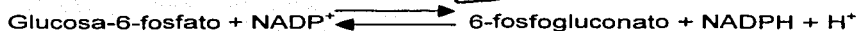
10% se añadió a los sobrenadantes de ambas fracciones en proporción 1:10, para prevenir la ionización del Ca^{2+} durante el ensayo espectrométrico. Las muestras fueron congeladas hasta el momento de realizar las determinaciones. El contenido de Ca^{2+} de las fracciones desproteinizadas se midió mediante espectrometría de absorción atómica de flama, de acuerdo con Díaz-Muñoz *et al.* (22) utilizando un Espectrómetro (SpectraAA-110, Varian, Palo Alto, USA), previamente calibrado con estándares externos, a una longitud de onda de emisión de 422.7 nm (Ca^{2+}), con una mezcla estequiométrica de óxido nítrico (oxidante)/acetileno (combustible) a 2,800° C y flama reductora con cono rojo de 1.5 cm de altura y 0.5 nm de apertura. De las lecturas obtenidas, se sustrajo el valor de los blancos y los resultados fueron expresados como nanomoles de Ca^{2+} total x mg de proteína de la fracción subcelular respectiva.

11. Actividades enzimáticas.

Se determinaron las actividades de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfofructocinasa-1, por ser consideradas estas como pasos limitantes de la velocidad del flujo metabólico a través de la vía de las pentosas y de la vía glucolítica, respectivamente. Asimismo, la actividad de las enzimas succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa fue determinada para investigar la posibilidad de alteraciones mitocondriales. La actividad de la citocromo c oxidasa se utilizó también para investigar posibles cambios en el contenido total de proteína mitocondrial en la mucosa gástrica de ratas tratadas con etanol.

11.1 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

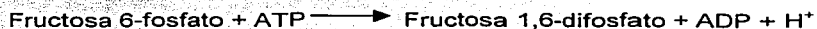
La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) cataliza la reacción:



Esta enzima citosólica se ubica en el primer paso de la vía de las pentosas y su actividad se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Lörh y Waller en el citosol de la mucosa gástrica (55). Alícuotas de la fracción citosólica (33 µg de proteína) se incubaron durante 5 minutos a 25° C en buffer trietanolamina 50 mM/EDTA 5 mM, pH 7.5, en presencia de NADP⁺ 0.5 mM. Al final del período de incubación, se añadió glucosa-6-fosfato 0.67 mM a la mezcla de reacción, la actividad enzimática se midió a 340 nm cada 2 minutos, durante 10 minutos y el promedio de las lecturas fue calculado. Los resultados se expresan en nanomoles de NADPH/ minuto x mg proteína.

11.2 Fosfofructocinasa -1.

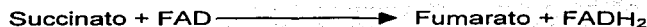
La fosfofructocinasa – 1 (EC 2.7.1.56) cataliza la reacción:



Esta actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente utilizando la técnica descrita por Massey y Deal (60), en la fracción citosólica de la mucosa gástrica. Aproximadamente 100 µg de proteína citosólica, se colocaron en presencia de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8, MgCl₂ 5 mM, KCl 50 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM, aldolasa 10 mg/ml, α-glicerofosfato deshidrogenasa y triosa fosfato isomerasa 10 mg/ml, NADH 0.2 mM, ATP 2 mM y fructosa-6-fosfato 4 mM, en un volumen final de 1 ml y la actividad de la enzima fue medida a 25°C, a 340 nm, cada 2 minutos, durante 10 minutos. Los resultados se expresan como nanomoles de NADH oxidado/ minuto x mg de proteína citosólica.

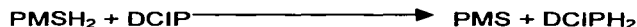
11.3 Succinato deshidrogenasa.

La succinato deshidrogenasa (EC 1.3.99.1), la única enzima del Ciclo de Krebs embebida en la membrana mitocondrial interna, cataliza la siguiente reacción:



Su actividad fue determinada en la fracción mitocondrial purificada, obtenida a partir de homogeneizados de mucosa gástrica. La fracción mitocondrial cruda, aislada como se describió anteriormente, se resuspendió en presencia de EGTA 1 mM y EDTA 0.5 mM, ADP 2 mM, MgCl_2 2 mM y albúmina bovina fracción V (libre de ácidos grasos) 0.2% (V. F. 5 ml) y fue incubada a 4° C x 10 minutos. Luego, la mezcla fue diluida en 9 volúmenes de un medio conteniendo: buffer MOPS/KOH 20 mM, pH 7.4, KCl 120 mM y EGTA 1 mM y centrifugada a 10,000 r.p.m. x 10 minutos. La actividad enzimática fue medida de acuerdo a la técnica descrita por King (48): alícuotas de fracciones mitocondriales (500 μg de proteína) fueron añadidas a la mezcla de reacción, conteniendo: buffer fosfato 50 mM - pH 7.4, Succinato 40 mM, PMS 0.9 mM, DCIP 50 μM , Albúmina Bovina fracción V (libre de ácidos grasos) 0.1% y $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ 1.5 mM.

Las reacciones que ocurren en el ensayo utilizado para medir la actividad de la enzima, son:



La absorbancia fue medida espectrofotométricamente a 660 nM. La actividad es expresada en micromoles de succinato oxidado/minuto por miligramo de proteína mitocondrial.

11.4 Citocromo C oxidasa.

Ecuación general:



La actividad de la enzima citocromo c oxidasa (EC 1.9.3.1) fue cuantificada de acuerdo con el método de Rafael (73). En la celda de un oxímetro (Yellow Springs Inc, Ohio-USA), fueron colocados los siguientes reaccionantes: buffer de fosfatos 50 mM/EDTA 1mM, pH 7.2, ascorbato 7 mM, Citocromo C 85µM y TMPD 0.7 mM, y fueron gaseados (O₂ al 95% - CO₂ al 5%). Una vez estabilizada la lectura basal, se añadieron alícuotas de homogeneizado de mucosa gástrica o de la fracción mitocondrial purificada, en un volumen final de 3 ml y a 25° C. La variación en el consumo de O₂ fue determinada y la actividad de la enzima fue expresada en nanoátomos de O₂ consumido/ minuto x miligramo de proteína del homogeneizado o de la fracción mitocondrial.

12. Piruvato, Lactato, ADP, ATP y NADP⁺.

Tiras de mucosa gástrica de ratas, tanto controles como experimentales, fueron incubadas como fue descrito para la oxidación de glucosa, pero en ausencia de isótopos y, pasados 90 minutos, el tejido fue homogeneizado en HClO₄ y centrifugado por 2 minutos a 10,000 g y 4° C, para obtener el extracto perclórico (sobrenadante), en el cual se practicaron todas las determinaciones.

12.1 Piruvato y Lactato.

La concentración tisular de piruvato y de lactato, fue determinada a partir de la reacción de la enzima lactato deshidrogenasa, tal como fue descrita por Bucker et al (8) y por Hohorst (42), respectivamente.

Para determinar los niveles de piruvato, se colocó una alícuota de extracto perclórico de mucosa gástrica, balanceado con K_2CO_3 a pH ~ 7.6, en la celda del espectrofotómetro, conteniendo buffer trietanolamina 0.4 M, pH 7.6 y NADH 75 μ M, en un volumen final de 1 ml. La reacción fue iniciada mediante la adición de lactato deshidrogenasa (20 μ g/ml) y se practicaron las lecturas a 340nm, cada 2 minutos, hasta agotar la reacción. Los resultados fueron expresados en micromoles de piruvato/g de proteína tisular.

Los niveles de lactato fueron determinados colocando una alícuota de extracto perclórico de mucosa gástrica, balanceado con K_2CO_3 , en la celda del espectrofotómetro, conteniendo buffer de sulfato de hidrazina 0.4 M/Glicina 1M, pH 9.5 y NAD^+ 83 μ M, en un volumen final de 1ml. La reacción fue iniciada mediante la adición de lactato deshidrogenasa 20 μ g/ml y se practicaron las lecturas a 340 nm, cada 2 minutos, hasta agotar la reacción. Los resultados fueron expresados en micromoles de lactato/g de proteína tisular.

12.2 ATP y ADP.

Las concentraciones de ATP y ADP tisular fueron determinadas mediante HPLC, siguiendo la técnica descrita (32, 41). Brevemente, alícuotas de los extractos perclóricos fueron sometidas al estudio en presencia de un buffer de

corrimiento a base de KH_2PO_4 , hidróxido de tetrabutil amonio 25mM, y metanol grado HPLC, utilizando un Cromatógrafo de Líquidos (Laboratory Data Control, Florida, USA), con una columna $\mu\text{Bondapak C18}$ de fase reversa (Waters®, U.S.A.), a 250nm de longitud de onda y con un flujo de 1.0 ml/minuto. Se utilizaron estándares externos de nucleótidos y los cálculos se basaron en el tiempo de elución característico para cada nucleótido. Los resultados fueron expresados en micromoles/mg de proteína.

12.3 NADP⁺.

El contenido de NADP⁺ libre tisular se determinó en ensayos acoplados a la reacción de la enzima málica, como una modificación de la técnica descrita por Wise y Ball (100). Alícuotas de extractos perclóricos, se colocaron en una celda para espectrofotómetro, conteniendo: Buffer Tris/MgCl₂ 45 mM, pH 7.4, malato 0.56 mM y 0.125 unidades de enzima málica de hígado de pollo, en un volumen final de 1 ml, a 25° C. El curso de la reacción se siguió espectrofotométricamente a 340nm. El contenido de NADP⁺ se expresa como μmoles de NADP⁺ total/mg de proteína. Para los cálculos, se utilizó un coeficiente de extinción de $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol} \times \text{cm}$, a 340 nm.

13. Concentración Tisular de ADN.

La concentración de ADN tisular, fue determinada en homogeneizados de mucosa gástrica de ratas, utilizando el Método descrito por Burton (9). La técnica está basada en la reacción de color producida entre la difenilamina y la desoxirribosa. El reactivo de difenilamina, contiene: Difenilamina (C.F: 2%)

diluida en ácido acético glacial, ácido sulfúrico al 1.5% y acetaldehído acuoso al 0.008%. Se prepararon extractos proteicos, mediante el tratamiento de los homogeneizados con ácido tricloroacético (C.F.: 10%), calentamiento en ebullición durante 20 minutos y centrifugación a 7,000 r.p.m. A continuación, el ADN fue extraído con HClO_4 1N y a este extracto perclórico se añadió reactivo de difenilamina en proporción 1:2, para ser luego incubado durante 17 horas a una temperatura de 37° C. Finalmente, el desarrollo del color se cuantificó a una longitud de onda de 600 nm y el contenido de ADN se determinó haciendo uso de una curva estándar de ADN (esperma de salmón). Los resultados se expresan como μg de ADN/mg de proteína total.

14. Concentración de proteínas y relación proteínas/peso seco.

En alícuotas de mucosa gástrica homogeneizada, obtenidas en cada experimento, fueron determinados el peso seco y el contenido de proteínas, éste último mediante el método de Lowry modificado (57). Se calculó así la relación proteínas/peso seco en la mucosa gástrica, la cual sirvió para expresar los resultados en función del contenido tisular de proteínas.

15. Análisis estadístico.

Todos los resultados han sido expresados como promedios \pm EE. La significancia estadística de las diferencias entre grupos, se determinó por medio de ANOVA y, en caso de significancia, mediante el test *ad hoc* de Newman-Keuls.

RESULTADOS

1. Cambios inducidos por el etanol, sobre la oxidación de la glucosa.

En el presente trabajo, se seleccionó la glucosa como el sustrato metabólico a investigar, en función de los antecedentes que sugieren que este es el sustrato cuya oxidación sustenta más eficientemente el proceso secretor de HCl en la mucosa gástrica de ratas (80, 81). Con el fin de seleccionar una concentración de glucosa adecuada para realizar los experimentos tanto metabólicos como secretorios, se realizó una curva de oxidación de glucosa en función de la concentración de este sustrato, obteniéndose como resultado una K_m aparente de 1.3 ± 0.3 mM y una V_{max} aparente de 11.1 ± 0.5 nmoles de glucosa oxidada/mg de proteína x hora, en la mucosa gástrica control. Estos resultados sirvieron de base para seleccionar 10 mmol/L como la concentración de glucosa adecuada para obtener respuestas cercanas al máximo, tanto en los experimentos metabólicos, como en los secretorios. Para conocer la velocidad del flujo metabólico a través de las diferentes vías oxidativas de la glucosa, la oxidación de este sustrato se midió en presencia de diferentes isótopos de la glucosa, marcados radiactivamente en los carbonos C1, C6 o en todos los carbonos (U) (Tabla 1). En animales con lesión gástrica crónica inducida por etanol, la oxidación total de la glucosa (medida a partir la U-¹⁴C-glucosa), se incrementó al doble de la observada en los controles. Este incremento se reflejó con igual magnitud en la oxidación medida a partir de los isótopos 1-¹⁴C-glucosa y 6-¹⁴C-glucosa, sugiriendo que el aumento en la capacidad oxidativa observado en la

Tabla I. Oxidación de la [1-¹⁴C]-, [6-¹⁴C]- y [U-¹⁴C]-glucosa por la mucosa gástrica de ratas tratadas crónicamente con etanol.

Tratamiento	OXIDACIÓN DE ISÓTOPOS DE LA GLUCOSA (nmoles x h ⁻¹ x mg de proteína tisular ⁻¹)					
	[1- ¹⁴ C]	n	[6- ¹⁴ C]	n	[U- ¹⁴ C]	n
Control	9.9 ± 1.2	16	6.2 ± 0.7	8	8.9 ± 0.6	11
Etanol (Gastritis)	20.6 ± 2.0 ^(a)	13	12.9 ± 1.7 ^(a)	8	18.8 ± 2.1 ^(a)	9
Control + Omeprazole	—	—	—	—	7.3 ± 0.3 ^(a)	4
Etanol + Omeprazole	—	—	—	—	12.0 ± 0.6 ^(b)	4

Fragmentos de mucosa gástrica aislada de ratas normales y de ratas tratadas con etanol, fueron incubados en la solución TES descrita, en presencia de isótopos de la glucosa marcados con ¹⁴C (C. F.:10 mM de glucosa), a 37° C, durante 90 minutos. Luego, se añadió HClO₄ al 6% para finalizar las reacciones metabólicas, y la incubación prosiguió durante 30 minutos más para favorecer el desprendimiento del ¹⁴CO₂. Los controles corresponden a ratas tratadas con solución salina. Los resultados fueron expresados como promedios ± EE de *n* preparaciones individuales. (a) P < 0.05 vs el control respectivo. B) P < 0.05 vs etanol (gastritis).

mucosa gástrica crónicamente lesionada por el etanol, no está asociado a cambios en la contribución relativa de cada una de las rutas metabólicas involucradas (glicólisis, ciclo de Krebs o vía de las pentosas). Cabe señalar que, en determinaciones adicionales de la oxidación total de la glucosa a partir de la U-¹⁴C-glucosa, practicadas en animales con gastritis alcohólica 72 horas después de retirado el tratamiento con etanol, pudo observarse cómo el efecto estimulante

del metabolismo oxidativo persiste, aunque en un porcentaje menor respecto al control ($46.2 + 8.8\%$ vs controles sanos; $P < 0.05$, $n = 5$).

Por otra parte, se determinó la contribución de la vía de las pentosas a la oxidación total de la glucosa, mediante la relación $1\text{-}^{14}\text{CO}_2/6\text{-}^{14}\text{CO}_2$ liberado. La molécula de glucosa no se decarboxila en la vía glucolítica, sino que lo hace el producto glucolítico piruvato, a través de vías metabólicas subsiguientes (en el paso de piruvato a acetil-CoA y en el ciclo de Krebs). El piruvato, producto de la glucólisis, tiene la misma posibilidad de derivarse tanto del intermediario DHAP (carbonos 1, 2 y 3 de la glucosa) como del intermediario GAP (carbonos 4, 5 y 6 de la glucosa) y, según el caso, el carbono 1 o el carbono 6 de la glucosa ocuparán la posición 3 en la molécula de piruvato (Fig. 5). Así, cuando la glucosa es degradada solamente a través de la vía glucolítica, el carbono 1 o el carbono 6 de la glucosa, ocupando la posición 3 en el piruvato, pasarán a ocupar la posición 2 del acetil-CoA e ingresarán al ciclo de Krebs para ser liberados en cantidad equimolar en las subsiguientes decarboxilaciones. Por ello, la relación $1\text{-}^{14}\text{CO}_2/6\text{-}^{14}\text{CO}_2$ liberado a partir de la $1\text{-}^{14}\text{C}$ -glucosa y de la $6\text{-}^{14}\text{C}$ -glucosa, respectivamente, debería ser igual a la unidad. En contraste, cuando la vía de las pentosas contribuye conjuntamente con la vía glucolítica a la oxidación total de la glucosa, al $1\text{-}^{14}\text{CO}_2$ liberado en el ciclo de Krebs, se suma el $1\text{-}^{14}\text{CO}_2$ producto de la decarboxilación del carbono 1 de la glucosa, que ocurre a través de esta vía alterna cuando el intermediario 6-fosfogluconato se decarboxila (Fig. 6). En tal circunstancia, la relación $1\text{-}^{14}\text{CO}_2/6\text{-}^{14}\text{CO}_2$, sería mayor que la unidad (80). Basados en los datos de la tabla 1, la producción de CO_2 como una función de la relación $1\text{-}^{14}\text{C}/6\text{-}^{14}\text{C}$ fue de 1.6 y, al ser mayor que la unidad, sugiere que la

mucosa gástrica realmente tiene una vía de las pentosas activa que contribuye a la oxidación de la glucosa, en concordancia con lo reportado previamente (80). Este hallazgo fue corroborado mediante la medición de la actividad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en fracciones citosólicas obtenidas a partir de homogeneizados de mucosa gástrica (Tabla 2), con lo cual se demuestra que esta deshidrogenasa está presente en la mucosa gástrica y que su actividad medida *in vitro* es de magnitud similar en ambos grupos experimentales (gastritis vs. control). Adicionalmente, no se observaron cambios significativos en la K_m de esta enzima para su sustrato, glucosa 6-fosfato, inducidos por el tratamiento con etanol (K_m : $57,6 \pm 17 \mu\text{M}$ vs. $41 \pm 7 \mu\text{M}$ en el control; $P > 0.05$; $n = 4$).

La actividad de la enzima fosfofructocinasa-1, considerada como uno de los pasos limitantes de la velocidad de flujo a través de la vía glucolítica, no presentó cambios significativos entre los dos grupos de tratamiento (Tabla 2).

Seguidamente, para determinar qué proporción del metabolismo oxidativo de la glucosa está directamente relacionada con la secreción de HCl y si el tratamiento crónico con etanol modifica el estrecho acoplamiento secreción – metabolismo descrito por otros autores en la mucosa normal (6, 25, 100), se realizaron experimentos de oxidación de glucosa en presencia de omeprazole, un inhibidor de la ATPasa de $\text{H}^+\text{-K}^+$. De esta manera se observó que, tanto en la mucosa gástrica control como en la tratada con etanol, la oxidación de glucosa fue parcialmente inhibida por este agente, siendo este efecto de mayor magnitud en las ratas con gastritis alcohólica ($36 \pm 4\%$ vs. $18 \pm 3\%$ en los controles; $P < 0.01$) (Tabla 1). Estos datos sugieren que una fracción significativa del aumento

en el metabolismo oxidativo de la glucosa inducido por el etanol, está asociada a la actividad de la ATPasa gástrica.

Tabla II. Efecto del tratamiento crónico con etanol, sobre la actividad de las enzimas glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, fosfofructocinasa-I y succinato deshidrogenasa, en las fracciones subcelulares correspondientes, obtenidas a partir de la mucosa gástrica de ratas.

Enzima	Tratamiento	
	Ninguno (Control)	Etanol (Gastritis)
Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa (nmoles de NADPH x min ⁻¹ x mg proteína ⁻¹)	58.2 ± 3.2	62.3 ± 5.6
Fosfofructocinasa-1 (nmoles de NADH x min ⁻¹ x mg proteína ⁻¹)	336.4 ± 37.6	333.0 ± 46.8
Succinato Deshidrogenasa (nmoles de succinato x min ⁻¹ x mg proteína ⁻¹)	7.4 ± 1.1	11.1 ± 0.8*

La actividad de las enzimas glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y fosfofructocinasa-1 fue determinada espectrofotométricamente en la fracción citosólica, y la de la succinato deshidrogenasa, en la fracción mitocondrial purificada fresca, todas obtenidas a partir de homogeneizados de mucosa gástrica, tanto de ratas control como de ratas tratadas con etanol. Los valores son promedios ± EE de 4 a 6 preparaciones experimentales diferentes.

* P < 0.05 vs controles.

2. Cambios inducidos por el etanol sobre la secreción ácida gástrica.

La actividad secretoria del ácido por parte de las células oxínticas, se evaluó indirectamente mediante la acumulación de la ¹⁴C-aminopirina en fragmentos de

mucosa gástrica. La acumulación de aminopirina casi se duplicó en la mucosa gástrica de ratas tratadas crónicamente con etanol, cuando se comparó con la de los controles (acumulación basal, en ausencia de secretagogos) (Fig. 9). En las muestras de mucosa control, tanto histamina como carbacol estimularon la secreción ácida. Sin embargo, ninguno de los dos secretagogos fue capaz de provocar un efecto secretorio estimulante adicional en las ratas con gastritis alcohólica (Fig. 9). La cimetidina, un antagonista de los receptores H_2 , no tuvo efecto sobre la acumulación de aminopirina ni en el control, ni en las ratas tratadas con etanol. El BAPTA-AM, un quelante del Ca^{2+} intracelular, disminuyó significativamente la secreción ácida estimulada, en la mucosa gástrica de ratas tratadas con etanol (Fig. 9).

Los hallazgos obtenidos en las determinaciones *in vitro* de la actividad secretoria ácida, pudieran estar correlacionados con los cambios morfológicos observados en las células oxínticas procedentes de muestras de mucosa gástrica tratada crónicamente *in vivo* con etanol. La Fig. 10A (mucosa gástrica control) muestra una célula oxíntica, con su morfología característica: forma cónica, citoplasma claro y numerosas mitocondrias, así como una compleja red de membranas intracitoplasmáticas de superficie lisa, correspondientes al sistema túbulo-vesicular, característico del estado no secretante de esta célula (3). Este patrón morfológico se observó en el $69 \pm 5\%$ de la población total de células oxínticas analizadas en las muestras control. En contraste, en las células parietales de animales con gastritis, se observó una disminución en el número de túbulo-vesículas, las cuales lucieron aumentadas de volumen adoptando un aspecto vacuolar, destacando la presencia de microvellos

en su superficie luminal. Esta apariencia se observó en el $50 \pm 5\%$ de las células oxínticas de ratas tratadas con etanol (Fig. 10B) y coincide con las características del canalículo secretor con microvellos, descrito previamente en células parietales normales de rata, estimuladas *in vivo* con histamina (3).

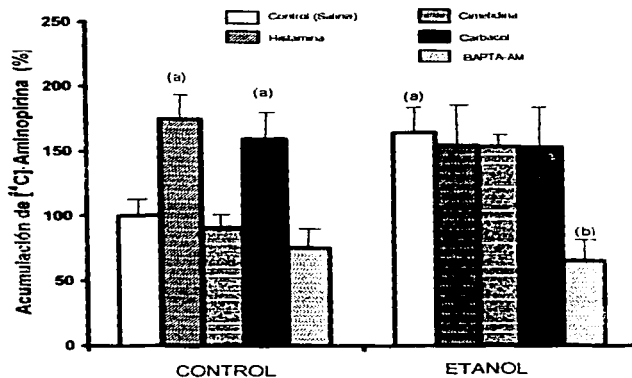


Fig. 9 Efectos del tratamiento crónico con etanol, sobre la acumulación de aminopirina. Fragmentos de mucosa gástrica fueron incubados con ^{14}C -aminopirina durante 1 hora, en presencia o en ausencia de histamina 10^{-4} M, carbacol 10^{-4} M, cimetidina 10^{-3} M o BAPTA-AM $50 \mu\text{M}$. Los valores son promedios \pm EE de 4 - 8 experimentos. Valor control: 0.92 ± 0.11 (100%). (a) $P < 0.05$ vs grupo control; (b) $P < 0.05$ vs grupo tratado con etanol.

Adicionalmente, cuando se comparó el porcentaje de la superficie celular ocupado por el canalículo secretor en las células oxínticas de ambos grupos

experimentales, las diferencias fueron bastante evidentes. Mientras que en las células no secretantes, predominantes en el grupo control, las pocas vacuolas observadas ocuparon el $3.1 \pm 0.2\%$ del área celular total, en las células estimuladas, predominantes en el grupo experimental, el área ocupada por las vacuolas representó el $21 \pm 2\%$ del área celular.

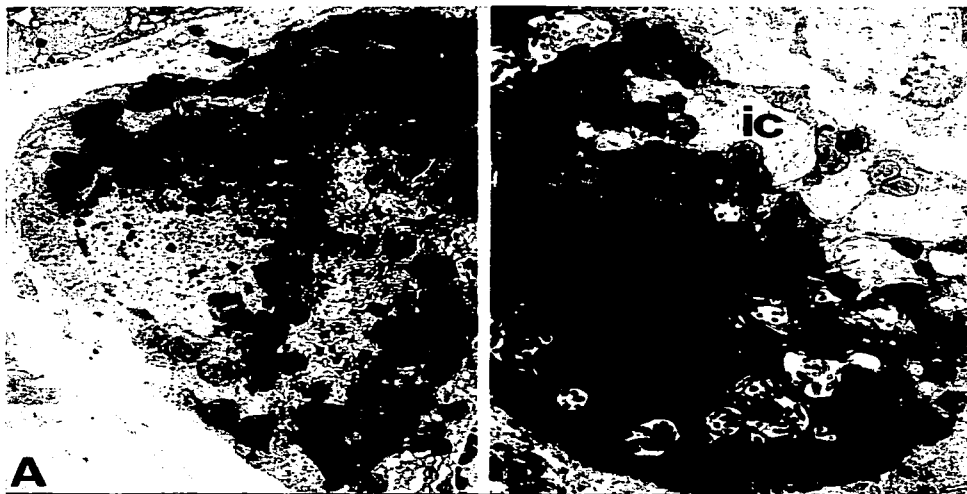


Fig. 10 Cambios Morfológicos inducidos por el Etanol, sobre las Células Oxínticas observadas al Microscopio Electrónico de Transmisión. **A.** Mucosa gástrica de ratas control. **B.** Mucosa gástrica de ratas tratadas con etanol. vt: sistema véscico-tubular; ic: Canaliculo intracelular con microvellos; m: mitocondria. Magnificación: $\times 4000$.

3. Alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} . Relación con los cambios metabólicos y secretorios inducidos por el etanol.

Tanto los efectos inhibitorios del BAPTA-AM, como la ausencia de estimulación por el carbacol, respecto a la acumulación de aminopirina, se detectaron en las ratas con gastritis alcohólica crónica (Fig. 11), lo cual condujo a indagar el papel del Ca^{2+} en la regulación del metabolismo oxidativo de la glucosa, tanto en la mucosa gástrica normal, como en la lesionada por el tratamiento crónico con etanol. Para tal fin, se realizaron determinaciones de la oxidación de glucosa en fragmentos de mucosa gástrica incubados en presencia de agentes modificadores de la disponibilidad y concentración de Ca^{2+} . El EGTA, un quelante del Ca^{2+} extracelular, inhibió parcialmente la oxidación de la glucosa al compararla con el nivel basal de oxidación en los animales control. Asimismo, la adición de BAPTA-AM al medio de incubación conteniendo EGTA, dio lugar a una inhibición adicional significativa de la oxidación de la glucosa en este grupo experimental (Fig. 11). En ratas con gastritis alcohólica, el EGTA también inhibió parcialmente la oxidación de glucosa, mientras que la incubación en presencia de ambos quelantes, abolió completamente el efecto estimulante inducido por el tratamiento crónico con etanol (Fig. 11). El agonista colinérgico carbacol, estimuló la oxidación de la glucosa en las preparaciones control, pero no modificó el catabolismo de la glucosa en las ratas tratadas con etanol (Fig. 11). El $LaCl_3$, un inhibidor de los canales de Ca^{2+} no dependientes de voltaje (47), también inhibió la oxidación de la glucosa en ambos grupos experimentales y éste efecto fue de mayor magnitud en la mucosa gástrica lesionada por el etanol (Tabla III). Estos datos constituyen fuertes evidencias de la dependencia existente entre el

metabolismo oxidativo de la glucosa y el Ca^{2+} extracelular, tal como se evidenció en los experimentos con EGTA (Fig. 11). Adicionalmente, los datos obtenidos en presencia del BAPTA-AM sugieren que también el Ca^{2+} intracelular podría estar involucrado en este fenómeno.

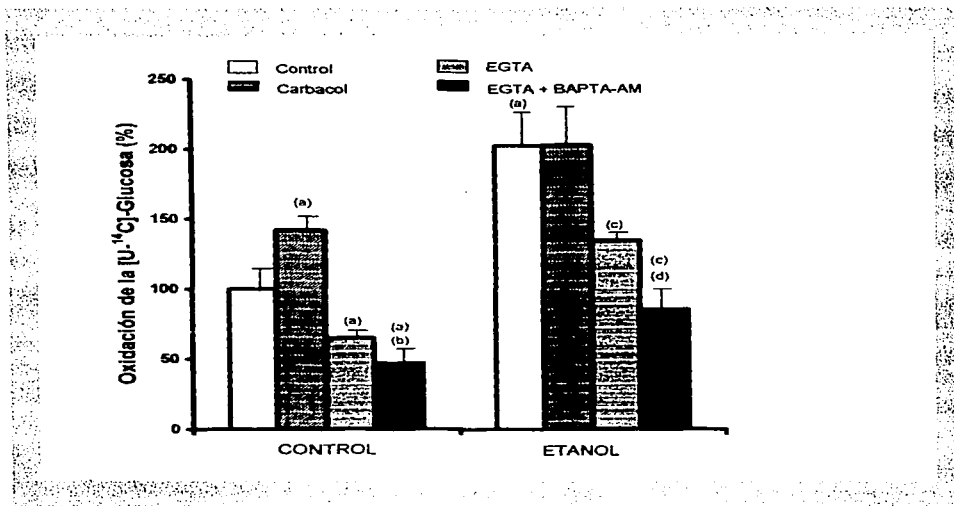


Fig. 11 Efectos de agentes que modifican la disponibilidad de calcio extra o intracelular, sobre la oxidación de la glucosa estimulada por el etanol. Fragmentos de mucosa gástrica fueron incubados con glucosa 10mM + 0.4 μCi de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glucosa, en ausencia o en presencia de carbacol 10^{-4}M , EGTA 1mM, o EGTA + BAPTA-AM 50 μM . El CaCl_2 fue omitido de la solución de incubación, en los experimentos con EGTA o con EGTA + BAPTA-AM. Valor del control: 10.4 ± 1.6 nmoles de glucosa oxidada/ hora x mg de proteína. Los resultados son promedios \pm EE de 4 a 10 experimentos. Estadísticas: (a) $P < 0.05$ vs controles (solución salina); (b) $P < 0.05$ vs EGTA; (c) $P < 0.05$ vs animales tratados con etanol; (d) $P < 0.05$ vs EGTA en animales tratados con etanol.

Con el objeto de comprender mejor los efectos del tratamiento crónico de la mucosa gástrica con etanol, sobre la dinámica celular del Ca^{2+} , se determinaron la captación y la salida de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ tanto en animales normales, como en los tratados con etanol (Fig. 12-A). Los resultados revelan que la captación de Ca^{2+} aumentó progresivamente y se saturó a los 30 minutos de incubación, aproximadamente. A pesar de que se obtuvo un perfil similar de captación de Ca^{2+} en ambos grupos experimentales, es evidente que en los animales con gastritis, la incorporación de Ca^{2+} radiactivo fue mayor que en los animales

Tabla III. Efectos del LaCl_3 1mM sobre el QO_2 y la oxidación de glucosa en la mucosa gástrica de ratas tratadas con etanol.

Tratamiento Adición		QO_2 $\mu\text{ATO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína tisular}^{-1}$	Oxidación de $6\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucosa $\text{nanomoles} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg de proteína tisular}^{-1}$
Control	Ninguna	47.3 ± 4.0	6.1 ± 0.6
	Lantano	$21.5 \pm 1.8^*$	$4.2 \pm 0.4^*$
Etanol	Ninguna	75.2 ± 8.4	11.6 ± 1.1
	Lantano	$21.1 \pm 3.0^*$	$7.5 \pm 0.9^*$

Fragmentos de mucosa gástrica en suspensión fueron gaseados ($95\% \text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$) en una cubeta para oxímetro y la presión de O_2 fue monitoreada y registrada. Los resultados fueron procesados para obtener el QO_2 . Asimismo, la oxidación de glucosa fue medida en alícuotas de la misma suspensión, previamente gaseadas e incubadas durante 90 minutos a 37°C en solución TES, conteniendo glucosa 10mM como sustrato y $0.5\mu\text{Ci}$ de $6\text{-}^{14}\text{C}$ -glucosa. Inmediatamente después, fueron procesadas como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados son promedios \pm EE de 6 experimentos. $^*P < 0.05$ vs. control.

normales (Fig. 12-A). Por el contrario, no se registraron diferencias porcentuales significativas en la salida de Ca^{2+} , entre ambas condiciones experimentales (Fig. 12-B).

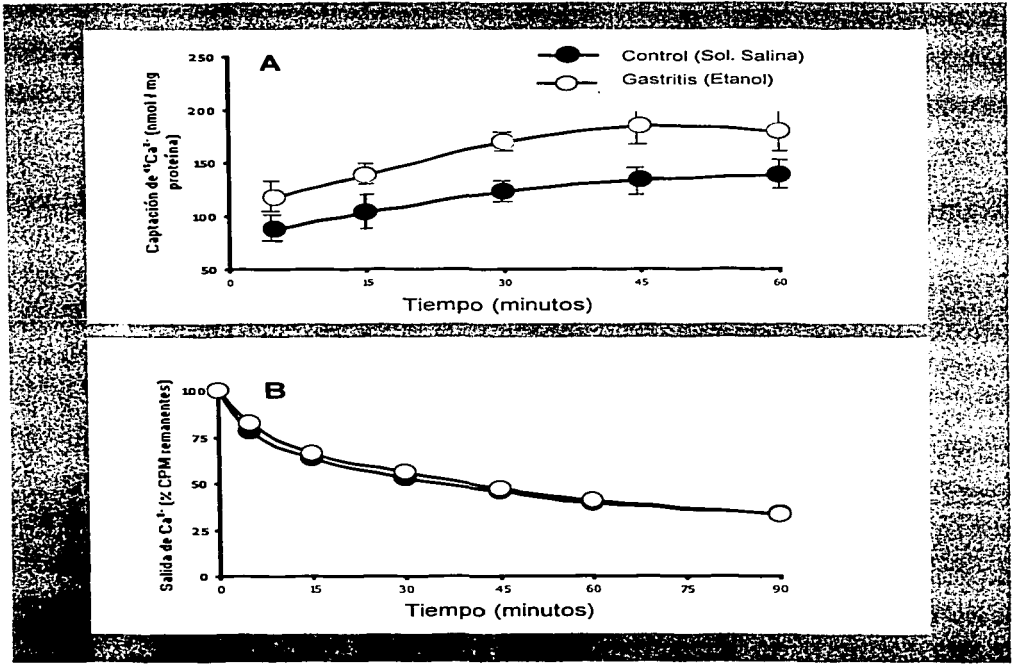


Fig. 12 Efectos del tratamiento cronico con etanol, sobre la captación y salida de calcio en la mucosa gástrica aislada de ratas. Los experimentos fueron realizados como fue descrito en Materiales y Métodos. Los resultados son promedios \pm EE de 4 experimentos. En el grupo tratado con etanol, los valores son estadísticamente significativos vs el punto correspondiente en el grupo control.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante la medición de Ca^{2+} total en fracciones subcelulares (Tabla 4). En tales experimentos, tanto las fracciones citosólicas como mitocondriales procedentes de homogeneizados de mucosa gástrica tratada con etanol, exhibieron un contenido de Ca^{2+} total significativamente mayor que el determinado en las mismas fracciones obtenidas a partir de la mucosa gástrica no tratada (Tabla 4).

Tabla 4. Contenido de Ca^{2+} total determinado mediante espectrometría de absorción atómica.

Tratamiento	CONTENIDO DE Ca^{2+} TOTAL (nmol Ca^{2+} x mg de proteína tisular ⁻¹)	
	Citosol	Mitocondria
Control	0.49 ± 0.03	1.86 ± 0.15
Etanol (gastritis)	0.65 ± 0.05*	2.85 ± 0.31*

Las fracciones citosólica y mitocondrial fueron aisladas a partir de homogeneizados de mucosa gástrica de ratas, desproteinizadas con HClO_4 al 6% y centrifugadas en presencia de LaCl_3 al 1%. El contenido de Ca^{2+} total fue medido mediante espectrometría de absorción atómica de flama, tal como fue descrito en Materiales y Métodos. Los resultados son promedios ± EE de 3 determinaciones por grupo experimental, cada una de ellas obtenidas a partir de 3 mucosas gástricas. *P < 0.05 vs controles.

4. Proteína tisular y mitocondrial, y estado de las mitocondrias.

Un estudio histológico realizado previamente en el presente modelo experimental de lesión gástrica alcohólica crónica (36), reveló que el etanol lesiona la arquitectura del epitelio gástrico superficial y que, en algunos casos, esto afecta también la fovea de las glándulas gástricas. En otras palabras, las células epiteliales superficiales y las células del cuello de las glándulas parecen ser las más afectadas, pero no se descarta la posibilidad de que la región que contiene células especializadas (entre ellas, las células oxínticas), pueda sufrir también pérdida o ruptura de células, organelos o enzimas, además de los cambios morfológicos y bioquímicos que son objeto de nuestro estudio. Este aspecto es de fundamental importancia, especialmente por su repercusión en la interpretación de parámetros que son medidos en la mucosa gástrica aislada, pero que reflejan funciones dependientes de un organelo o enzima particular, como ocurre con el metabolismo mitocondrial. Para explorar esta posibilidad, fueron realizadas varias determinaciones.

La cantidad total de proteínas en la mucosa gástrica de ratas con gastritis alcohólica experimental, no fue significativamente diferente de la observada en los controles, como se evidenció al calcular la relación proteínas/ peso seco tisular (163.4 ± 12.5 vs. 178.6 ± 10.9 mg de proteínas/ g de peso en el grupo control; $n = 51$; $P > 0.05$). Asimismo, la concentración de ADN tisular, tampoco varió significativamente al comparar ambos grupos experimentales (3.43 ± 0.34 vs. 3.19 ± 0.30 μg de ADN/ mg de proteína en el grupo control; $n = 30$; $P > 0.05$). En vista de que estos dos indicadores generales no permitieron detectar cambios gruesos sugerentes de pérdida tisular, proteínas, etc., a continuación se

midieron parámetros útiles para determinar posibles perturbaciones en la estructura y número de mitocondrias. Las mitocondrias juegan un papel complejo en las células. Además de su rol metabólico primordial derivado de la producción de ATP, se ha sugerido que este organelo concentra Ca^{2+} y también es capaz de generar y depurar especies reactivas de O_2 (65). Por tal razón, se midieron las actividades de las enzimas succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa en la fracción mitocondrial aislada. Estas enzimas han sido utilizadas anteriormente, ya que una disminución de su actividad, por lo general es indicadora de alteración mitocondrial, puesto que ambas están ancladas en la membrana mitocondrial interna (63). También se midió la actividad de la citocromo c oxidasa en homogeneizados de mucosa gástrica y, a partir de cálculos ensayados previamente, fue posible comparar la actividad enzimática en ambas preparaciones (homogeneizados y fracción mitocondrial) y calcular así la cantidad de proteína mitocondrial total tisular (35). Inesperadamente, en la fracción mitocondrial, la actividad de la succinato deshidrogenasa resultó significativamente aumentada (Tabla II), mientras que la actividad de la citocromo c oxidasa, no experimentó cambios significativos (Tabla V). No obstante, al comparar la actividad de la citocromo c oxidasa del homogeneizado con la de la fracción mitocondrial, la cantidad total de proteína mitocondrial por gramo de mucosa gástrica, resultó significativamente disminuida en la mucosa gástrica lesionada por el etanol (Tabla V). Este hallazgo es de fundamental importancia en la interpretación de los experimentos que involucran el metabolismo mitocondrial en el presente trabajo.

Tabla V. Actividad de la citocromo c oxidasa mitocondrial en homogeneizados y en la fracción mitocondrial purificada, obtenidos a partir de la mucosa gástrica de ratas normales y de ratas con gastritis alcohólica experimental.

Tratamiento	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (nÁtomos O ₂ / seg. x mg Prot.)	
	Homogeneizado	Fracción Mitocondrial
Ninguno (Controles)	5.68 ± 0.43	22.8 ± 0.44
Etanol (Gastritis)	3.45 ± 0.38*	22.4 ± 2.12

La actividad de la citocromo c oxidasa fue determinada mediante oximetría según lo especificado en Materiales y Métodos. Los resultados son promedios ± EE de 3 preparaciones experimentales, cada una correspondiente a dos mucosas gástricas. *P < 0.05 vs controles. A partir de los datos presentados y de los valores obtenidos para peso y proteínas de cada preparación, fue calculado el contenido total de proteína mitocondrial tanto en los controles como en los animales con gastritis alcohólica, obteniéndose los siguientes valores: 32.4 vs 44.5 mg de proteína mitocondrial/g de mucosa, en los controles; P < 0.01; n = 6.

5. QO₂ y producción de ATP, lactato y piruvato.

El consumo de oxígeno en ratas con gastritis alcohólica fue significativamente más alto que en las ratas normales (Tabla III), coincidiendo con una tasa mayor de la oxidación de glucosa (Tabla I). Al igual que la oxidación de glucosa, el QO₂ fue significativamente inhibido por el lantano y por el omeprazole, en las muestras de ambos grupos experimentales. El lantano inhibió el consumo de oxígeno en un 55% en la mucosa gástrica control, mientras que este efecto fue aún mayor (72%)

en los animales tratados con etanol (Tabla III), mientras que el omeprazole inhibió el QO_2 , tanto en el control como en los animales tratados con alcohol, en un 39.5% y un 51.3%, respectivamente.

A pesar de un menor contenido de mitocondrias calculado en la mucosa gástrica de los animales tratados crónicamente con etanol (Tabla V), estas parecieron producir más ATP que las de la mucosa gástrica control, luego de la incubación con glucosa (Tabla VI). Debido a que el contenido de ADP de la mucosa gástrica no se modificó significativamente en estas preparaciones, la cantidad neta de nucleótidos de adenina aumentó en la mucosa gástrica con lesión alcohólica. Asimismo, a pesar del aumento observado en la oxidación de la glucosa en los animales con gastritis, no se observó ningún cambio significativo en el nivel de lactato ni en la relación lactato/ piruvato (Tabla VI). Dado que el flujo de glucosa a través de la vía de las pentosas aumentó significativamente en la mucosa gástrica de animales tratados con etanol, en ausencia de cambios en la actividad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa medida *in vitro*, se determinó el contenido de $NADP^+$ en extractos perclóricos de mucosa gástrica. Tal como se esperaba, las muestras de mucosa gástrica de ratas tratadas con etanol, tuvieron un nivel de $NADP^+$ significativamente más alto que los controles (Tabla VI). Por lo tanto, el aumento neto en la actividad de la vía de las pentosas observado en la mucosa gástrica de ratas con gastritis podría haber sido causado, al menos en parte, por un incremento en la disponibilidad de $NADP^+$.

Tabla VI. Efecto de la administración de etanol *in vivo* sobre los niveles tisulares de lactato, piruvato, ATP, ADP y NADP⁺ en fragmentos incubados de mucosa gástrica de rata.

Tratamiento	Contenido Tisular Total ($\mu\text{moles} \times \text{g de peso húmedo}^{-1}$)				
	Lactato	Piruvato	ATP	ADP	NADP ⁺
Ninguno (Control)	2.1±0.06	0.16±0.016	2.4±0.23	1.64±0.20	0.015±0.001
Etanol (Gastritis)	2.4±0.20	0.17±0.014	3.4±0.27*	1.92±0.18	0.027±0.002*

Fragmentos alargados de mucosa gástrica, tanto de ratas control como de ratas tratadas con etanol, fueron incubados durante 90 minutos en la solución TES descrita, en presencia de glucosa 10 mM (pH 7.4) a 37° C. Inmediatamente después, las muestras fueron desproteinizadas, y los extractos perclóricos neutralizados se utilizaron para determinar el contenido total de lactato, piruvato, ATP, ADP y NADP⁺, tal como fue descrito en Materiales y Métodos. Los resultados son promedios \pm EE de 4 experimentos. *P < 0.05 vs control.

DISCUSIÓN

Este trabajo fue realizado con el fin de investigar si la lesión inducida por el tratamiento crónico con etanol en la mucosa gástrica de ratas, se acompaña de alteraciones en el metabolismo oxidativo de la glucosa y en la actividad secretora de HCl, y si el Ca^{2+} participa como mediador de tales alteraciones.

Según los resultados obtenidos, la cinética de oxidación de la glucosa en la mucosa gástrica de los controles, fue muy similar a la reportada en otras especies (13, 26) lo cual sugiere que, en efecto, la glucosa es eficientemente oxidada en la mucosa gástrica de ratas. El total de la oxidación de glucosa, aumentó significativamente en las muestras de mucosa gástrica tratada crónicamente *in vivo* con etanol (Tabla I). Se debe tener en cuenta que los experimentos fueron realizados *in vitro*, en ausencia de etanol ya que, como fue señalado anteriormente, éste y sus metabolitos son prácticamente indetectables al momento de sacrificar a los animales, tal como fue reportado previamente (36). Por lo tanto, los cambios en el metabolismo oxidativo de la glucosa, evidenciados en este modelo de lesión gástrica, son atribuibles a la lesión crónica de la mucosa por el tratamiento *in vivo* con etanol y no a los efectos agudos de la oxidación del etanol, como podría ocurrir durante incubaciones *in vitro* en presencia de este agente. En apoyo a esta afirmación, se ha reportado que la capacidad de la mucosa gástrica de ratas para oxidar etanol, es muy baja a concentraciones inferiores de 150 mmol/l (10).

Los experimentos realizados utilizando glucosa marcada radiactivamente en diferentes carbonos, sugieren que la estimulación de la oxidación de la glucosa por el etanol es el resultado de la contribución de las diferentes vías catabólicas

disponibles para este sustrato (glucólisis, vía de las pentosas, ciclo de Krebs) y no de una en particular. Mención especial merece la presencia de una vía de las pentosas activa en la mucosa gástrica de ratas, tanto sanas como con gastritis alcohólica experimental, la cual se puso de manifiesto a través de la relación $1\text{-}^{14}\text{C}/6\text{-}^{14}\text{C}$ mayor a 1 (Tabla I). Esto coincide cualitativamente con lo reportado por Sernka y Harris en la mucosa gástrica de ratas sanas (80), a pesar de que la contribución de la vía de las pentosas a la oxidación total de la glucosa observada en el presente trabajo, resultó ser significativamente menor que la descrita por tales autores. Esta diferencia cuantitativa podría corresponder a variaciones en las condiciones experimentales utilizadas, entre las cuales destacan el uso de una elevada concentración de glucosa (25mmol/L) y el tiempo prolongado de incubación (4 horas). El hecho de haber podido detectar la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en la fracción citosólica obtenida a partir de la mucosa gástrica, apoya el hallazgo de que una parte de la glucosa disponible es derivada para su oxidación a través de la vía de las pentosas. Cabe señalar que esta vía oxidativa de localización citosólica, por sí misma, no genera ATP ni intermediarios metabólicos de alta energía que puedan ingresar directamente a la cadena respiratoria mitocondrial. Esto hace difícil correlacionar la oxidación de la glucosa a través de la vía de las pentosas, con la actividad secretoria de HCl, tal como había sido sugerido por Sernka *et al.*, cuando se desconocía que el mecanismo secretorio de HCl es ATP dependiente (80). Sin embargo, otras funciones celulares de especial relevancia para la defensa del epitelio gástrico contra agentes agresivos, pudieran estar demandando intermediarios metabólicos aportados por la vía de las pentosas. Así, en este modelo de lesión crónica

inducida por etanol, el contenido de NADP⁺ tisular está aumentado (Tabla VI), lo que podría explicar, al menos en parte, la estimulación de la vía de las pentosas en respuesta a la lesión. De hecho, la relación NADP⁺/NADPH constituye el principal elemento regulador de la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima a la cual se ha atribuido el más alto porcentaje de control del flujo metabólico a través de la vía de las pentosas en diversos tejidos (98). Una estimulación similar de la vía de las pentosas se ha observado en la fase temprana de la fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (35). Allí, los autores sugirieron que el aumento en la actividad de la vía de las pentosas podría participar en la restitución del glutatión reducido y, probablemente, en la síntesis de desoxirribonucleótidos, estimulando la proliferación celular (35). Adicionalmente, en el presente modelo experimental, se ha reportado previamente la normalización del nivel de glutatión de la mucosa gástrica y un aumento en la síntesis de ADN, durante el período de recuperación temprana luego de retirar el etanol (37). En efecto, tanto la restitución del glutatión como la síntesis de ADN, aumentarían los requerimientos de NADPH, pudiendo favorecer el flujo oxidativo a través de la vía de las pentosas.

Por otra parte, la ausencia de cambios significativos en la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y de la fosfofructocinasa-1, habla a favor de que ambas enzimas están presentes y conservan su capacidad funcional en la mucosa gástrica lesionada por el etanol y lleva a pensar que, el aumento en sus actividades derivado del aumento general en la oxidación de la glucosa, estaría dado *in vivo* por la regulación mediante los cofactores específicos (Tabla II).

En apoyo a la estimulación del metabolismo oxidativo inducida por el tratamiento crónico con etanol, en el presente modelo pudo detectarse un aumento significativo en el consumo de O_2 (Tabla III), en la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (Tabla II) y en el contenido de ATP, sin cambios en la relación lactato/piruvato (Tabla VI), todo lo cual habla a favor de la estimulación del metabolismo oxidativo aeróbico y, en especial, de la actividad metabólica mitocondrial.

Los hallazgos anteriormente descritos, pudieran lucir contradictorios al compararlos con la disminución de la cantidad neta de proteína mitocondrial por gramo de mucosa gástrica, deducida a partir de la actividad de la citocromo c oxidasa en los animales tratados con etanol (Tabla V). Dado que los cambios significativos en la actividad de la enzima fueron evidentes en el homogeneizado obtenido a partir de la mucosa gástrica de animales tratados con etanol, pero no en la fracción mitocondrial, cabría pensar que el tratamiento crónico con etanol se asocia a un menor número de mitocondrias. De ser así, es posible que las mitocondrias presentes, hayan aumentado su eficiencia funcional, lo que permitiría explicar los datos de estimulación metabólica observados como consecuencia del tratamiento crónico con etanol.

Por otra parte, el incremento total en la oxidación de la glucosa en respuesta al tratamiento con etanol, podría estar asociado a una demanda aumentada de energía metabólica por parte de la actividad de la ATPasa gástrica, como la observada a través de la medición de la acumulación de aminopirina (Fig. 9). En efecto, la inhibición tanto del metabolismo oxidativo de la glucosa (Tabla I) como del QO_2 por el omeprazole, sugieren fuertemente la existencia de un estrecho

acoplamiento entre los procesos secretorios y metabólicos en la mucosa gástrica de ratas, el cual persiste y se incrementa luego del tratamiento crónico *in vivo* con etanol. Este hallazgo es común a lo referido por otros autores en la mucosa gástrica de varias especies animales, en condiciones de estimulación por secretagogos (15, 26, 39, 81).

La acumulación de aminopirina resultó ser un indicador indirecto apropiado para el estudio de la función secretoria ácida en fragmentos de mucosa gástrica de ratas (Fig. 9). Aunque los niveles de acumulación fueron de menor magnitud que los reportados en preparaciones más simples obtenidas a partir de mucosa gástrica (Ej.: glándulas gástricas o células parietales aisladas), la magnitud de los resultados y el patrón de efectos secretorios inducidos por los secretagogos gástricos, son similares a los descritos en biopsias de mucosa gástrica humana a las cuales se les aplicó esta técnica (15). En concordancia con los efectos metabólicos inducidos por el inhibidor de la bomba de protones, omeprazole, el tratamiento con etanol indujo un aumento significativo en la acumulación de aminopirina y cambios morfológicos ultraestructurales compatibles con un estado de estimulación de la secreción ácida (Fig. 9 y 10). Por lo tanto, el tratamiento crónico *in vivo* con etanol, también se acompaña de un estado hipersecretorio, coincidiendo con lo reportado previamente en respuesta a la exposición aguda a este agente (12, 21, 24, 52, 82). También la expresión funcional de la ATPasa de H^+K^+ ha sido estimulada por la exposición *in vitro* al etanol, en otro tipo de preparación experimental (49).

Continuando con el análisis de los efectos secretorios, la cimetidina no inhibió la acumulación de aminopirina en la mucosa gástrica control (Fig. 1) sugiriendo

que, en la preparación utilizada, la secreción basal de ácido no es dependiente de la estimulación por histamina endógena. Sin embargo, llama la atención que la respuesta secretoria inducida por el etanol, tampoco fue inhibida por la cimetidina (Fig. 1). Esto pudiera sugerir que, probablemente, el aumento en la actividad secretoria inducido por el etanol en este tipo de preparación experimental *in vitro*, no involucra a la estimulación del receptor H_2 o que, de existir una contribución de la vía histaminérgica al efecto secretorio del etanol, ésta sería el resultado de una estimulación post-receptor. Por otra parte, la histamina no estimuló adicionalmente la actividad secretoria inducida por el etanol. Aunque en el presente trabajo no se investigó el significado de este hallazgo, es posible que esté relacionado con limitaciones en la capacidad secretoria de la mucosa gástrica (quizás ya máximamente estimulada por el etanol) o con alteraciones en la capacidad de respuesta del receptor H_2 a consecuencia del tratamiento con etanol. Por lo tanto, la presencia de elementos comunes en los mecanismos de estimulación por el etanol y la histamina, no puede ser descartada.

En relación con los efectos metabólicos del etanol en la mucosa gástrica, los antecedentes son controversiales. Se ha descrito que el tratamiento agudo con etanol produce una disminución significativa del contenido de ATP (89), acompañada por una elevación en la relación lactato/piruvato (12), efectos probablemente derivados de la oxidación del etanol. En otro trabajo, el etanol disminuyó la oxidación de la glucosa por la mucosa gástrica, principalmente a través de la inhibición de la vía de las pentosas (18). Asimismo, se ha propuesto que la exposición al etanol tópico altera la fosforilación oxidativa mitocondrial, efecto que parece estar asociado a alteraciones en el flujo sanguíneo de la

mucosa gástrica (97). Otras perturbaciones mitocondriales se han atribuido también a los efectos deletéreos del etanol (40, 65). Debido a que los efectos descritos no se detectaron en el presente modelo, pudiera pensarse que los mismos estarían relacionados con la administración aguda del etanol. Por lo tanto, los cambios en el metabolismo oxidativo y en la secreción ácida aquí presentados, parecieran ser característicos de la mucosa gástrica de ratas, durante la progresión de una lesión crónica inducida por el etanol.

Por otra parte, en la mucosa gástrica normal, el papel fisiológico del Ca^{2+} en la regulación del metabolismo y de la secreción de HCl y pepsinógeno, ha sido bien establecido (17, 34, 84, 87). Sin embargo, tal como se señaló en la introducción, su participación en el mecanismo de lesión inducido por el etanol, así como por otros agentes en la mucosa gástrica, no ha sido del todo clarificado.

En el presente modelo, la estimulación inducida por el etanol sobre la oxidación de la glucosa y la actividad secretora ácida, pudiera estar relacionada con los cambios descritos en los niveles de Ca^{2+} intracelular. La inhibición metabólica inducida por la quelación del Ca^{2+} extracelular (EGTA) (Fig. 11), o por la presencia de lantano en el medio de incubación (Tabla III), claramente sugieren que el Ca^{2+} extracelular participa en la regulación del metabolismo oxidativo, tanto en la mucosa gástrica normal, como en la lesionada por el etanol. Asimismo, la inhibición adicional inducida por el quelante intracelular BAPTA-AM añadido al medio de incubación con EGTA, pudiera indicar que la movilización de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares también podría estar participando en la inducción del metabolismo oxidativo por el etanol (Fig. 11). Por otra parte, el BAPTA-AM también inhibió la acumulación de aminopirina en la mucosa gástrica

de ratas tratadas con etanol, efecto que no fue significativo en la mucosa control, sugiriendo que la secreción de HCl estimulada por el etanol podría depender, al menos en parte, de la disponibilidad de Ca^{2+} . Asimismo, el carbacol (secretagogo cuyos efectos están mediados por Ca^{2+}), no fue capaz de provocar una estimulación adicional ni de la oxidación de la glucosa ni de la acumulación de aminopirina en la mucosa gástrica de animales tratados con etanol, pero este agente sí estimuló ambos parámetros en los animales control (Figs. 9 y 11) lo cual indica que, probablemente, el etanol y el carbacol tienen un elemento común en su mecanismo de estimulación de la célula oxíntica, el cual podría estar representado por el Ca^{2+} . En apoyo a esta hipótesis, el lantano fue un más potente inhibidor del metabolismo oxidativo en la mucosa gástrica con lesión por etanol, que en la mucosa gástrica control (Tabla III), lo cual avala la propuesta de que una fracción significativa de la oxidación de glucosa depende de la movilización de Ca^{2+} , especialmente desde el medio extracelular, siendo mayor esta dependencia en la mucosa gástrica de ratas con lesión inducida por etanol. Resultados similares se han reportado en células oxínticas de cobayos tratados con etanol *in vitro*, donde el carbacol tampoco fue capaz de estimular la secreción ácida, hallazgo que fue atribuido, al menos en parte, a los altos niveles de Ca^{2+} intracelular presentes, con la subsiguiente activación de la proteína cinasa C (67). Los resultados anteriores sugieren fuertemente que las alteraciones inducidas por el tratamiento crónico de la mucosa gástrica con etanol, pudieran estar asociadas a disturbios en la homeostasis del Ca^{2+} caracterizados por niveles aumentados de Ca^{2+} intracelular.

En apoyo a lo anterior, se pueden señalar los siguientes hallazgos observados en la mucosa gástrica de animales tratados con etanol: 1) tanto en las fracciones citosólica como mitocondrial, el contenido de Ca^{2+} total está aumentado significativamente (Tabla IV), y 2) los fragmentos de mucosa gástrica incorporaron más activamente el Ca^{2+} externo (Fig. 12-A). Teniendo en cuenta que este catión actúa como regulador directo de la actividad de algunas enzimas mitocondriales en la mucosa gástrica del conejo, ejerciendo así su influencia sobre el metabolismo mitocondrial de los carbohidratos y sus intermediarios (34), tal posibilidad no debe ser descartada en el presente modelo de gastritis inducida por etanol. En efecto, los niveles de Ca^{2+} mitocondrial total aquí reportados a consecuencia de la exposición crónica al etanol, se encuentran en el rango propuesto en el cual es posible regular la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales en otros tejidos (61). De ser así, la elevación del Ca^{2+} total mitocondrial inducida por el etanol, pudiera promover una actividad aumentada de las deshidrogenasas mitocondriales que anteceden o que forman parte del ciclo de Krebs, efecto que podría contribuir a explicar el aumento en el metabolismo oxidativo de la glucosa dependiente de las vías glucolítica – ciclo de Krebs, observado en las determinaciones metabólicas utilizando los isótopos $\text{U-}^{14}\text{C}$ y $6\text{-}^{14}\text{C}$ de la glucosa (Tabla I).

La disminución en la actividad de la succinato deshidrogenasa en la mucosa gástrica, ha sido utilizada como indicador de lesión mitocondrial (63). No obstante, en el presente modelo de gastritis crónica inducida por etanol, la actividad de esta enzima resultó significativamente estimulada. La succinato deshidrogenasa no es una típica deshidrogenasa Ca^{2+} -sensible, como lo son la

piruvato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa en numerosos tejidos. No obstante, en músculo estriado de anfibios y en hepatocitos de ratas, algunos autores han reportado la estimulación de esta enzima por Ca^{2+} (88, 104, 75). En esta última preparación, se ha descrito un fenómeno de retroalimentación negativa entre la estimulación de la oxidación del succinato por el Ca^{2+} mitocondrial y la subsiguiente inhibición del transporte de Ca^{2+} mitocondrial inducida por el succinato, como un mecanismo de adaptación en condiciones patológicas (75). Por tal razón, no se descarta la posibilidad de que el aumento en la actividad de la enzima en respuesta a la exposición crónica al etanol, esté relacionada con la concentración mitocondrial de Ca^{2+} . Otra posibilidad es que, a causa de las perturbaciones crónicas inducidas por el etanol, la expresión genética de la succinato deshidrogenasa, haya resultado aumentada. En todo caso, tales posibilidades requerirían investigación adicional.

Tal como fue señalado en los antecedentes de este trabajo, existe controversia en torno a la participación del Ca^{2+} en la patogénesis de las lesiones gástricas inducidas *in vitro* e *in vivo* por la exposición aguda al etanol. En apoyo a los hallazgos presentados aquí, se pueden mencionar los siguientes resultados: el tratamiento con etanol aumentó las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, en cultivos de células epiteliales gástricas superficiales, conduciendo a la lesión de las mismas, efecto que fue explicado por la extrusión inicial de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático y, secundariamente, por la apertura de canales de Ca^{2+} sensibles a lantano en la membrana plasmática, mientras que los antagonistas de los canales de Ca^{2+} verapamil y diltiazem, no modificaron este efecto (50). En otro modelo de tratamiento con etanol *in vitro*, el Ca^{2+} extracelular exacerbó el daño

inducido por este agente en muestras de mucosa gástrica (4) y los antagonistas de los canales de Ca^{2+} resultaron protectores contra los efectos deletéreos del etanol (50, 27, 70). En contraste, se ha reportado que el Ca^{2+} podría disminuir la extensión de las lesiones inducidas por etanol (90). A pesar de que la naturaleza de la discrepancia es aún desconocida, esta pudiera estar relacionada, al menos en parte, con los diferentes modelos experimentales utilizados (*in vitro* vs *in vivo*), la concentración de etanol y/o Ca^{2+} empleadas, entre otros factores.

Por lo que respecta al presente trabajo, se ha evidenciado que los niveles de Ca^{2+} intracelular podrían mediar los efectos metabólicos y secretorios inducidos en la mucosa gástrica por la administración crónica de etanol *in vivo* (Fig. 13). El tratamiento crónico con este agente parece inducir el ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular, como lo sugiere la captación aumentada de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. El mecanismo responsable de este fenómeno involucraría probablemente la apertura de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática, hipótesis avalada por la inhibición del consumo de O_2 y de la oxidación de glucosa mediante la incubación de la mucosa gástrica con LaCl_3 . La naturaleza de estos canales no fue investigada en el presente trabajo pero, en una investigación realizada por Kokoska *et al.* en cultivos de células superficiales de la mucosa gástrica tratadas agudamente con etanol, se sugiere que la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular depende de canales no dependientes de voltaje, activados por la depleción de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (entrada capacitativa de Ca^{2+}) (50). Por otra parte, las perturbaciones inducidas por el etanol en la entrada de Ca^{2+} a las células, podrían ser consecuencia de cambios estructurales y funcionales en los canales de Ca^{2+} , a consecuencia de alteraciones en la

membrana plasmática, inducidas por el tratamiento crónico con etanol, las cuales han sido descritas previamente en el presente modelo experimental (36). Tal posibilidad, no debe ser descartada.

El papel del calcio en la estimulación del metabolismo oxidativo de la glucosa, en la mucosa gástrica tratada crónicamente con etanol, podría ser explicado a través de dos posibles mecanismos: a) la estimulación metabólica directa por Ca^{2+} intracelular, probablemente mediada por el incremento en la concentración de calcio mitocondrial, el cual podría dar lugar a la estimulación de deshidrogenasas mitocondriales calcio-sensibles, y b) la estimulación indirecta del metabolismo, a través de la activación de la secreción ácida por el Ca^{2+} , dando lugar a una disminución en la relación ATP/ADP, la cual ha sido reconocida como un factor regulador del metabolismo oxidativo mitocondrial en diversos tejidos animales (66). Tal estimulación permitiría disponer de la energía metabólica necesaria para el funcionamiento de la ATPasa de $\text{H}^{+}+\text{K}^{+}$ (Fig. 13). Adicionalmente, dado que también la vía de las pentosas fue proporcionalmente estimulada en el presente modelo experimental, es posible que el tratamiento crónico con etanol pueda mediar, adicionalmente, los cambios metabólicos necesarios para sustentar mecanismos de adaptación o protección (por ejemplo, aquellos necesarios para la restitución del glutatión oxidado), o cambios preparativos que conduzcan a la respuesta proliferativa celular, que ocurre luego del retiro del etanol en este modelo experimental (37).

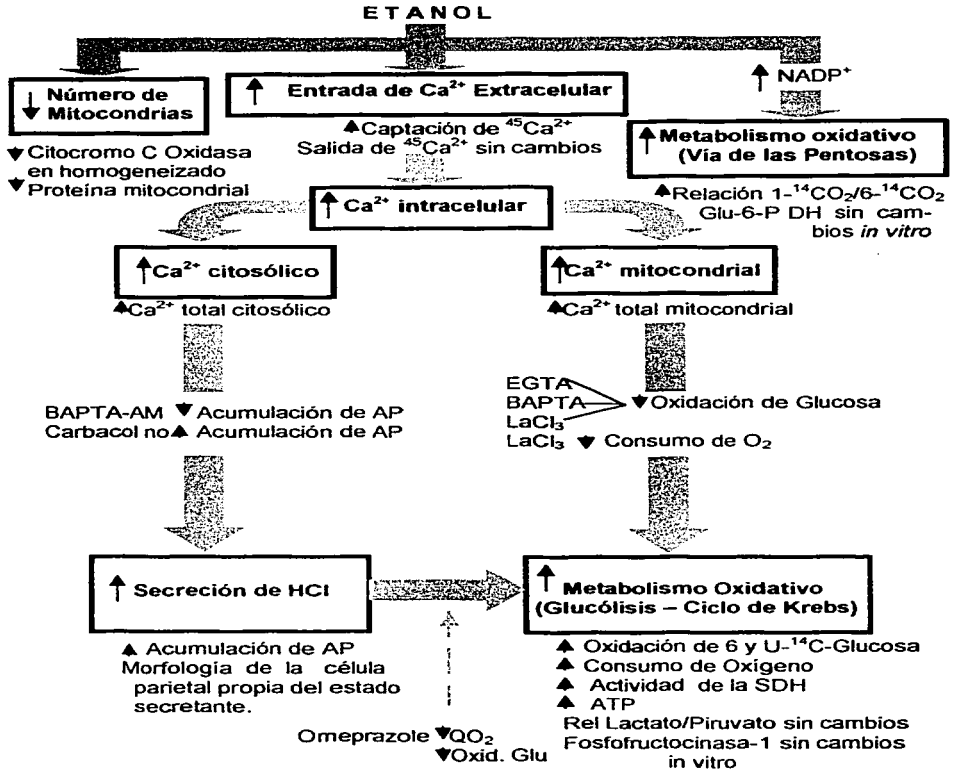


Fig. 13 Esquema que integra algunos efectos de la exposición crónica *in vivo* de la mucosa gástrica al etanol. Los enunciados encerrados en rectángulos representan los principales efectos metabólicos, secretorios y en la homeostasis del calcio, inducidos por el etanol. La información fuera de los rectángulos se refiere a los hallazgos experimentales que sustentan la existencia de tales efectos.

CONCLUSIONES

En el modelo descrito de gastritis subcrónica inducida por la administración de etanol *in vivo*, se detectaron alteraciones caracterizadas por:

- a) Estimulación del metabolismo oxidativo de la glucosa, con participación de todas las rutas catabólicas disponibles para este sustrato, acompañada por indicadores de metabolismo aeróbico activo, que involucra la función mitocondrial.
- b) Estimulación de la función secretoria ácida, acompañada por cambios morfológicos con características como las descritas en las células oxínticas estimuladas por los secretagogos gástricos.
- c) Alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} , caracterizadas por un aumento del contenido de Ca^{2+} total en las fracciones citosólica y mitocondrial, generado principalmente por el ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular, probablemente a través de canales de Ca^{2+} no dependientes de voltaje.
- d) Los cambios metabólicos y secretorios inducidos por el etanol, mantienen un patrón de estrecho acoplamiento entre sí, que ha sido observado también en la mucosa gástrica normal en varias especies animales y en el hombre.
- e) El Ca^{2+} intracelular parece desempeñar un significativo papel como mediador de las alteraciones secretorias y metabólicas observadas.

Todo lo anterior permite concluir que el tratamiento crónico de la mucosa gástrica de ratas *in vivo* con etanol, da lugar a la estimulación del metabolismo oxidativo de la glucosa y de la secreción de HCl, efectos que parecen estar mediados, al menos en parte, por un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular a expensas del ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular. El papel del Ca^{2+} como mediador de los efectos metabólicos observados, podría ser

explicado mediante dos mecanismos no excluyentes: a) la estimulación indirecta del metabolismo oxidativo, a través de la disminución en la relación ATP/ADP, derivada de la estimulación de la secreción de HCL por el Ca^{2+} intracelular y. b) la estimulación directa del metabolismo oxidativo a través de la regulación positiva de algunas deshidrogenasas Ca^{2+} sensibles, por el Ca^{2+} mitocondrial.

Finalmente, los cambios e interacciones descritos en el presente trabajo, son reportados por primera vez en un modelo de lesión crónica inducida por la administración *in vivo* de etanol en la mucosa gástrica de ratas, una vez retirado el etanol.

PERSPECTIVAS

El presente trabajo ofrece una visión integrada de los cambios metabólicos, secretorios y en la homeostasis del Ca^{2+} , que acompañan a la lesión de la mucosa gástrica inducida por la administración crónica de etanol *in vivo*.

Numerosos aspectos aún no estudiados en este modelo experimental, han salido a relucir en el presente trabajo y podrían ser objeto de investigación futura.

De especial interés sería el estudio de los mecanismos de adaptación que permiten a la mucosa gástrica disponer de una función metabólica mitocondrial eficiente, a pesar de las perturbaciones inducidas por el etanol. El estado funcional de las deshidrogenasas Ca^{2+} – sensibles, el esclarecimiento de la relación concreta que existe entre el tratamiento crónico con etanol, la activación de la succinato deshidrogenasa y la dinámica del Ca^{2+} mitocondrial, constituyen aspectos que merecen investigación futura.

El papel de la vía de las pentosas, en el presente modelo de lesión crónica por etanol, reviste singular interés, considerando que los estudios en torno a la actividad de esta ruta metabólica han sido controversiales en la mucosa gástrica, y dada la importancia de sus intermediarios y productos metabólicos, para el sustento de mecanismos de defensa, adaptación y recuperación ante la lesión.

Asimismo, el presente trabajo ofrece perspectivas a investigar en el futuro, en torno a los cambios inducidos por el etanol en la homeostasis del Ca^{2+} . La existencia de un mecanismo de entrada de Ca^{2+} a las células, sensible al tratamiento crónico con etanol, ha sido sugerida a partir de los resultados obtenidos. La caracterización de tal mecanismo, así como de sus elementos

reguladores, y del modo como éste pudiera ser alterado por el etanol y otros agentes nocivos para la mucosa gástrica en función de ciertas variables (concentración, tiempo de exposición, entre otros), podría contribuir al conocimiento de los mecanismos de lesión de la mucosa gástrica, y permitir detectar nuevos blancos para la intervención terapéutica.

Teniendo en cuenta que el modelo de lesión utilizado se acompaña de alteraciones histológicas epiteliales semejantes a las que caracterizan a una gastritis subcrónica alcohólica en el humano, los hallazgos aquí presentados podrían contribuir también a formular nuevos enfoques para la investigación de las lesiones inducidas por el etanol en la mucosa gástrica humana aunque, desde luego, estos resultados no pueden ser ciento por ciento extrapolados al hombre.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALONSO, D., Nigon, K., Dorr, I., y Harris, J. B. "Energy sources for gastric secretion: substrates". *Am. J. Physiol.* 212(5):992-1.000, 1967.
2. ALONSO, D., Park, O.H. y Harris, J. B. "Adenosine monophosphates and glycogenolysis in frog gastric mucosae". *Am. J. Physiol.* 215 (6): 1305-1309, 1968.
3. AKIRA, T., Yamamoto, G. Yonei, Y., Sumii, M., Sumii, K., Haruma, K., Kajiyama, G., Wu, V., Sachs, G. y Walsh, J. H. Effect of histamine on rat gastric H⁺-K⁺-ATPase". *Am. J. Physiol.* 266 (Gastrointest. Liver Physiol. 29): G444-G450, 1.994.
4. ARAKAWA, T., Fukuda, T., Kobayashi, K. y Tarnawski, A. "Prostaglandin-induced protection of cultured rat gastric cells against ethanol is inhibited by a microtubule inhibitor. *Digestion* 57(1): 41-46, 1.996.
5. BERGLINDH, T., Dibona, D. R., Ito, S. y Sachs, G. Probes of parietal cell function. *Am. J. Physiol.* 238 (Gastrointest. Liver Physiol. 1): G165-G176, 1.980.
6. BERGLINDH, T. y Öbrink, K. J. "A method for preparing isolated glands from rabbit gastric mucosae". *Acta Physiol. Scan.* 96: 150-159, 1.976.
7. BIVIN, W.S., Crawford, M.P. y Brewer, N.R.: *Morphophysiology*. En: The Laboratory Rat. Editores: H.J. Baker, J.R. Lindsey, S.H. Weisbroth; New York, Academic Press, 1.979. 1: 73-103.
8. BÜCHER, T., Czok, R., Lamprecht, W., Latzko, E. "Pyruvate". En: Methods of enzymatic analysis. Editor: H.U. Bergmeyer. San Diego, U.S.A. Academic Press, 1.965: 253-259.
9. BURTON, K. A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62:315-323, 1956.
10. CABALLERÍA, J., Baraona, E., Lieber, C. S. "The contribution of the stomach to ethanol oxidation in the rat". *Life Sci.*41: 1021-1027, 1.987.
11. CHACÍN, J. "La úlcera péptica: ¿Es una falla de los mecanismos de defensa de la mucosa gastroduodenal?". *GEN* 44(2): 163-170, 1.990.
12. CHACÍN, J., Cárdenas, P., Lobo, P. y Hernández, I. "Secretory and metabolic effects of ethanol in the isolated amphibian gastric mucosa". *Gastroenterology* 100(5): 1288-1295, 1.991.
13. CHACÍN, J., Cárdenas, P., Lobo, P. y Subero, O. "Role of calcium in secretory and metabolic effects of substrates in the gastric mucosa". *Am. J. Physiol.* 251 (Gastrointest. Liver Physiol. 14): G161-G168, 1.986.

14. CHACÍN, J., Martínez, G. y Severín, E. "Role of fatty acid oxidation in mechanism of action of gastric secretagogues". *Am. J. Physiol.* 238 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 1): G255-G262, 1.980.
15. CHACIN, J., Prieto, A., y Cárdenas, P. "Substrate-level energy dependence of acid secretion in the isolated human gastric mucosa". *Gastroenterology* 89 (3): 525-521, 1.985.
16. CHEW, CS. Cholecystokinin, "carbachol, gastrin, histamine and forskolin increase $[Ca^{2+}]_i$ in gastric glands". *Am. J. Physiol.* 250: G814-G823, 1986.
17. CHEW, C.A. y Brown, M. R. "Release of intracellular Ca^{2+} and elevation of inositol triphosphate by secretagogues in parietal and chief cells isolated from rabbit gastric mucosa". *Biochim. Biophys. Acta* 888: 116-125, 1.986.
18. CHO, C., Pfeiffer, C. J., Misra, H. P. "Ulcerogenic mechanism of ethanol and the action of sulphanyl fluoride on the rat stomach in vivo". *J. Pharm. Pharmacol* 43: 495 - 498, 1.991.
19. CHO, C. H. y OGLE, C. W. "Modulatory action of adenosine on gastric function and ethanol-induced mucosal damage in rats". *Dig Dis Sci.* 35(11): 1334-1339, 1.990.
20. CRITCHLOW, J., Takeuchi, K., Ito, S. y Silen, W. "Effect of calcium depletion on the restitution of gastric mucosal injury". *Gastroenterology* 82: 1.982 (Abstract).
21. DAVENPORT, H.W. "Ethanol damages to canine oxyntic glandular mucosa". *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 126: 657-662, 1.967.
22. DÍAZ-MUÑOZ, M., Cañedo-Merino, R., Gutiérrez-Salinas, J., Hernández - Muñoz, R. "Modifications of Intracellular Calcium Release Channels and Calcium Mobilization Following 70% Hepatectomy". *Arch. Biochem. Biophys.* 349:105-112, 1998
23. DZIKI, A. J., Batzri, S., Harmon, J. W. y Molloy, M. "Cellular hypercalcemia is an early event in deoxycholate injury of rat gastric mucosal cells". *Am. J. Physiol.* 269 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 32): G287-293, 1.995.
24. EYSSELEIN, V. E., Singer, M. V., Wentz, H. y Goebell, H. "Action of ethanol on gastrin release in the dog". *Dig. Dis. Sci.* 29: 12-18, 1.984.
25. FORTE, J. G., Hanzel, D. K., Okamoto, C., Chow, D. y Urushidani, T. "Membrane and protein recycling associated with gastric HCl secretion". *J. Int. Med.* 228(Suppl. 1): 17-26, 1.990.
26. FRYKLUND, J., Gedda, K., Scott, D., Sachs, G., y Wallmark, B. "Coupling of H^+ - K^+ -ATPase activity and glucose oxidation in gastric glands". *Am. J. Physiol.* 258 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 21): G719-G727, 1.990.

27. GHANAYEM, B.I., Matthews, H.B., Maronpot, R.R. "Calcium Channel Blockers Protect Against Ethanol- and Indomethacin-Induced Gastric Lesions in Rats". *Gastroenterology* 92:106-111, 1987
28. GLAVIN, G. B. "Ca²⁺ modulators and the gut: an update". *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 14(6): 465-467, 1992.
29. GLAVIN, G.B. y Ogle, C. W. "Adrenalectomy, but not vagotomy, reverses the worsening effect of Ca²⁺ blockers on ethanol-induced gastric lesions in rats". *Eur. J. Pharmacol.* 205 (2): 171-175, 1991.
30. GLAVIN, G.B. y Szabo, S. "Effects of the Ca²⁺ chelators EGTA and EDTA on ethanol- or stress-induced gastric mucosal lesions and gastric secretion". *Eur J Pharmacol* 233: 269-273, 1993.
31. GUTH, P.H. "Gastric blood flow in ethanol injury and prostaglandin cytoprotection". *Scand. J. Gastroenterol.* 21(Suppl 125): 86-91, 1986.
32. GUTIÉRREZ-SALINAS, J., Miranda-Garduño, L., Trejo-Izquierdo, E., Díaz-Muñoz, M., Vidrio, S., Morales-González, J.A., Hernández-Muñoz, R. "Redox state and energy metabolism during liver regeneration. Alterations produced by acute ethanol administration". *Biochem. Pharmacol.* 58: 1831-1839, 1999.
33. HÅKANSON, R., Chen, D. y Sundler, F. "The ECL cells". En: Physiology of the gastrointestinal tract. Editor: L. R. Johnson. 3ra. Ed., Vol. 2. New York, U.S.A.; Raven Press, 1994. p. 1171-1184.
34. HERNÁNDEZ, I., y Chacín, J. "Mechanism of cholinergic stimulation of glucose oxidation in isolated gastric glands". *Am. J. Physiol.* 267 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 30): G227-G234, 1994.
35. HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R., Díaz-Muñoz, M., López, V., López-Barrera, F., Yáñez, L., Vidrio, S., Aranda-Fraustro, A., Chagoya de Sánchez, V. "Balance between oxidative damage and proliferative potential in a experimental rat model of CCl₄-induced cirrhosis: Protective role of adenosine administration". *Hepatology* 26: 1100 - 1110, 1997.
36. HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. y Montiel-Ruiz, F. "Reversion by Histamine H₂-Receptor Antagonists of Plasma Membrane Alterations in Ethanol-Induced Gastritis". *Dig Dis Sci* 41:2156-2165, 1996.
37. HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R., Montiel-Ruiz, C. y Vázquez-Martínez, O. "Gastric Mucosal Cell Proliferation in Ethanol-Induced Chronic Mucosal Injury is Related to Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Rats". *Lab Invest* 80:1161-1169, 2000.
38. HERSEY, S. J. "Energy source for secretion in gastric glands". *Federation Proc.* 40: 2511-2518, 1981.

39. HERSEY, S. J., Miller, M. y Owirodu, A. "Role of glucose metabolism in acid formation by isolated gastric glands". *Bioch. Biophys. Acta* 714: 143-151, 1.982.
40. HIROKAWA, M., Miura, S., Yoshida, H., Kurose, I., Shigematsu, T., Hokari, R., Higuchi, H., Watanabe, N., Yokoyama, Y., Kimura, H., Kato, S., Ishii, H. "Oxidative stress and mitochondrial damage precedes gastric mucosal cell death induced by ethanol administration". *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22 (3 Suppl): 111S-114S, 1.998.
41. HOFFMAN, M. E. y J. C. Liao. "Reversed phase high performance liquid chromatographic separations of nucleotides in the presence of solvophobic ions". *Anal. Chem.* 49: 2231-2234, 1.977.
42. HOHORST, H.J. "*L-(+)*Lactate. Determination with lactic dehydrogenase and DPN". En: Methods of enzymatic analysis. Editor: H.U. Bergmeyer. San Diego, U.S.A., Academic Press. 1.965: 266-270.
43. JOHNSON, LR. *Gastric Secretion*. En: Gastrointestinal Physiology. Editores: L.R. Johnson y T.A. Gervin. 6ta. Edición, San Luis (U.S.A.), Mosby, 2.001: 75-77.
44. KARAM, S.M. "Dynamics o epithelial cells in the corpus of the mouse stomach: IV. Bidirectional migration of parietal cells ending in their gradual degeneration and loss". *Anat. Rec.* 236: 314-322, 1.993.
45. KARAM, S.M. y Leblond, C.P. "Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach: I. Identification of proliferative cell types and pinpointing of the stem cell". *Anat. Rec.* 236: 259-279, 1.993.
46. KARVAR, S., Yao, X., Duman, J. G., Hybiske, K., Liu, Y. y Forte J. G. "Intracellular distribution and functional importance of vesicle - associated membrane protein 2 in gastric parietal cells". *Gastroenterology* 123(1): 281-90, 2002.
47. KAWABE, Y., Sugiyama, S., Kuroiwa, M., Takano, K., Goto, H., Nakazawa, S. y Ozawa, T. "Genesis and recovery of ethanol-induced gastric lesions in rats: possible involvement of prostaglandin D2". *Am. J. Gastroenterol.* 84(2): 138-142, 1.989.
48. KING, T. E. "Preparation of succinate dehydrogenase and reconstitution of succinate oxidase. *Methods Enzymol.* 10: 322-331, 1.967.
49. KLAASSEN, C., Swarts, H. y De Pont, J. J. "Ethanol stimulates expression of functional H⁺-K⁺-ATPase in SF9 cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210 (3): 907-913, 1.995.
50. KOKOSKA, E. R., Smith, G. S., Deshpande, Y., Wolff, A. B., Rieckenberg, Ch. y Miller, T. *J. Gastrointest. Surg.* 3: 308 - 318, 1.999.
51. KONDO, T. y Magee, D. F. "The action of intravenous ethanol on gastric secretion". *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med* 156: 299-302, 1.977.

52. LENZ, H. J., Ferrari-Taylor, J. e Isenberg, J. L. "Wine and five percent ethanol are potent stimulants of gastric acid secretion in human". *Gastroenterology* 85: 1082-1087, 1.983.
53. LEONARD, J. P., Salt peter M. M. "Ca²⁺ mediated myopathy at neuromuscular junctions of normal and dystrophic muscle". *Exp. Neurol.* 76: 121-138, 1.982.
54. LI, Z-Q., Cabero, J. L. Y Márdh. "Gastrin and carbachol require cAMP to elicit aminopyrine accumulation in isolated pig and rat parietal cells". *Am. J. Physiol.* 268 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 31): G82-G89, 1.995.
55. LÖHR, G.W., Waller, H.D. *Glucose-6-phosphate Dehydrogenase*. En: Methods of Enzymatic Analysis. Editor: U. Bergmeyer, 2da. Ed. New York, U.S.A. Weinheim and Academic Press, 1.974, 744-751.
56. LIU, X. G., Cho, C.H. y Ko, J. K. "Felodipine- and ethanol- induced gastric mucosal damage in rats". *Pharmacology* 51(Suppl 6): 391-397, 1.995.
57. LOWRY, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
58. LUTNICKI, K., Wróbel, J., Ledwozyw, A. y Trcebas-Pietras, E. "The effect of calcium ions on the intensity of peroxidation processes and the severity of ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa". *Arch. Vet. Pol.* 32(1-2): 12225-12232, 1.992.
59. MALINOWSKA, D.H., Sachs, G. y Cuppoletti, J. "Gastric H⁺ secretion: histamine (cAMP-mediated) activation of protein phosphorylation". *Biochim. Biophys. Acta* 28(1): 95-109, 1.988.
60. MASSEY, T. H. y Deal, W. C. "*Phosphofructokinases from porcine liver and kidney and from other mammalian tissues*". En: Methods of Enzymology. Editor: W.A. Wood; Vol. XLII (C), New York, U.S.A, Academic Press, 1975. p. 99-110.
66. McCORMACK, J. G., Halestrap, A. P. y Denton, R. M. "Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism". *Physiol. Rev.* 70: 391-425, 1.990.
62. MIRABELLI, F, Salis, A, Vairetti, M, Bellomo, G, Thor, H, Orrenius, S. Cytoskeletal alterations in human platelets exposed to oxidative stress are mediated by oxidative and Ca²⁺-dependent mechanisms". *Arch. Biochem. Biophys.* 270:478-488, 1.989.
63. NAGY, L., Szabo, S., Morales, R. E., Plebani, M. Y Jenkins, M. "Identification of subcellular targets and sensitive tests of etanol-induced damage in isolated rat gastric mucosal cells". *Gastroenterology* 107(4): 907 - 914, 1.994.
64. NAKAMURA, M., Akiba, Yasutada, Oda, M., Ishii, H. "Alteration of basic fibroblast growth factor concentration and immunoreactivity in healing of ethanol-induced gastric mucosa damage: effect of sofalcone". *J. Clin. Gastroenterol.* 25 (Suppl. 1): S13-S20, 1.997.

65. NICHOLLS, D. G. "Mitochondrial function and disfunction in the cell: its relevance to aging and aging related diseases". *Fiziol. Zh.* 47(3): 64 – 72, 2.001.
66. NICOTERA, P., Hartzell, P., Davis, G., Orrenius, S. "The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic Ca^{2+} is mediated by the activation of a non-lysosomal proteolytic system". *FEBS Lett* 209: 139-144, 1.986.
67. NIKI, S., Rokutan, K., Nakamura, K., Ogihoru, S., Kutsumi, H., Saitoh, Y, Aoike, A, y Kawai, K. " Ca^{2+} -dependent signalling of acid secretion in isolated parietal cells from guinea pigs and its modification by ethanol". *Nipp Shok Gak Zas* 89: 1484-1490, 1.992.
68. NISHIZAWA, Y., Sakurai, H., Yamato, Ch. Y Moriga, M. "Effects of ethanol alone or after pretreatment with 20% ethanol on phospholipid metabolism in rat gastric mucosa". *Biochim Biophys Acta* 917: 372-380, 1.987.
69. NOGAMI, M., Suko, M. y Miyamoto, T. "The effect of platelet-activating factor on [^{14}C] aminopyrine uptake by isolated guinea pig parietal cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 168(3): 1047-1052, 1.990.
70. OSTROWSKI, J., Pesta, J., Linnik, D., Butruk, E. "The influence of calcium antagonists (verapamil, nifedipine, and $MgCl_2$) on rat gastric damage induced by ethanol in vivo and in vitro". *J Physiol Pharmacol* 44:273-281, 1993.
71. PASTERNAK, C.A. "Effect of pore formers on intracellular calcium". *Cell Calcium* 7: 387-397, 1.986.
72. PETERSON, W. L., Barnett, C., Walsh, J. H. "Effect of intragastric infusions of ethanol and wine on serum gastrin concentration and gastric acid secretion". *Gastroenterology* 91: 1390-1395, 1.986.
73. RAFAEL, J. "*Cytochrome c oxidase*". En: Methods of Enzymatic Analysis. Editores: H.U. Bergmeyer y J. Bergmeyer. Vol. 3. Weinheim, Germany; Verlag Chemie, 1.983, p. 266-273.
74. REHM, W.S. y Hokin, L. E. "The effect of pilocarpine, mecholyl, atropine and alcohol on the gastric potential and the secretion of hydrochloric acid". *Am. J. Physiol.* 149: 162-176, 1.947.
75. SAAKYAN, I.R., Saakyan, S. G. y Kondrashova, S. M. "Activation and inhibition of succinate dependent Ca^{2+} -transport in liver mitochondria during adaptation". *Biochemistry (Mosc)* 66(7): 795 – 802, 2001.
76. SACHS, G. "The gastric H,K ATPase: "*Regulation and structure/function of the acid pump of the stomach*". En: Physiology of the gastrointestinal tract. Editor: L. R. Johnson. 3ra. Ed., Vol. 2. New York, U.S.A.; Raven Press, 1.994. p. 1119-1138.

77. SARAU, H.M., Foley, J.J., Moonsammy G, y Sachs, G. "Metabolism of Dog Gastric Mucosa: Levels of glycolytic, citric acid cycle and other intermediates". *J. Biol. Chem.* 252 (23): 8572-8581, 1977.
78. SHANBOUR, L. L., Miller, J. y Chowdhury T. K. "Effects of alcohol on active transport in the rat stomach". *Am. J. Digest. Diseases* 18: 311-316, 1973.
79. SERNKA, T. J., Gilleland, C. W., y Shanbour, L. L. "Effects of ethanol on active transport in the dog stomach". *Am. J. Physiol.* 226(2): 397-400, 1974.
80. SERNKA, T. J. y Harris, J. B. "Pentose phosphate shunt and gastric acid secretion in the rat". *Am. J. Physiol.* 222(1): 25-32, 1972.
81. SHAW, G.P., Anderson, N. G. y Hanson, P. J. "Metabolism and gastric acid secretion: substrate-dependency of aminopyrine accumulation in isolated rat parietal cells". *Biochem. J.* 227: 223-229, 1985.
82. SINGER, M. V., Leffmann, C., Eysselein, V. E., Calden, H. y Goebell, H. "Action of ethanol and some alcoholic beverages on gastric acid secretion and release of gastrin in humans". *Gastroenterology* 93 (6): 1247-1254, 1987.
83. SINGER, MV. "Effect of etanol and alcoholic beverages on the gastrointestinal tract in humans". *Rom. J. Gastroenterol.* 11(3):197-204, 2002.
84. SOLL, A. H. "Extracellular calcium and cholinergic stimulation of isolated canine parietal cells". *J. Clin. Invest.* 68: 270-278, 1981.
85. SOLL, A. H. y Berglinth, T. "*Receptors that regulate gastric acid-secretory function*". En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, Editor: L. R. Johnson. 3ra. Ed., Vol. 2. New York, U.S.A.; Raven Press, 1994. p. 1139-1170.
86. STERMER, E. "Alcohol consumption and the gastrointestinal tract". *Isr. Med. Assoc. J.* 4(3): 200-202, 2.002.
87. SUBERO, O., Lobo, P., y Chacín, J. "Ca²⁺ requirement for metabolic effects of secretagogues in the amphibian gastric mucosa". *Am. J. Physiol.* 257 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 20): G969-G976, 1989.
88. SUBRAHAMANYAM, K., Reddy, g. r., Babu, G. R. y Chetty, C. S. "Polarized electric field effects on the regulation of succinate dehydrogenase activity in amphibian muscle and liver: kinetic study. *Biochem. Int.* 18(4): 851 - 863, 1989.
89. TAGUE, L.L. y Shanbour, L. L. "Effects of ethanol on bicarbonate-stimulated ATPase, ATP, and Cyclic AMP in canine gastric mucosa". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 154: 37-40, 1977.
90. TAKEUCHI, K., Nobuhara, Y., Okabe, S. "Role of luminal Ca²⁺ on normal and damaged gastric mucosa in the rat". *Dig Dis Sci* 30:1072-1078, 1985.

91. TARI, A., Yamamoto, G., Yonei Y., Sumii, M., Sumii, K., Haruma, K., Kajiyama, G., Wu, V., Sachs, G. y Walsh, J. H. "Effect of histamine on rat gastric H⁺-K⁺-ATPase α -subunit expression". *Am. J. Physiol.* 266 (Gastrointest. Liver Physiol. 29): G444-G450, 1.994.
92. TEPPERMAN, B.L., Lush, C. W. y Soper, B. D. "Role of endonuclease activity and DNA fragmentation in Ca²⁺ Ionophore A23187-mediated injury to rabbit isolated gastric mucosal cells". *Dig. Dis. Sci.* 41(6): 1172-1180, 1.996.
93. TEPPERMAN, B. L., y Soper, B. D. "The role of phospholipase A₂ in calcium-ionophore-mediated injury to rat gastric mucosal cells". *Dig. Dis. Sci.* 44(3): 494-502, 1.999.
94. TEPPERMAN, B.L., y Soper, B. D. "Ca²⁺ mediated damage to rabbit gastric mucosal cells: modulation by nitric oxide". *Eur. J. Pharmacol.* 293: 259-266, 1.995.
95. TEPPERMAN, B.L., y Soper, B.D. "Effect of extracellular Ca²⁺ on indomethacin-induced injury to rabbit dispersed gastric mucosal cells". *Can J Physiol Pharmacol* 72: 63-69, 1994.
96. TEPPERMAN, B. L., Tan, S. Y. y Whittle, B. J. R. "Effects of calcium-modifying agents on integrity of rabbit isolated gastric mucosal cells". *Am. J. Physiol.* 261 (Gastrointest. Liver Physiol. 24): G119-G127, 1.991.
97. VICTOR, B.E., Taegtmeier, H., y Miller, T. A. "Gastric mucosal high-energy phosphate metabolism". *Dig. Dis. Sci.* 40(1): 120-127, 1.995.
98. VOET, D. y Voet, J. G. *Biochemistry*. 2da. Edición, John Wiley & Sons Inc., New York, 1.995. 1365 p.
99. WANG, S. L., Wu-Wang, C. Y., Slomiany, A. y Slomiany, B. L. "Effect of acute ethanol treatment on epidermal growth factor receptor in the rat stomach". *Alcohol* 11(1): 11-15, 1.994.
100. WISE E. M. y Ball, E. G. "Malic enzyme and lipogenesis". *Biochemistry* 52: 1255-1263, 1.964.
101. WOLFE, M.M. y Soll, A.H. "The physiology of gastric acid secretion". *N. Engl. J. Med.* 319 (26): 1707-1715, 1.988.
102. WONG, S.H., Cho, C.H., Ogle, C.W. "Calcium and Ethanol-induced gastric mucosal damage in rats". *Pharmacol Res* 23: 71-79, 1991.
103. WONG, H.M., Soper, B.D. y Tepperman, B.L. Role of calcium in thromboxane B₂-mediated injury to rabbit gastric mucosal cells. *Dig. Dis. Sci* 40(9):2022-2028, 1.995.
104. YAMAGUCHI, M. "Effect of calcitonin on exchangeable calcium transport in isolated rats hepatocytes". *Mol. Cell Endocrinol.* 62 (2): 313- 318, 1.989.

Enhanced Intracellular Calcium Promotes Metabolic and Secretory Disturbances in Rat Gastric Mucosa during Ethanol-Induced Gastritis

ILEANA HERNÁNDEZ-RINCÓN, MARISELA OLGUÍN-MARTÍNEZ,
AND ROLANDO HERNÁNDEZ-MUÑOZ¹

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, D.F., Mexico

Changes in the Ca^{2+} homeostasis have been implicated in cell injury and death. However, Ca^{2+} participation in ethanol-induced chronic gastric mucosal injury has not been elucidated. We have developed a model of ethanol-induced chronic gastric injury in rats, characterized by marked alterations in plasma membranes from gastric mucosa and a compensatory cell proliferation, which follows ethanol withdrawal. Therefore, the present study explored the possible role of intracellular Ca^{2+} in the oxidative metabolism and in acid secretion in this experimental model. Glucose oxidation was greatly enhanced in the injured mucosa, as evaluated by CO_2 production by isolated mucosal preparations incubated with ^{14}C -radiolabeled glucose in different carbons. Oxygen consumption and acid secretion (aminopyrine accumulation) were also stimulated. A predominating secretory status was morphologically identified by electron microscopy in oxyntic cells of gastric mucosa from ethanol-treated rats. A coupling between secretory and metabolic effects induced by ethanol (demonstrated by an inhibitory effect of omeprazole in both parameters) was found. These ethanol-induced effects were also inhibited by addition of Ca^{2+} chelators to isolated gastric mucosa samples. Lanthanum, a Ca^{2+} channel blocker, inhibited ethanol-promoted increase of oxidative metabolism. In addition, a stimulated Ca^{2+} uptake by mucosal mices and increased *in vivo* Ca^{2+} levels in cytosolic and mitochondrial fractions, were also noticed. Enhanced glucose and oxygen consumptions were associated with higher ATP and NADP+ availability, whereas cytosolic NAD/NADH ratio (assessed by mucosal levels of lactate and pyruvate) was not significantly modified by the chronic ethanol administration. In conclusion, changes in Ca^{2+} homeostasis, probably mainly due to increased extracellular Ca^{2+} uptake, could mediate secretory and metabolic alterations found in the gastric mucosa from rats chronically treated with ethanol. *Exp Biol Med* 228:315-324, 2003

Key words: gastric mucosal injury; calcium homeostasis; calcium channels; gastric acid secretion; pentose phosphate shunt

We have developed a model in which prolonged ethanol administration elicits a histological profile of chronic gastric injury that is characterized by evident biochemical disturbances on plasma membrane functions. Such alterations include lower membrane fluidity, diminished activities of some membrane-associated enzymes, and decreased density of H_2 -histaminergic receptors in isolated plasma membranes from gastric mucosa of rats chronically treated with ethanol (1, 2). In addition, lipid peroxidation has been implicated in both the already-mentioned alterations in plasma membranes, as well as in the in the compensatory mucosal proliferation triggered after ethanol withdrawal (2). Nonetheless, we have not fully clarified the underlying mechanisms involved in the ethanol-induced chronic damage in the rat gastric mucosa.

Ethanol has been considered to induce a number of changes in the gastric mucosa that seem to explain, at least in part, the mechanism of action of this agent. They include reduced gastric blood flow (3), disruption of the so-called gastric mucosal barrier (4, 5), accompanied by bicarbonate leakage (6), as well as metabolic alterations deeply linked to the acid secretory activity in the damaged gastric mucosa (7-10).

Gastric acid hypersecretion is an aggressive factor involved in the pathogenesis of some gastric and duodenal disorders (11), and acid secretion has been proven to be dependent on mucosal oxidative metabolism, which provides ATP for driving H^+ - K^+ -ATPase activity (12-14). In addition, Ca^{2+} is an intracellular messenger that participates in the coupling of stimulus-secretion in the normal mammalian gastric mucosa (15-17). The ion also mediates the regulation of some metabolic pathways in the gastric mucosa, such as increased glycogen breakdown induced by theophylline in amphibians (18, 19), as well as the cholin-

This study was partially supported by a grant from PAEP to I.H.R. Ileana Hernández-Rincón is a fellow from the Universidad del Zulia and CONICIT, Venezuela.
¹ To whom requests for reprints should be addressed at Depto. De Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 70-243, México 04510, D.F., México. E-mail: rhermand@ifsio.unam.mx

Received September 3, 2002.
Accepted December 2, 2002.

1535-3702/03/2283-0315\$15.00
Copyright © 2003 by the Society for Experimental Biology and Medicine

ergic activation of carbohydrate oxidation by rabbit gastric glands (20). Then, because intracellular levels of Ca^{2+} seem to be implicated in the preservation of gastric mucosal integrity (21), disturbances of Ca^{2+} homeostasis have been claimed to be a mechanism underlying gastric injury induced by several agents (22, 23).

Increased Ca^{2+} levels have been also involved in ethanol-induced acute gastric mucosal injury (24–26); however, the relationship between Ca^{2+} and ethanol-induced gastric damage has not been well established. Hence, the connection among ethanol-induced changes on gastric acid secretion, oxidative metabolism and intracellular Ca^{2+} mobilization is unknown.

Therefore, the present study was aimed to evaluate whether alterations on acid secretion and oxidative metabolism are involved in the pathogenesis of ethanol-induced chronic injury in rat gastric mucosa. Moreover, the possible role of intracellular changes on Ca^{2+} homeostasis was also assessed as a major factor inducing gastric mucosal damage.

Materials and Methods

Chemicals. D-[U- ^{14}C] Glucose (sp. act. 260 mCi/mmol), D-[1- ^{14}C] Glucose (sp. act. 260 mCi/mmol), glucose (sp. act. 55 mCi/mmol), and D-[6- ^{14}C] glucose (sp. act. 56 mCi/mmol) were purchased from Amersham Co. (Arlington Heights, IL). Aminopyrine [dimethylamine- ^{14}C] (sp. act. 100 mCi/mmol), [U- ^{14}C] sucrose (sp. act. 600 mCi/mmol), and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ were obtained from New England Nuclear Life Science Products, Inc. (Boston, MA). BAPTA-AM was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR) and omeprazole (Losec®) from Astra Chemicals, S.A. (Mexico). Enzymes, coenzymes, EGTA and other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Animal Model. The model of ethanol-induced subchronic gastric mucosal damage in male Wistar rats (230–270 g of body weight), has been reported in detail (1). Briefly, overnight fasted animals with free access to water received 1 ml of saline solution (control group), or 1 ml of 50% ethanol (gastritis group) by intragastric gavage, followed by free access to water (controls) or 5% ethanol in water (gastritis group). The treatment was continued for 5 days, and at the fifth day ethanol was withdrawn. After an overnight fast, animals were killed 2 to 3 hr after ethanol withdrawal under general anesthesia with sodium pentobarbital (40 mg/kg body weight). All procedures were conducted in accordance to our *Institutional Guide for Animal Experimentation* (National University of Mexico).

Isolation of Gastric Mucosa. Gastric mucosa from rats was isolated as previously reported (27). Briefly, rat stomachs were removed and cut open along the lesser curvature. The glandular area was dissected and cut to obtain minces or slices, which were rinsed three times and suspended in a medium containing (in mmol/l): 10 TES, 133 NaCl, 5 KCl, 1 MgSO_4 , 1 CaCl_2 , 1 Na_2HPO_4 , and 10 glucose, unless any change was indicated.

Glucose Oxidation. The rate of glucose oxidation through pentose phosphate and glycolytic acid citric cycle pathways, were estimated comparatively by measuring the production of $^{14}\text{CO}_2$ from [1- ^{14}C], [6- ^{14}C], or [U- ^{14}C] glucoses as previously described, with minor changes (27): TES buffer-suspended minces of gastric mucosa were incubated in the presence of 0.4 to 0.8 μCi of ^{14}C -radiolabeled glucose in a final volume of 2 ml at 37°C, during 90 min. Thereafter, the $^{14}\text{CO}_2$ was trapped in 0.2 ml of 100 mmol/l hyamine, placed in a central wall of the flask. Then, hyamine was transferred to a vial containing scintillation liquid and counted. Appropriate controls were run simultaneously. All the experiments were performed in duplicate and the rate of glucose oxidation is expressed as nmol per hour per milligram of protein.

Aminopyrine Accumulation. Accumulated aminopyrine in minces of gastric mucosa was measured as previously described by Chaefin *et al.* (12), with minor modifications. Minces of gastric mucosa (6–8 mg dry weight) were gassed (95% O_2 –5% CO_2) during 2 min and incubated at 37°C during 1 hr in TES solution containing 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]-aminopyrine. Then, the pellets were obtained by centrifugation and immediately transferred to counting vials, weighed, and dried overnight at 80°C. The dried pellets were weighed, solubilized in 1 ml of 1N NaOH during 24 hr, neutralized and added to scintillation liquid, and counted for radioactivity. Intraglandular water content was determined in minces of gastric mucosa from both controls and ethanol-treated animals using [^{14}C]-sucrose as a marker for the extraglandular space, as previously described (12). Wet and dry weights were determined to calculate total water, and the extraglandular space was calculated from [^{14}C]-sucrose content of the tissue. The ratio of aminopyrine in intraglandular/extraglandular water was calculated and taken as an indicator of an intraglandular region relatively low pH (12). When BAPTA-AM was used, all the flasks were pre-incubated during 15 min in the absence of aminopyrine before allowing the incorporation of this reagent to the cell.

Ca^{2+} Uptake and Efflux by Isolated Gastric Mucosa. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake was performed as described previously (18), with some changes. Minces of gastric mucosa were incubated in the TES solution containing 0.2 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{45}\text{CaCl}_2$ for different periods at 37°C. After incubation, the flasks content was immediately transferred to tubes containing 1 mmol/l LaCl_3 (in the absence of Ca^{2+}) and centrifuged again. The pellet was resuspended in TES solution containing 1 mmol/l EGTA and spun as indicated. The final pellets were dried overnight, weighed, solubilized in 1 ml of 1N NaOH, neutralized, and counted. Uptake was calculated in terms of nmol of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ per milligram protein on the basis of specific activity determinations. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ efflux was also measured (18). Weighed slices of rat gastric mucosa were rinsed in TES solution (without Ca^{2+}) and incubated in the presence of 1.8 mM CaCl_2 containing 0.2 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{45}\text{CaCl}_2$. After incubating at 37°C for 2 hr, the tissue was gently

TES
FALLA DE COCEN

TESIS COM
 A
 1981

blotted on filter paper and transferred to the flasks containing 2 ml of Ca²⁺-free TES solution. Mucosal slices were subsequently transferred to other flasks in series at different intervals to complete 90 min. Incubation was carried out at 37°C with shaking and oxygenation (95% O₂-5% CO₂). After washing, mucosa was digested, neutralized, and counted as described above. Each individual wash solution was dried at 80°C for 2 hr and the dried powder (dissolved in water) was counted for radioactivity. The total tissue radioactivity at the end of experiment was the sum of the total counts in each wash plus the digested tissue. Results are expressed as a percentage of total ⁴⁵Ca²⁺ incorporated.

Morphological Analysis by Electron Microscopy. Samples of gastric mucosa, isolated as described before, were fixed in a buffered solution containing 2.5% glutaraldehyde (pH 7.4). The tissues were then processed and analyzed according to Berglinth *et al.* (28). In a sample of 50 parietal cells, the nonsecreting and secreting cells were identified in accordance to their morphological characteristics as previously defined (28). The percentage of cellular area occupied by the intracellular canaliculus or lacunar structures was also determined and compared in both nonsecreting and stimulated parietal cells.

Quantification of Ca²⁺ in Subcellular Fractions. Gastric mucosa from controls and ethanol-treated animals were totally excised and homogenized in a buffer containing 0.25 mol/l sucrose and 10 mmol/l HEPES/KOH (pH 7.4). Subcellular fractions were obtained according to protocols described elsewhere (1, 2, 29). For total Ca²⁺ measurement, both mitochondrial and cytosolic fractions were deproteinized by adding HClO₄ (6-7% w/v final concentration) and centrifuged in the presence of 1% LaCl₃ and kept frozen until use. Ca²⁺ content from the deproteinized fractions was measured by atomic absorption flame photometry according to Díaz-Muñoz *et al.* (30).

Oxygen Consumption by Gastric Mucosa Mincies. Mincies of gastric mucosa (6-8 mg dry weight) contained in a 3 ml volume of TES solution were incubated at 25°C in the presence of 10 mmol/l glucose as substrate. The mixture was placed in a chamber equipped with a Clark-type oxygen electrode (Yellow Spring Instruments), and respiration was recorded polarographically for 10-15 min. Experiments with lanthanum were performed incubat-

ing gastric mucosa minces in the presence of 1 mmol/l LaCl₃. Before the polarographic register. Oxygen uptake is expressed a nAtO₂/min/mg of tissue protein.

Analytical Procedures. Cytosolic activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) was determined according to the method of Lörh and Waller (31). Succinate dehydrogenase (EC 1.2.1.16) was measured in the mitochondrial fraction, by the technique reported by King (32). In both, whole homogenate of gastric mucosa and isolated mitochondria, the activity of cytochrome oxidase (EC 1.9.3.1) was quantified according the method of Rafael (33). In neutralized acid extracts obtained from gastric mucosa, levels of ATP, ADP, lactate, and pyruvate were determined by the methods described elsewhere (34). The free pool of NADP⁺ was also spectrophotometrically determined in these extracts, coupled to the reaction of the malic enzyme, as a modification of the technique described by Wise and Ball (35).

Calculations and Statistics. Mitochondrial recovery and the amount of protein per gram of gastric mucosa were calculated using the activity of cytochrome oxidase, as a marker enzyme, as previously described (36). All results are expressed as mean ± SE. The significance of the differences among groups was assessed by two-way ANOVA and, in the case of significance by *ad hoc* Newman-Keul's test.

Results

Changes in Mucosal Glucose Oxidation Induced by Chronic Treatment with Ethanol. Fulfillment of the metabolic requirements of the acid-secreting parietal cell under physiological circumstances requires a combination of substrates, but glucose seems to be the most effective in rats (13). Total glucose oxidation by isolated gastric mucosal minces, as assessed by ¹⁴CO₂ production from U-¹⁴C-glucose, showed an apparent K_m of 1.3 ± 0.3 mM for glucose, as well as an apparent V_{max} of 11.1 ± 0.5 nmol of oxidized glucose·h⁻¹·mg⁻¹ of protein, in control gastric mucosa. From these data, we used 10 mmol/l glucose as fixed substrate concentration for further incubations of gastric mucosal samples in the presence of radiolabeled glucose in different carbons (Table I). In animals subjected to chronic mucosal injury, glucose oxidation was doubled as

Table I. Oxidation of [1-¹⁴C]-, [6-¹⁴C]-, and [U-¹⁴C]-Glucose by the Gastric Mucosa from Ethanol-Treated Rats

Treatment	Glucose isotope oxidation (nmols·h ⁻¹ ·mg tissue protein ⁻¹)					
	[1- ¹⁴ C]	n	[6- ¹⁴ C]	n	[U- ¹⁴ C]	n
Control	9.9 ± 1.2	16	6.2 ± 0.7	8	8.9 ± 0.6	11
Ethanol (gastritis)	20.6 ± 2.0*	13	12.9 ± 1.7*	8	18.8 ± 2.1*	9
Control + omeprazole	—	—	—	—	7.3 ± 0.3*	4
Ethanol + omeprazole	—	—	—	—	12.0 ± 0.6*	4

Mincies of gastric mucosa isolated from controls and ethanol-treated rats were incubated with 10 mmol/l glucose containing 0.4 to 0.8 µCi of ¹⁴C-radiolabeled glucose in different carbons. The incubation was performed at 37°C for 90 min. Controls corresponded to rats treated with saline. Results are expressed as mean ± SE of n individual preparations. Statistics: *P < 0.05 vs controls; *P < 0.05 vs the ethanol group (gastritis).

compared with controls. The increased oxidation of the different glucose radioisotopes was of a similar magnitude in gastric samples from animals undergoing gastritis, suggesting that the enhanced capacity of chronically injured gastric mucosa for metabolizing glucose was not associated to changes in the relative contribution of each metabolic pathway (i.e., glycolysis, citric acid cycle or pentose phosphate shunt; Table I). Based on data taken from Table I, the production of $^{14}\text{CO}_2$ as a function of the ratio $1\text{-}^{14}\text{C}/6\text{-}^{14}\text{C}$ of glucose was of 1.6, indicating that rat gastric mucosa truly possesses an active pentose phosphate pathway activity for glucose oxidation, which agrees with metabolic considerations previously reported (27). The presence of an active pentose phosphate shunt in the rat gastric mucosa was additionally corroborated by measuring of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cytosolic fractions of gastric mucosa: 333.0 ± 66.8 (ethanol group) vs 336.4 ± 47.6 nmol NADPH/min/mg of protein (control group). To evaluate the proportion of glucose oxidation directly linked to the acid secretory activity of the gastric mucosa, the $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ inhibitor, omeprazole, was added *in vitro* to the incubation medium. As shown in Table I, omeprazole inhibited glucose consumption in both, mucosal samples from control and animals subjected to gastritis. However, the percentage of inhibition of glucose oxidation induced by omeprazole was of higher magnitude in mucosal samples of rats treated chronically with ethanol (36 ± 4 vs $18 \pm 3\%$ in controls; $P < 0.01$). These data suggest that a significant fraction of glucose oxidative metabolism is coupled to the activity of the $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$.

Effect of Chronic Ethanol Treatment on the Secretory Acid Status in Gastric Mucosa. The accumulation of ^{14}C -aminopyrine was evaluated in mucosal samples obtained from our experimental groups, as a parameter indicative of the acid secretory function of the parietal cells. Basal aminopyrine accumulation (nonstimulated by secretagogues) was almost doubled in preparations obtained from ethanol-treated rats when compared to controls (Fig. 1). In control mucosal samples, either histamine or carbachol (gastric secretagogue which acts via Ca^{2+}) were able to stimulate acid secretion; however, both secretagogues failed to elicit an additional stimulation of acid secretion in rats subjected to gastritis (Fig. 1). The histaminergic H_2 -receptor antagonist, cimetidine, had no effect in the basal aminopyrine accumulation in either, control or injured mucosal preparations. The BAPTA-AM, a chelator of intracellular Ca^{2+} , did lower the stimulated acid secretion recorded in mucosal samples from ethanol-treated rats (Fig. 1).

The results obtained from *in vitro* measurements of the acid secretory activity in gastric mucosa samples might be correlated with the morphologic changes of the parietal cells, induced *in vivo* by chronic ethanol administration. Figure 2A (control animals) shows a rat parietal cell, which has a characteristic conical shape with numerous mitochondria. Also there is a complex network of smooth-surface

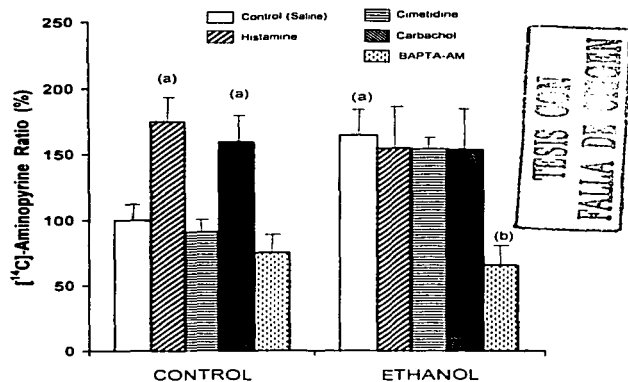


Figure 1. Effects of subchronic ethanol treatment on the aminopyrine accumulation (aminopyrine ratio). Mincos of gastric mucosa from both controls and ethanol-treated rats were incubated in presence or in absence of histamine (10^{-4} M), carbachol (10^{-4} M), cimetidine (10^{-3} M), or BAPTA-AM (50 μM). The BAPTA-AM vehicle (DMSO) was added to control flasks (20 μl). For calculations, a mean value of 2.4 ± 0.4 (controls) and 2.6 ± 0.4 $\mu\text{l}/\text{mg}$ dry wt (ethanol) was found for the intraglandular water. Values are means \pm SE of 4-6 experiments. Control value: 0.92 ± 0.11 (100%). Statistics: $P < 0.05$ vs control group (saline); (b) $P < 0.05$ vs ethanol group.

intracytoplasmic membranes termed the vesicle tubular system (Fig. 2A). This morphological pattern represented the $69 \pm 5\%$ of the total population of oxyntic cells in control samples. When parietal cells were examined in mucosal samples from animals undergoing gastritis, it was observed that the vesicle tubules decreased in number and increased in volume, taking a vacuolar shape, whereas microvillus appeared on their secretory surface. Therefore, the apparent loss in surface area of the vesicle tubular system seems to be compensated for by newly created microvillus (Fig. 2B). The last findings has been described before as a result of stimulating normal parietal cells with secretagogues (28); therefore, the increased number of vacuoles can be considered as expanded acid secretory canaliculus, which were present in the $50 \pm 5\%$ of parietal cells from ethanol-treated rats (Fig. 2B). Moreover, when comparing the percentage of cell surface occupied by the secretory canaliculus in oxyntic cells from both experimental groups, differences were quite evident. Few vacuoles were recorded in nonsecretory cells (i.e., controls animals) accounting for by $3.1 \pm 0.2\%$ of the total area. However, in stimulated oxyntic cells predominantly in the gastritis group, the vacuolar distribution represented up to $21 \pm 2\%$ of the total area calculated for the parietal cells.

Role of Ca^{2+} in Ethanol-Induced Metabolic and Secretory Changes. Both the inhibitory effect of BAPTA-AM and the absence of carbachol stimulation on

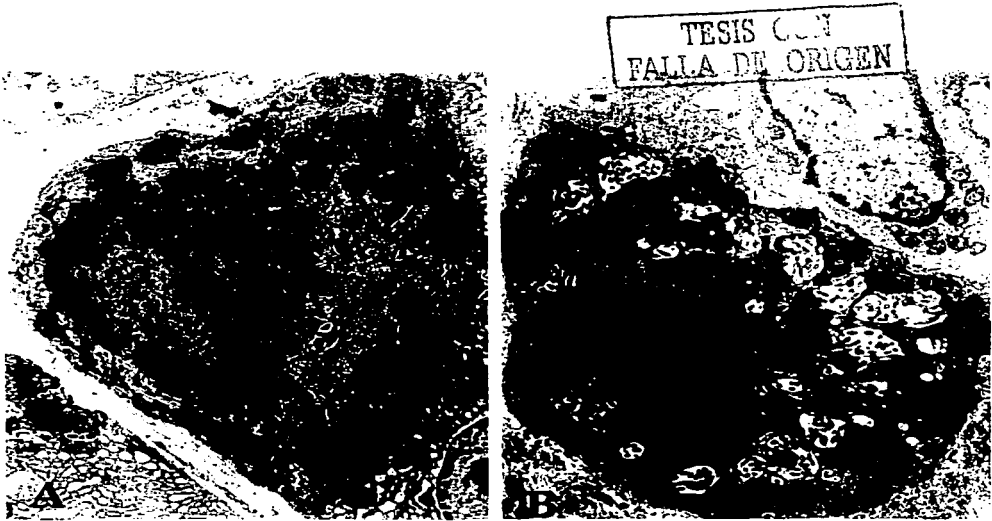


Figure 2. Electron micrographs of parietal cells. The pictures are representative of at least three stomachs per group. (A) control animal. (B) Ethanol-treated animal. Pieces of gastric mucosa freshly isolated were immediately placed in a cooled solution of 2.5% glutaraldehyde in 100 mM of phosphate buffer, pH 7.4, and processed for transmission electron microscopy. vt, vesiculetubular system; ic, intracellular canaliculus and microvillus; m, mitochondria. Magnification $\times 4000$.

the aminopyrine accumulation were detected in the gastric mucosa from ethanol-treated rats (Fig. 1). Such effects led us to examine the possible role of Ca^{2+} in the regulation of carbohydrate metabolism in normal and injured gastric mucosa. For this, agents capable of modifying cell Ca^{2+} homeostasis were used *in vitro*. Using EGTA to sequester extracellular Ca^{2+} , glucose oxidation was reduced as compared with the basal glucose utilization by preparations from control animals. Addition of BAPTA-AM to the incubation medium with EGTA, elicited an even stronger inhibitory effect on glucose oxidation (Fig. 3). In rats subjected to gastritis, EGTA significantly reduced the ethanol-induced stimulation of mucosal glucose oxidation, while the incubation in presence of both Ca^{2+} chelators, completely abolished the chronic effect of ethanol (Fig. 3). The muscarinic agonist carbachol, stimulated the glucose oxidation in control animals, but this agent did not modify the glucose catabolism in the ethanol-treated rats (Fig. 3). Mucosal glucose oxidation in the presence of 1 mmol/l LaCl_3 was inhibited in a similar extent, either in samples obtained from control or from animals subjected to gastritis (Table II). These data strengthen the dependence of gastric mucosa oxidation of glucose and the extracellular calcium, indeed supporting to that found in the experiments using EGTA (Fig. 3).

To get a better understanding of the putative effect of chronic ethanol on Ca^{2+} dynamics, uptake and efflux of

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ were determined in mucosal samples of our experimental groups (Fig. 4). Mucosal Ca^{2+} uptake was progressively increased and saturated at 30 min of incubation. Despite a quite similar profile of Ca^{2+} uptake was found in gastric mucosa isolated from both control and rats undergoing gastritis, it was clear that injured gastric mucosa incorporated more radioactive Ca^{2+} than the normal one (Fig. 4A). On the contrary, Ca^{2+} release was similar in mucosal samples obtained from both experimental conditions (Fig. 4B). These results are in agreement with those obtained by measuring total Ca^{2+} in subcellular fractions (Table III). In both subcellular fractions, cytosol and mitochondria, there was an enhanced Ca^{2+} accumulation in mucosal samples from ethanol-treated rats (Table III).

Oxygen Consumption and Production of ATP and Lactate in Gastric Mucosa from Control and Ethanol-Treated Animals. Despite that calculated amount of mitochondrial protein per gram of gastric mucosa (36) was lower in animals undergoing gastritis (32.4 vs 44.5 mg of mitochondrial protein/g of mucosa, in controls; $P < 0.01$), samples of damaged mucosa had high oxygen consumption (Table II). This could be explained by increased activities of mitochondrial enzymes, such as that of succinate dehydrogenase, which was enhanced in animals subjected to gastritis (11.1 ± 0.8 , against $7.4 \pm 1.0 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of mitochondrial protein, in controls; $P < 0.02$). Interestingly, oxygen uptake by gastric mucosal slices was

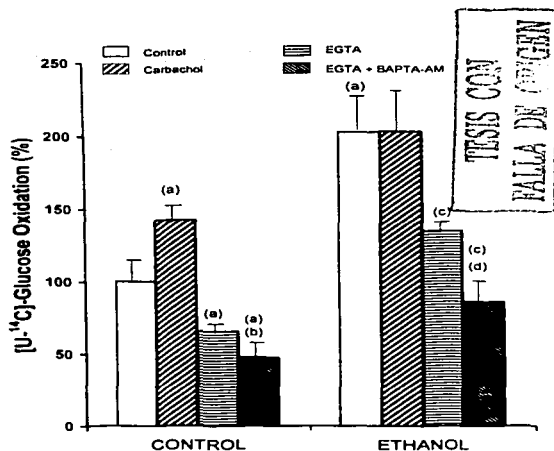


Figure 3. Effects of carbachol and Ca^{2+} quelators on the rate of glucose oxidation. Minces of gastric mucosa from controls and ethanol-treated animals, were incubated with 10 mM glucose plus 0.4 μCi [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-glucose, in absence or presence of carbachol 10^{-4} M, EGTA 1 mM, or EGTA + BAPTA-AM 50 μM . CaCl_2 was omitted from TES solution in experiments with EGTA or EGTA + BAPTA-AM. Control value: 10.4 ± 1.8 nmol of glucose oxidized $\cdot\text{mg}^{-1}$ of protein. Results are mean \pm SE of 4–10 experiments. Statistics: (a) $P < 0.05$ vs controls (saline); (b) $P < 0.05$ vs EGTA; (c) $P < 0.05$ vs ethanol-treated animals; (d) $P < 0.05$ vs EGTA in ethanol-treated animals.

largely modified by addition of lanthanum or omeprazole. Pre-incubation with 1 mmol/l LaCl_3 inhibited oxygen consumption by control mucosa samples (up to 55%); the inhibiting effect of lanthanum in the stimulated oxygen uptake by slices of damaged gastric mucosa was even bigger (72%; Table II). Coinciding with its effect on glucose oxidation by mucosal preparations (Table I), addition of omeprazole led to an inhibition of 39.5% and of 51.3% in the rate of gastric mucosal oxygen consumption by control and ethanol-treated rats, respectively.

Although animals treated chronically with ethanol showed lower mitochondrial content in the gastric mucosa,

these preparations produced more ATP than controls after incubation with glucose (Table IV). Because gastric mucosal ADP content was not significantly modified in either, control and ethanol-treated animals, total adenine nucleotides were augmented in gastric mucosa at the onset of gastritis. Despite increased oxidation of glucose was noted in mucosal samples of animals with gastritis, no significant changes were found in the level of lactate and on the lactate/pyruvate ratio (Table IV). Because glucose flux through the pentose phosphate pathway was increased in gastric mucosa of ethanol-treated rats, in the absence of changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase, the content of NADP^+ was measured. As expected, mucosal samples from rats undergoing gastritis showed a significant higher NADP^+ level than in controls (Table IV); therefore, enhanced activity of pentose phosphate shunt in the damaged mucosa could be caused by, at least in part, to the increased mucosal NADP^+ availability.

Discussion

The present study was aimed to discern whether changes in oxidative metabolism and acid secretory activity, are participating in the mechanisms of gastric mucosal injury induced by *in vivo* chronic treatment with ethanol. Additionally, the role of Ca^{2+} homeostasis as a mediator of those changes was also investigated. Our data strongly suggest that chronic gastric mucosal injury *in vivo* occurs with changes in Ca^{2+} mobilization, disturbing its homeostasis. These events exert a profound influence in the oxidative catabolism of carbohydrates and the energy supply for the stimulated acid secretion by parietal cells after mucosal injury induced by chronic ethanol treatment.

Glucose has been considered as the main oxidative substrate for rat gastric mucosa, in function of its efficiency in supporting the acid secretory activity (13, 27). In the present study, kinetics of glucose by gastric mucosa from control animals were very similar to those reported in other species (14, 18). Total glucose oxidation corresponding to the different glucose oxidative pathways (glycolysis, pentose phosphate shunt, citric acid cycle), was significantly stimulated in gastric mucosa from animals subjected to gastritis (Table I). It should be noted that present experiments were conducted in the absence of ethanol because ethanol and its

Table II. Effects of 1 mM LaCl_3 on the Rate of Oxygen Uptake and Glucose Oxidation in the Ethanol-Treated Rat Gastric Mucosa

Treatment	Addition	O_2 uptake $\text{nATO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg tissue}^{-1}$	Rate of $6\text{-}^{14}\text{C}$ -glucose oxidation $\text{nmols} \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{mg tissue protein}^{-1}$
Control	None	47.3 ± 4.0	6.11 ± 0.6
	Lanthanum	$21.5 \pm 1.8^*$	$4.17 \pm 0.4^*$
Ethanol	None	75.2 ± 8.4	11.6 ± 1.1
	Lanthanum	$21.1 \pm 3.0^*$	$7.5 \pm 0.9^*$

Aliquots of gastric mucosa samples were incubated for 90 min at 37°C in the presence of 10 mmol/l glucose containing 0.5 μCi of $6\text{-}^{14}\text{C}$ -glucose to assess the rate of glucose oxidation. Other aliquots from the same samples were assayed for oxygen consumption, as described in the Materials and Methods section. * $P < 0.05$ vs control.

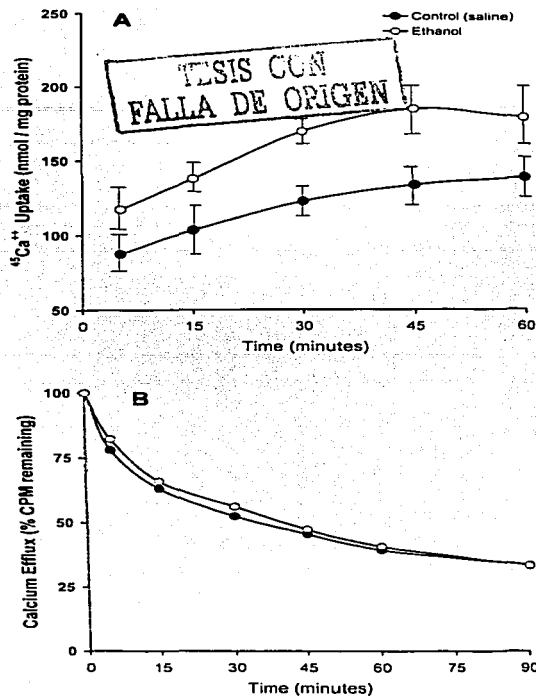


Figure 4. Effects of ethanol on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -influx (A) and -efflux (B) by the gastric mucosa of rats. Experiments were performed as described in Materials and Methods section. Results are means \pm SE of four experiments. Values in ethanol-treated group are statistically significant vs the corresponding point in the control group.

metabolites were practically undetectable at the moment of animal's death (1). Then, changes on glucose oxidative metabolism, found in this model, were a consequence of the chronic mucosal injury, instead due to ethanol oxidation during *in vitro* incubations. In agreement with this statement is the finding of a very low capacity of rat gastric mucosa to oxidize ethanol, at concentrations below 150 mmol/l (37).

Our data, using radiolabeled glucose in different carbons, clearly showed that an active pentose phosphate shunt is present in the rat gastric mucosa (Table I). This agrees qualitatively with the effect reported by Sernka and Harris (27), despite the magnitude of glucose oxidation was lower than the effect described by these authors. Because we de-

Table III. Content of Total Ca^{2+} Determined by Atomic Absorption Spectrometry in the Cytosolic and Mitochondrial Fractions from the Rat Gastric Mucosa

Treatment	Total calcium content (nmol Ca^{2+} ·mg tissue protein ⁻¹)	
	Cytosol	Mitochondria
Control	0.49 \pm 0.03	1.86 \pm 0.15
Ethanol (gastritis)	0.65 \pm 0.05*	2.85 \pm 0.31*

Both cytosolic and mitochondrial fractions were isolated from homogenates of gastric mucosa, deproteinized by 6% HClO_4 , and centrifuged in presence of 1% LaCl_3 . Ca^{2+} total content was measured by atomic absorption flame photometry. Results are mean \pm SE of three determinations from pooled gastric mucosa. * $P < 0.05$ vs controls.

tected glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, this further support that a fraction of glucose oxidation is derived to the pentose phosphate shunt in the rat gastric mucosa. Indeed, chronic ethanol treatment substantially increased glucose flux through this metabolic pathway in the injured mucosa, effect seemed to be due an increased availability of NADP⁺ (Tables I and IV). A similar stimulation of the pentose phosphate shunt has been observed during early stages of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride (38). Here, we have suggested that increased pentose phosphate shunt activity could participate in the replenishment of reduced glutathione and probably in the synthesis of deoxyribonucleotides, stimulating cell replication (38). In this context, we have observed a normalization of the mucosal glutathione level and increased DNA synthesis, during the early recovery period after ethanol withdrawal in the experimental present model (2). Hence, both processes requiring NADPH (DNA synthesis and glutathione replenishment) would favor the oxidative flux of glucose through pentose phosphate shunt.

Increased glucose oxidation can be associated to an enhanced demand of metabolic energy for the H^+ - K^+ -ATPase activity, leading to an acid hypersecretory state in the injured gastric mucosa. The inhibitory effects of omeprazole on the glucose oxidation in the gastric mucosa of ethanol-treated rats (Table I), and on oxygen consumption, strongly suggest a coupling between metabolic and secretory activities in this model of mucosal injury (Figs. 1 and 2). A similar dependence between secretory and metabolic effects has been reported before in the normal gastric mucosa (12-14, 39). Aminopyrine accumulation seemed to be a good indirect index of the acid secretion in the rat gastric mucosa. Chronic ethanol treatment *in vivo* induced a significant increase on the acid secretory activity, as assessed by aminopyrine accumulation and electron microscopy data (Figs. 1 and 2). Therefore, these data show that chronic ethanol treatment also occurs with a mucosal hypersecretory state, which resembles the stimulatory action of ethanol on this parameter, found after its acute exposure (5, 8-10, 40). In addition, ethanol seemed to directly stimu-

Table IV. Effect of Ethanol *in Vivo* Administration on the Tissue Level of Lactate, Pyruvate, ATP, ADP, and NADP⁺ in Incubated Slices of Rat Gastric Mucosa

TESIS COMPLETA
FALLA DE ORIGEN

Treatment	Total tissue content (μmoles·g wet weight ⁻¹)				
	Lactate	Pyruvate	ATP	ADP	NADP ⁺
None (control)	2.1 ± 0.2	0.16 ± 0.02	2.4 ± 0.2	1.6 ± 0.2	0.015 ± 0.001
Ethanol (gastritis)	2.4 ± 0.2	0.17 ± 0.01	3.4 ± 0.3*	1.9 ± 0.2	0.027 ± 0.002*

Slices of gastric mucosa isolated from both control and ethanol treated rats were incubated for 90 min (at 37°C), in the presence of 10 mmol/l glucose (pH 7.4). Immediately after incubation, slices were immediately deproteinized with 6% HClO₄. Extracts were further neutralized, and the content of lactate, pyruvate, ATP, ADP, and NADP⁺ were determined as described in Materials and Methods. Results are mean ± SE of five individual experiments. Statistics as indicated in the Table II.

late the functional expression of gastric H⁺-K⁺-ATPase (41).

The close relationship among glucose oxidation, ATP generation, and acid secretory activity found in the normal and ethanol-injured mucosa seems to be regulated by changes in intracellular levels of Ca²⁺ as a possible physiological mediator. Although Ca²⁺ has been claimed to be a mediator triggering cell death (42), changes in Ca²⁺ homeostasis are also involved in the compensatory cell proliferation that follows partial hepatectomy in rats (30). In the normal gastric mucosa, the physiological role of Ca²⁺ in the regulation of metabolic and secretory processes has been established (15–17, 19, 20). However, the role of Ca²⁺ during generation of gastric mucosal injury has not been fully clarified, since information is lacking on *in vivo* effects of this cation on gastric mucosa.

The metabolic inhibition induced by absence of Ca²⁺ (+EGTA), or by the presence of lanthanum in the incubation medium, clearly indicates that extracellular Ca²⁺ participates in the regulation of oxidative metabolism in gastric mucosa. Indeed, the stimulation of glucose oxidation in ethanol-injured rat gastric mucosa was particularly sensitive to the blockade of Ca²⁺ entry to mucosal cells. However, the addition of the intracellular Ca²⁺ chelator, BAPTA-AM, induced an extra inhibition of the glucose oxidation, suggesting that Ca²⁺ mobilization from internal stores also mediates the metabolic ethanol effect (Fig. 3). Despite carbachol did not induce additive stimulation of glucose oxidation and aminopyrine accumulation in mucosa from ethanol-treated rats, it did stimulate glucose oxidation in control animals (Figs. 1 and 3). LaCl₃ was a stronger inhibitor of calcium-induced effects on energy metabolism in the chronically ethanol-injured mucosa, as compared with control rats (Table II). These data indicate that a significant fraction of glucose oxidation depends on Ca²⁺ mobilization, from both extracellular medium and internal stores, being this dependence stronger in gastric mucosa from rats subjected to gastritis. Similar results have been reported in guinea pig parietal cells treated with ethanol *in vitro*, where carbachol also failed in stimulating the acid secretion. This has been attributed, at least in part, to high levels of intracellular Ca²⁺ and activation of protein kinase C, presumably induced by ethanol oxidation (43). The above results strongly suggest that ethanol-induced chronic mucosal dam-

age could be associated to disturbances on Ca²⁺ homeostasis, characterized by increased levels of intracellular Ca²⁺ in the rat gastric mucosa.

Confirming the aforementioned, we have the following findings in ethanol-injured gastric mucosa: 1) in both cytosolic and mitochondrial fractions, total calcium content is increased (Table II), 2) mucosal mices incorporated more actively the added external Ca²⁺ (Fig. 4). This ion acts as a regulator in of some mitochondrial enzyme activities in the rabbit gastric mucosa, influencing the metabolism of carbohydrates and its derivatives (20). Indeed, levels of total mitochondrial Ca²⁺ reported herein correspond to those proposed as capable of affecting mitochondrial dehydrogenase activities in other tissues (44). Linked to the above mentioned, Ca²⁺ also seems to mediate the mechanism of secretory stimulation by of H₂-receptor agonists in the parietal cell (17, 45). Hence, high levels of intracellular Ca²⁺ induced by chronic treatment with ethanol could promote enhanced activity of mitochondrial enzymes, such as succinate dehydrogenase. The latter might explain the enhanced oxidative metabolism of the injured mucosa, even though that mitochondrial protein was found reduced in gastric mucosa from animals with gastritis.

Controversy exists regarding the participation of Ca²⁺ in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced *in vitro* and *in vivo* by acute ethanol exposure. Ethanol treatment increases intracellular Ca²⁺ concentration, leading to a gastric mucosal lesion (26). *In vitro*, external Ca²⁺ exacerbates ethanol-induced damage in gastric mucosal samples (46), and Ca²⁺ channel blockers exert protection for gastric mucosa against the deleterious effect of ethanol (26, 47, 48). In contrast, it has also been reported that Ca²⁺ could diminish the extent of ethanol-induced gastric injury (49), and that verapamil, a Ca²⁺ channel antagonist, indeed worsened the ethanol-induced gastric mucosal damage (24). Despite the fact that nature of this discrepancy is still unknown, this could be related, at least in part, to the different experimental models used (*in vivo* vs *in vitro*), ethanol and Ca²⁺ concentrations, time of exposure, and rate of ethanol metabolism, among others. The present work shows that Ca²⁺ intracellular levels could mediate metabolic and secretory effects, which were more evident in gastric mucosa isolated from animals subjected to gastritis.

Ethanol effects have been reported in gastric mucosa

metabolism. Acute treatment with ethanol produces a significant decrease in ATP content (50), accompanied of elevated lactate/pyruvate ratio in the gastric mucosa (10). In addition, ethanol can also decrease glucose oxidation by the gastric mucosa, mainly through inhibition of the pentose phosphate pathway (51). Indeed, it has been proposed that topical ethanol exposure alters oxidative phosphorylation, coincident with its damaging effect on gastric mucosa, most likely via perturbations in tissue blood flow (52). Because we did not find the above-described effects of ethanol in this present model of chronic mucosal injury, we could rule out the participation of acute ethanol effects. Therefore, the changes in oxidative metabolism, acid secretion and in intracellular Ca^{2+} content, seemed to be characteristic in rat gastric mucosa during progression of a chronic mucosal damage induced by ethanol treatment.

In conclusion, for the first time we have demonstrated that changes in Ca^{2+} mobilization leading to a disturbed Ca^{2+} homeostasis occur in a model of chronic gastric mucosal injury *in vivo* after ethanol withdrawal. These events can be related to metabolic adjustment to maintain the oxidative catabolism of carbohydrates and the energy supply for the acid secretion stimulated in the parietal cells. However, it is also possible that Ca^{2+} could mediate preparative changes that are driving the cell proliferative response that follows to discontinuation of ethanol in this model (2). In a similar context, changes of intracellular Ca^{2+} participate in the metabolic adjustment (energy and redox potentials) that occurs at the onset of liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats (30, 34).

We thank Susana Vidrio for her expert technical assistance and M.S. Pilar Fernández-Lomelín for the determinations of calcium content by Atomic Absorption Spectrometry.

1. Hernández-Muñoz R, Montiel-Ruiz F. Reversion by histamine H2-receptor antagonists of plasma membranes alterations in ethanol-induced gastritis. *Dig Dis Sci* 41:2156-2165, 1996.
2. Hernández-Muñoz R, Montiel-Ruiz C, Vázquez-Martínez O. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation. *Lab Invest* 80:1161-1169, 2000.
3. Guth PH. Gastric blood flow in ethanol injury and prostaglandin cytoprotection. *Scand J Gastroenterol* 21:86-91, 1986.
4. Davenport HW, Warner HA, Code CF. Functional significance of gastric mucosal barrier to sodium. *Gastroenterology* 47:142-152, 1964.
5. Davenport HW. Ethanol damage to canine oxyntic glandular mucosa. *Proc Soc Exp Biol Med* 126:657-662, 1967.
6. Dayton MT, Kauffman GL, Schlegel JF, Code CF, Steinbach JH. Gastric bicarbonate appearance with ethanol ingestion. Mechanism and significance. *Dig Dis Sci* 28:449-455, 1983.
7. Sernka TJ, Gilleland CW, Shanbour LL. Effects of ethanol on active transport in the dog stomach. *Am J Physiol* 226:397-400, 1974.
8. Lenz HJ, Ferrari-Taylor J, Isenberg JL. Wine and five percent ethanol are potent stimulants of gastric acid secretion in humans. *Gastroenterology* 85:1082-1087, 1983.
9. Singer MV, Leffmann C, Eysselein VE, Calden H, Goebel H. Action

- of ethanol and some alcoholic beverages on gastric acid secretion and release of gastrin in humans. *Gastroenterology* 93:1247-1254, 1987.
10. Chacín J, Cárdenas P, Lobo P, Hernández I. Secretory and metabolic effects of ethanol in the isolated amphibian gastric mucosa. *Gastroenterology* 100:1288-1295, 1991.
11. Wolfe MM, Soll AH. The physiology of gastric acid secretion. *N Engl J Med* 319:1707-1715, 1988.
12. Chacín J, Prieto A, Cárdenas P. Substrate-level energy dependence of acid secretion in the isolated human gastric mucosa. *Gastroenterology* 89:525-531, 1985.
13. Shaw GP, Anderson NG, Hanson PJ. Metabolism and gastric acid secretion. Substrate-dependence of aminopyrine accumulation in isolated rat parietal cells. *Biochem J* 277:223-229, 1985.
14. Fryklund J, Gedda K, Scott D, Sachs G, Wallmark B. Coupling of H⁺-K⁺-ATPase activity and glucose oxidation in gastric glands. *Am J Physiol* 258:G719-G727, 1990.
15. Soll AH. Extracellular calcium and cholinergic stimulation of isolated canine parietal cells. *J Clin Invest* 68:270-278, 1981.
16. Muallem S, Sach G. Changes in cytosolic free Ca^{2+} in isolated parietal cells. Differential effects of secretagogues. *Biochim Biophys Acta* 805:181-185, 1984.
17. Chew CS, Brown MR. Release of intracellular Ca^{2+} and elevation of inositol triphosphate by secretagogues in parietal and chief cells isolated from rabbit gastric mucosa. *Biochim Biophys Acta* 888:116-125, 1986.
18. Chacín J, Cárdenas P, Lobo P, Subero O. Role of calcium in secretory and metabolic effects of substrates in the gastric mucosa. *Am J Physiol* 251:G161-G168, 1986.
19. Subero O, Lobo P, Chacín J. Ca^{2+} requirement for metabolic effects of secretagogues in the amphibian gastric mucosa. *Am J Physiol* 257:G969-G976, 1989.
20. Hernández I, Chacín J. Mechanism of cholinergic stimulation of glucose oxidation in isolated gastric glands. *Am J Physiol* 267:G227-G234, 1994.
21. Stomiany BL, Liu J, Kawai T, Czajkowski A, Stomiany A. Effect of ebrotidine on gastric mucosal calcium channel activity. *Am J Gastroenterol* 88:881-886, 1993.
22. Glavin GB. Calcium channel modulators: Effects on gastric function. *Eur J Pharmacol* 160:323-328, 1989.
23. Tepperman BL, Soper BD. Effect of extracellular Ca^{2+} on indomethacin-induced injury to rabbit dispersed gastric mucosal cells. *Can J Physiol Pharmacol* 72:63-69, 1994.
24. Koo MW, Cho CH, Ogle CW. Verapamil worsens the ethanol-induced gastric ulcers in rats. *Eur J Pharmacol* 120:350-355, 1986.
25. Glavin GB, Szabo S. Effects of the Ca^{2+} chelators EGTA and EDTA on ethanol- or stress-induced gastric mucosal lesions and gastric secretion. *Eur J Pharmacol* 233:269-273, 1993.
26. Kokosa ER, Smith GS, Deshpande Y, Wolf AB, Rieckenberg C, Miller TA. Calcium accentuates injury induced by ethanol in human gastric cells. *J Gastrointest Surg* 3:308-318, 1999.
27. Sernka TJ, Harris JB. Pentose phosphate shunt and gastric acid secretion in the rat. *Am J Physiol* 222:25-32, 1972.
28. Berglinth T, Dibona DF, Ito S, Sachs G. Probes of parietal cell function. *Am J Physiol* 238:G165-G176, 1980.
29. Aguilar-Delfín I, López-Barrera F, Hernández-Muñoz R. Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: Partial hepatectomy and acute CCl_4 administration. *Hepatology* 24:657-662, 1996.
30. Díaz-Muñoz M, Cañedo-Merino R, Gutiérrez-Salinas J, Hernández-Muñoz R. Modifications of intracellular calcium release channels and calcium mobilization following 70% hepatectomy. *Arch Biochem Biophys* 349:105-112, 1998.
31. Löhr GW, Waller HD. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU, Ed. *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd edition. New York: Weinheim and Academic Press, pp744-751, 1974.
32. King TE. Preparation of succinate dehydrogenase and reconstitution of succinate oxidase. *Methods Enzymol* 10:322-331, 1967.

33. Rafael J. Cytochrome c oxidase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Eds. *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 3. Weinheim, Germany: Verlag Chemie, pp266-273, 1983.
34. Gutiérrez-Salinas J, Miranda-Garduño L, Trejo-Izquierdo E, Díaz-Muñoz M, Vidrio S, Morales-González JA, Hernández-Muñoz R. Redox state and energy metabolism during liver regeneration. Alterations produced by acute ethanol administration. *Biochem Pharmacol* 58:1831-1839, 1999.
35. Wise EM, Ball EG. Malic enzyme and lipogenesis. *Biochemistry* 52:1255-1263, 1964.
36. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Chigoya de Sánchez V. Effects of adenosine administration on the function and membrane composition of liver mitochondria in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Arch Biochem Biophys* 294:160-167, 1992.
37. Caballera J, Baraona E, Lieber CS. The contribution of the stomach to ethanol oxidation in the rat. *Life Sci* 41:1021-1027, 1987.
38. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, López V, López-Barrera F, Yáñez L, Vidrio S, Aranda-Fraustro A, Chigoya de Sánchez V. Balance between oxidative damage and proliferative potential in an experimental rat model of CCl₄-induced cirrhosis: Protective role of adenosine administration. *Hepatology* 26:1100-1110, 1997.
39. Hersey SJ, Miller M, Oswirski A. Role of glucose metabolism in acid formation by isolated gastric glands. *Biochim Biophys Acta* 714:143-151, 1982.
40. Eysselein VE, Singer MV, Went H, Goebell H. Action of ethanol on gastrin release in the dog. *Dig Dis Sci* 29:12-18, 1984.
41. Klaassen CII, Swarts HP, De Pont JJ. Ethanol stimulates expression of functional H⁺K⁺-ATPase in SF9 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 210:907-913, 1995.
42. Schanne EA, Kane AB, Yonaw CH, Barber JL. Calcium dependence of toxic cell death. A final common pathway. *Science* 206:700-702, 1979.
43. Niki S, Rokutan K, Nakamura K, Ogihara S, Kutsumi H, Saitoh Y, Aoike A, Kawai K. Calcium-dependent signaling of acid secretion in isolated parietal cells from guinea pigs and its modification by ethanol. *Nipp Shok Gak Zas* 89:1484-1490, 1992.
44. McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* 70:391-425, 1990.
45. Chew CS. Cholecystokinin, carbachol, gastrin, histamine and foskolin increase [Ca²⁺]_i in gastric glands. *Am J Physiol* 250:G814-G823, 1986.
46. Arakawa T, Fukuda T, Kobayashi K, Tarnawski A. Prostaglandin-induced protection of cultured rat gastric cells against ethanol is inhibited by a microtubule inhibitor. *Digestion* 57:41-46, 1986.
47. Ghanayem BI, Matthews HB, Maronpot RR. Calcium channel blockers protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric lesions in rats. *Gastroenterology* 92:106-111, 1987.
48. Ostrowski J, Pesta J, Linnik D, Butruk E. The influence of calcium antagonists (verapamil, nifedipine, and MgCl₂) on rat gastric damage induced by ethanol *in vivo* and *in vitro*. *J Physiol Pharmacol* 44:273-281, 1993.
49. Takeuchi K, Nobuhara Y, Okabe S. Role of luminal Cu²⁺ on normal and damaged gastric mucosa in the rat. *Dig Dis Sci* 30:1072-1078, 1985.
50. Tague LL, Shanbour LL. Effects of ethanol on bicarbonate-stimulated ATPase, ATP and cyclic AMP in canine gastric mucosa. *Proc Soc Exp Biol Med* 154:37-40, 1977.
51. Cho C, Pfeiffer CJ, Misra HP. Ulcerogenic mechanism of ethanol and the action of sulphanilyl fluoride on the rat stomach *in vivo*. *J Pharm Pharmacol* 43:495-498, 1991.
52. Victor BE, Taegtmeier H, Miller TA. Gastric mucosal high-energy phosphate metabolism. Influence of ethanol and PEG₂. *Dig Dis Sci* 40:120-127, 1995.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN