



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

“Evaluación del efecto gastroprotector del DHA (ácido docosaheptaenoico) en el daño gástrico inducido por indometacina”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

P R E S E N T A:

PINEDA PEÑA ELIZABETH ARLEN

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ARACELY EVANGELINA CHÁVEZ PIÑA



México, D. F., Enero del 2013



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D.F. siendo las 10:00 horas del día 21 del mes de Enero del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMyH para examinar la tesis titulada:

"Evaluación del efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gástrico inducido por indometacina"

Presentada por el alumno:

Pineda Peña Elizabeth Arlen
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

A	1	1	0	0	0	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestra en Ciencias en Biomedicina Molecular

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dra. Aracely Evangelina Chávez Piña

Dra. en C. Cynthia Ordaz Pichardo

Dra. en C. Laurence A. Marchat
Marchat

Dra. en C. María Esther Ramírez
Moreno

Dra. en C. Nury Pérez Hernández



SECRETARÍA DE
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Dr. Cesar Augusto Sandoval Reyes López
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 23 del mes de Enero del año 2013, el (la) que suscribe Elizabeth Arlen Pineda Peña alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular, con número de registro A 1100026, adscrita a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. En C. Aracely Evangelina Chávez Piña y cede los derechos del trabajo titulado, Evaluación del efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gástrico inducido por indometacina al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones arlen.pineda@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Médico Cirujano y Homeópata
Elizabeth Arlen Pineda Peña

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por otorgarme una beca durante la realización de mis estudios de maestría en el Programa Institucional en Biomedicina Molecular, con número de becario: **252829**. También un agradecimiento al **Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI)** del IPN, esta tesis se realizó gracias al donativo del proyecto SIP con clave **20131753** y al proyecto CONACYT con clave **178027**.

A la **Dra. Aracely Evangelina Chávez Piña**, mi directora de tesis, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por brindarme respeto, tiempo, apoyo y confianza que recordaré siempre.

Al **Doctor Gilberto Castañea** por su valiosa guía, su tiempo y por el apoyo, consejos y asesoría que recibí en su laboratorio.

A mis asesores de tesis la **Dra. en C. Laurence A. Marchat Marchau**, la **Dra. en C. María Esther Ramírez Moreno**, la **Dra. en C. Nury Pérez Hernández** y la **Dra. en C. Cynthia Ordaz Pichardo** por el apoyo, consejos y asesoría para la realización de esta tesis.

Al personal técnico y alumnos del **Laboratorio 34** de la sección externa de Farmacología del CINVESTAV, por su valiosa ayuda, ejemplar disposición al trabajo, por sus palabras de aliento y por el apoyo dado durante el trabajo experimental.

Al personal técnico y alumnos del **Laboratorio de Biología Celular y Productos Naturales I** a cargo de la **Dra. en C. Cynthia Ordaz Pichardo** de la sección posgrado de la ENMyH por el apoyo dado durante el trabajo experimental de este proyecto, por sus consejos y asesoría.

Al personal técnico y alumnas del **Laboratorio de Hematobiología** a cargo de la **Dra. en C. Doris Cerecedo** de la sección posgrado de la ENMyH por su paciencia y generosidad para compartir sus experiencias de tipo profesional y personal que fueron de gran valor.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	I
ABSTRACT	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de Estómago.....	1
1.2 Elementos de la defensa mucosal	2
1.2.1 Papel de las prostaglandinas en la defensa mucosal	5
1.2.2 Otras moléculas que participan indirectamente en la defensa mucosal	7
1.3 Generalidades de los anti inflamatorios no esteroideos (AINES).....	7
1.3.1 Indometacina.....	9
1.3.2 Mecanismo de daño gástrico por indometacina	10
1.3.3 Moléculas implicadas en el daño gástrico generado por AINES	12
1.3.3.1 Leucotrieno B ₄ (LTB ₄)	12
1.3.3.2 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)	13
1.3.3.3 Interleucina 1 beta (IL-1 β)	15
1.4 Alternativas terapéuticas para reducir el daño gástrico generado por AINES.....	16
1.5 Ácido docosahexanoíco (DHA)	17
2. ANTECEDENTES	21
3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVO GENERAL	26
6. OBJETIVOS PARTICULARES	27
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28

8. MATERIALES Y MÉTODOS	29
8.1 Fármacos y Reactivos	29
8.2 Animales	30
8.3 Modelo de daño gástrico generado por indometacina.....	30
8.3.1 Evaluación del daño gástrico generado por la administración crónica de indometacina a diferentes dosis.	31
8.3.2 Evaluación del daño gástrico generado por la administración aguda de indometacina a diferentes dosis	31
8.4 Efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gástrico agudo inducido por indometacina en la rata.	31
8.4.1 Efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoico) frente al efecto gastroprotector del omeprazol en el daño gástrico agudo inducido por indometacina en la rata.	32
8.5 Cuantificación de los niveles de PGE ₂ y LTB ₄ en tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido indometacina.	32
8.6 Determinación de la expresión de TNF- α e IL-1 β por la técnica de Western blot.....	33
8.6.1 Obtención de extractos proteicos	33
8.6.2 Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford	34
8.6.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	34
8.6.4 Transferencia a membrana de nitrocelulosa.....	35
8.6.5 Bloqueo e incubación de la membrana con anticuerpos de interés.....	35
8.6.6 Revelado	37
8.6.7 Análisis densitométrico	37
8.7 Análisis Estadístico.....	37
9. RESULTADOS.....	38
9.1 Evaluación del daño gástrico generado por la administración crónica de indometacina a diferentes dosis	38
9.1.2 Evaluación del daño gástrico generado por la administración aguda de indometacina a diferentes dosis	39

9.2 Efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoíco) en el daño gástrico agudo inducido por indometacina en la rata	40
9.3 Efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoíco) frente al efecto gastroprotector del omeprazol en el daño gástrico agudo inducido por indometacina en la rata.....	42
9.4 Cuantificación de los niveles de PGE ₂ en tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido por indometacina.....	43
9.5 Cuantificación de los niveles de LTB ₄ en tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido por indometacina.....	44
9.6 Integridad de las proteínas totales del tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina.....	45
9.7 Determinación de la expresión de TNF- α por la técnica de Western blot en tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina.....	46
9.8 Determinación de la expresión de IL-1 β por la técnica de Western blot en tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina.....	48
10. DISCUSIÓN	50
11. CONCLUSIONES	60
12. PERSPECTIVAS.....	61
13. REFERENCIAS	62
13. ANEXOS.....	74
ANEXO I. Diagramas de metodología	74
ANEXO II. Soluciones y reactivos para técnica de Western blot.....	77

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Clasificación de los analgésicos anti inflamatorios no esteroideos (AINES)9

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

	Página
Diagrama 1. Diagrama 1. Estrategia metodológica general.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación de los elementos de la defensa mucosal	4
Figura 2. Esquema representativo de la biosíntesis de prostaglandinas	5
Figura 3. Estructura química de la indometacina.....	10
Figura 4. Estructura química del ácido docosahexaenoico.....	19
Figura 5. Imágenes de lesiones en cuerpo del estómago después del pre- tratamiento con DHA.....	41
Figura 6. Integridad del extracto de proteínas totales del tejido gástrico de rata con Tinción de Coomasie.....	45
Figura 7. Expresión de TNF- α en el tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina..	46
Figura 8. Expresión de IL-1 β en el tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina..	48

ÍNDICE DE GRAFICAS

	Página
Gráfica 1 . Daño gástrico inducido por la administración crónica de indometacina.....	38
Gráfica 2. Daño gástrico inducido por la administración aguda de indometacina.....	39
Gráfica 3. Efecto del DHA en el daño gástrico inducido por indometacina.....	40
Gráfica 4. Efecto gastroprotector de DHA y omeprazol en el daño gástrico por Indometacina.....	42
Gráfica 5. Niveles gástricos de PGE ₂ después del pre-tratamiento de DHA en el daño gástrico por indometacina.....	43
Gráfica 6. Niveles gástricos de LTB ₄ después del pre-tratamiento de DHA en el daño gástrico por indometacina.....	44
Gráfica 7. Niveles relativos de TNF- α / β actina después del pre- tratamiento con DHA en el daño gástrico por indometacina.....	47
Gráfica 8. Niveles relativos de IL-1 β / β actina después del pre-tratamiento con DHA en el daño gástrico por indometacina.....	49

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AChE	Acetilcolinesterasa
AINES	Anti inflamatorios no esteroideos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BSA	Albúmina sérica bovina
CD11	Clúster de diferenciación 11
CD18	Clúster de diferenciación 18
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
COX	Ciclooxigenasa o prostaglandina-endoperóxido sintasa
Coxib	Anti inflamatorios no esteroideos selectivos para COX-2
cPLA2	Enzima fosfolipasa A ₂
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DHA	Ácido docosahexaenoíco
ECL	Células similares a enterocromafines
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EOR	Enzima eicosanoide óxidoreductasa
HCl	Ácido clorhídrico
HRP	Peroxidasa de rábano
H ₂ S-NSAID	AINE liberador de sulfuro de hidrógeno

ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina 1 beta
INF- γ	Interferón gamma
kDa	Kilodalton
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LOX	Lipoxigenasas
LPS	Lipopolisacáridos
NO- NSAID	AINE liberador de óxido nítrico
ON	Óxido nítrico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Amortiguador de fosfato salino
PE	Fosfatidiletanolamina
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂	Prostaglandina F ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
p.o.	por vía oral

PS	Fosfatidilserina
PUFA n-3	Ácido graso poliinsaturados omega-3
RvD	Resolvinas de la serie D
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SNC	Sistema nervioso central
TACE	Enzima convertidora del TNF- α
TBS	Amortiguador de Tris salino
TLRs	Receptores de membrana tipo toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TXA ₂	Tromboxano A ₂

RESUMEN

Los anti inflamatorios no esteroideos AINES, entre ellos la indometacina, constituyen uno de los grupo de fármacos empleados frecuentemente en todo el mundo por sus propiedades analgésicas, anti inflamatorias y antipiréticas; sin embargo, se ha reportado ampliamente que estos fármacos producen importantes efectos secundarios en el tracto gastrointestinal, que incluyen desde erosiones hasta sangrado y perforación gástrica, dicho evento limita su uso. Los mecanismos por los cuales la indometacina puede alterar el equilibrio de la mucosa se dividen en acciones locales y sistémicas; las locales involucran la necrosis del epitelio secundaria a la lisis osmótica, mientras que sistémicamente se atribuye a la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas (COX), así como la subsecuente supresión de las prostaglandinas como las principales causantes del daño gástrico. Sin embargo, se han identificado otros mecanismos relacionados con el daño gástrico como la adherencia de leucocitos al endotelio vascular que es mediado principalmente por $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y LTB_4 . Hasta el momento, las estrategias para reducir el daño gástrico más utilizadas son la coterapia con otro tipo de agentes, entre ellos los antagonistas de receptores de histamina H_2 como la ranitidina o los inhibidores de la bomba de protones como el omeprazol; sin embargo estas coterapias no han logrado una disminución significativa de los efectos adversos de los AINES, por lo que surge la necesidad de diseñar e investigar nuevas alternativas terapéuticas.

Estudios previos en diversos modelos de daño gástrico han reportado los beneficios del aceite de pescado como gastroprotector. En consecuencia a su variada composición, las investigaciones en este campo, no han podido determinar cuál de todos los ácidos grasos poliinsaturados es el responsable del efecto gastroprotector y por lo tanto determinar con certeza el mecanismo de acción; sin embargo los mecanismos propuestos a través de los cuales se ejerce este efecto gastroprotector son la capacidad de disminuir la secreción de ácido, así como la modulación de prostanoides y otras moléculas implicadas en el proceso de inflamación del tejido gástrico. El ácido docosahexanoíco [22:6n-3, DHA] es

un ácido graso poliinsaturados omega-3 (PUFA n-3) que forma parte del aceite de pescado en una composición que varía entre un 6 a 12 % dependiendo de su origen; el DHA ha demostrado en diversas investigaciones poseer propiedades anti inflamatorias y citoprotectoras, aunque los detalles de su acción e interacción a nivel molecular no se han elucidado.

Debido a lo anterior, el objetivo de la investigación fue determinar el efecto gastroprotector del DHA (a dosis 3, 10, 30 mg/kg, p.o.) en un modelo de lesión gástrica inducida por indometacina (a dosis 30 mg/kg, p.o.) en rata Wistar; así como determinar la participación de PGE_2 y LTB_4 y la expresión de $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$ en el posible mecanismo gastroprotector ejercido por el DHA. Para ello, la evaluación del efecto gastroprotector se efectúa en ratas Wistar a las que se les administra 2 horas antes DHA (a dosis 3, 10, 30 mg/kg, p.o.) y posteriormente se les genera daño gástrico a través de la administración vía oral de indometacina (a dosis 3, 10, 30 mg/kg), evaluando macroscópicamente el área de las lesiones gástricas en mm^2 , 3 horas después de su administración. También, se recolectaron muestras de tejido en las cuales se cuantificaron los niveles de PGE_2 y LTB_4 por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas y se determinó la expresión de $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$ por medio de las técnicas de Western blot.

Los resultados obtenidos, muestran que el DHA ejerce un efecto protector dosis dependiente contra el daño gástrico inducido por indometacina y este efecto fue comparable con el efecto gastroprotector de omeprazol; además, el DHA no revierte la reducción de PGE_2 , ni el aumento de $IL-1\beta$ en tejido gástrico inducidos por indometacina; sin embargo, restablece los niveles gástricos basales de LTB_4 y $TNF-\alpha$ aun ante la administración de indometacina, lo que permite concluir que el mecanismo gastroprotector del DHA involucra la modulación de los niveles de LTB_4 y $TNF-\alpha$ y por lo tanto la adherencia e infiltración de leucocitos al sitio de lesión en la mucosa gástrica.

ABSTRACT

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), including indomethacin, is one of the group of drugs most worldwide used for its analgesic, anti-inflammatory and antipyretic actions, though has been widely reported significant side effects in the gastrointestinal tract, ranging from erosion to gastric bleeding and perforation. The mechanisms by which the indomethacin may alter the balance of the mucosa, are divided into local and systemic activities, involving the local epithelial necrosis secondary to osmotic lysis, whereas systemically attributed to inhibition of cyclooxygenase enzymes (COX) and subsequent removal of prostaglandins as the main cause of gastric damage, however, other mechanisms have been identified related gastric damage and adherence of leukocytes to vascular endothelium that is mediated mainly TNF- α , IL-1 β and LTB₄. Until now, strategies to reduce the gastric injury most commonly used are the co-therapy with other agents including H₂ receptor antagonists such as ranitidine or inhibitors of the proton pump such as omeprazole, however these co-therapies have failed to produce a significant reduction of the adverse effects of NSAIDs, so increases the importance of designing and researching new therapeutic alternatives.

Previous studies have reported the benefits of fish oil as gastroprotective in different models of gastric damage. As a result of its varied composition, research in this field, have been unable to determine which of the polyunsaturated fatty acids is responsible for the gastroprotective effect and therefore determine with certainty the mechanism of action, but the mechanisms proposed by which exerts this effect is the capacity for reduce acid secretion and modulation of the prostanoids and other molecules involved in the inflammation process gastric tissue. Docosahexaenoic acid [22:6 n-3, DHA] is a polyunsaturated fatty acid omega-3 (PUFA n-3) which forms part of the fish oil in a composition ranges from 6 to 12% depending on their origin, the DHA has been shown in several studies to possess anti-inflammatory and cytoprotective properties, although the details of their action and interaction at the molecular level have not been elucidated.

Due to the above, the aim of the investigation was to determine the gastroprotective effect of DHA (in doses 3, 10, 30 mg/kg, p.o.) in a model of indomethacin-induced gastric lesion (a dose 30 mg/kg, p.o.) in rat as well as determine the involvement of PGE₂ and LTB₄ and the expression of TNF- α and IL-1 β in the possible gastroprotective mechanism exerted by DHA. For this. The gastroprotective effect evaluation is performed in Wistar rats which were administered 2 hours prior DHA (in doses 3, 10, 30 mg/kg, p.o.) and subsequently generates gastric damage them through oral administration of indomethacin (at doses 3, 10, 30 mg/kg), and 3 hours after administration was evaluated macroscopically the area of gastric lesions in mm². Also, tissue samples were collected in which the levels of LTB₄ and PGE₂ were quantified by linked immunosorbent assay enzymes; and the expression of TNF- α and IL-1 β were determined by Western blot techniques.

The results show that DHA has a dose dependent protective effect against the indomethacin-induced gastric damage and this effect was comparable with the gastroprotective effect of omeprazole, in addition, DHA does not reverse PGE₂ reduction or the increase of IL-1 β on indomethacin-induced gastric tissue, but it resets gastric basal levels of LTB₄ and TNF- α even before the administration of indomethacin, which allows concluding that the gastroprotective mechanism of DHA involves modulation of LTB₄ and TNF- α levels and therefore adhesion and infiltration of leukocytes to the site of injury in the gastric mucosa.

1. INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal está continuamente expuesto a diversas sustancias y factores agresivos como: pH del estómago, temperatura, fármacos y agentes bacterianos que son capaces de causar reacciones inflamatorias locales y sistémicas que en su conjunto dañan la mucosa (Laine et al., 2008). En condiciones normales existe un proceso clave y dinámico denominado defensa de la mucosa gástrica, el cual involucra a todos los componentes que hacen frente a los factores dañinos de la misma, logrando mantener su integridad (Wallace y Granger, 1996). Mientras que, el daño gástrico es la lesión de la mucosa gástrica que ocurre cuando los factores agresores sobrepasan la capacidad de los componentes de defensa (Wallace, 2008). Entre estos factores agresores se encuentran principalmente los anti inflamatorios no esteroideos (AINES), que son fármacos con efecto analgésico, anti inflamatorio y antipirético de prescripción frecuente.

Los AINES convencionales como la indometacina, tienen la capacidad de inhibir a las ciclooxigenasas (COX) involucradas en la síntesis de prostaglandinas, las cuales participan en la citoprotección gástrica y amplifican la señal inflamatoria, este hecho ha originado la búsqueda de nuevos agentes para reducir los efectos secundarios asociados a los AINES y que mantengan su eficacia terapéutica (Laine et al., 2008; Wallace, 2008).

1.1 Generalidades de Estómago

El estómago es una víscera hueca situado en las regiones epigástrica, umbilical e hipocondrio izquierdo del abdomen; su posición puede modificarse por el estado del proceso digestivo, cantidad de contenido gástrico, el desarrollo muscular del mismo y por las condiciones de los intestinos adyacentes (Drake et al., 2007). En un adulto sano mide en promedio 25 centímetros de longitud, 12 centímetros de ancho y 8 centímetros de espesor; teniendo como capacidad promedio 1300 centímetros cúbicos (Drake et al., 2007). En su estructura, la pared del estómago está conformada por cuatro capas: Capa serosa (túnica serosa), capa muscular (túnica muscularis), capa submucosa (lámina propia) y capa mucosa

(túnica mucosa); esta última de color rosado en el extremo pilórico y ligero marrón rojizo sobre el resto de su superficie, la cual es lisa, suave y aterciopelada, siendo más gruesa hacia el píloro (Geneser et al., 2005).

En su mayoría la membrana mucosa está ocupada por glándulas tubulares simples, que poseen una membrana basal de células endoteliales revestidas de células epiteliales; dichas glándulas son diferentes dependiendo de su ubicación en las distintas partes del estómago ya que pueden ser de tres tipos: Cardiales, pilóricas y oxínticas. Las glándulas cardiales, en menor número se encuentran alrededor del cardias y a través de sus células epiteliales secretan mucus; las glándulas pilóricas se encuentran en la porción cercana al píloro, están compuestas de dos a tres tubos cortos que se abren en un conducto común, además de las células epiteliales que secretan mucus, también contienen células G encargadas de producir gastrina, células D productoras de somatostatina y células similares a las enterocromafines (ECL) que secretan histamina; por último, las glándulas oxínticas se encuentran en el cuerpo y el fondo del estómago, estando formadas por dos o más tubos simples que desembocan en un solo conducto, en ellas se encuentran las células principales encargadas de secretar pepsinógeno, las células parietales quienes secretan ácido clorhídrico (HCl) y factor intrínseco, células mucosas del cuello, células enteroendocrinas y células madre pluripotenciales (Wallace y Granger, 1996; Geneser et al., 2005).

1.2 Elementos de la defensa mucosal

El estómago es un órgano encargado de la digestión, esterilización de alimentos y agua, lo cual realiza a través de las células especializadas de su epitelio que le permiten alcanzar en su interior un pH de 1.2 durante este proceso digestivo (Kopic et al., 2009). Para que la mucosa gástrica pueda mantener su integridad, se ha propuesto la existencia de componentes con la propiedad de prevenir dicho daño, así como la capacidad de reparar su epitelio de forma rápida por lo que se han denominado elementos de la defensa mucosal, quienes generan constantemente un equilibrio entre factores agresores y protectores

(Wallace y Granger, 1996; Kopic et al., 2009). Los componentes de la defensa mucosal se pueden jerarquizar acorde a su organización anatómica (Figura 1), teniendo en los primeros niveles los factores secretados hacia la luz, el primero de ellos es el ácido clorhídrico (HCl), secretado por las células parietales localizadas en las glándulas oxínticas, que permite la actividad de la enzima pepsina, sirviendo además como bactericida ya que minimiza la colonización bacteriana del estómago (Wallace y Granger, 1996). El segundo factor secretado hacia la luz intestinal es el mucus formado por unidades de mucina MUC5 y MUC6 en seres humanos, que sirve principalmente como un lubricante ante los movimientos gástricos aunque también como bacteriostático al restringir el movimiento de las bacterias por la mucosa, existiendo también una mínima cantidad de fosfolípidos surfactantes que tienen propiedades hidrofóbicas (Allen y Flemström, 2005; Laine et al., 2008). El tercer componente secretado hacia la luz es el bicarbonato (HCO_3^-) que a través de la acción de bombas y cotransportadores sale de la célula, difundiendo a través de la capa de mucus y junto con este conforma una “barrera mucus-bicarbonato”, cuya función es formar un gradiente de pH para neutralizar la difusión de HCl con lo que el pH en la superficie de las células epiteliales es neutro, además previene que la pepsina entre en contacto con el epitelio (Wallace y Granger, 1996; Allen y Flemström, 2005; Laine et al., 2008).

El siguiente nivel de defensa lo conforman las células epiteliales cilíndricas simples que, debido a sus uniones intercelulares (tipo Gap) funcionan como una barrera física a los agentes exógenos nocivos; también posee la cualidad de regenerarse continuamente gracias al flujo sanguíneo constante en su membrana basal, participando en dicha regeneración la formación de una capa mucoide (constituida por restos celulares, moco y plasma) que proporciona un microambiente favorable para la restitución epitelial en caso de lesión (Wallace y Granger, 1996; Iwata et al., 1998).

En otro nivel se encuentra la micro circulación formada por extensa red de capilares distribuidos en la lámina propia, y que se encarga del transporte de nutrientes y oxígeno a las células, permitiendo el flujo de HCO_3^- en un proceso conocido como “marea alcalina”;

además, la existencia de una inervación sensorial aferente modulada por el sistema nervioso le permite la modificación del flujo sanguíneo; debido a que, ante un estímulo irritante se libera péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) estimulando la producción de óxido nítrico (ON), el cual difunde hacia el musculo liso de la pared vascular, causando su relajación y por lo tanto la vasodilatación lo que permite disipar las sustancias irritantes del sitio de lesión (Wallace y Granger, 1996). El último nivel de defensa mucosal lo conforman los mastocitos adheridos a la fibronectina, vitronectina y laminina presentes en la lámina propia, que interactúan constantemente con las células endoteliales y actúan como sensores ante un estímulo nocivo, siendo capaces de liberar histamina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina-1beta (IL-1 β), entre otros mediadores de la inflamación, permitiendo el reclutamiento de otras células efectoras como los leucocitos que se encargan de montar la respuesta inflamatoria a través de la secreción de leucotrieno B₄ (LTB₄) (Wallace y Granger, 1996; Cruvinel et al., 2010). Finalmente, existen otras moléculas que participan en este proceso de defensa, como es el caso de las prostaglandinas, quienes tienen la capacidad de mediar algunos elementos de la defensa y por lo tanto intervienen de manera activa en este proceso (Wallace y Ma, 2001).

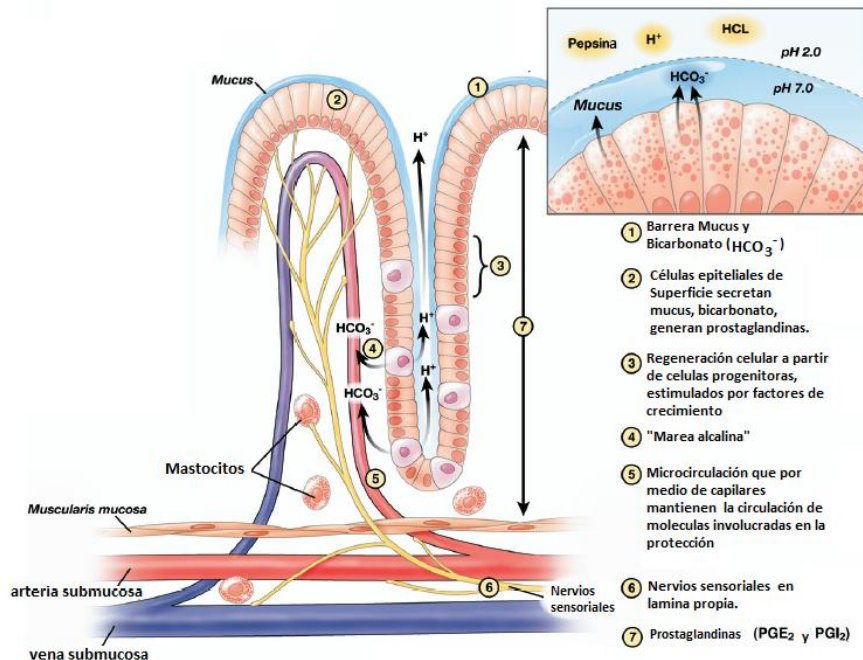


Figura 1. Representación de los elementos de la defensa mucosal. Fuente: Laine, et al., 2008.

1.2.1 Papel de las prostaglandinas en la defensa mucosal

Las prostaglandinas son miembros de una familia de ácidos grasos de 20 carbonos denominados eicosanoides, en su síntesis se emplea como sustrato al ácido araquidónico (ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoico) el cual se des-esterifica a partir de los fosfolípidos en la membrana celular (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol) por acción de la enzima fosfolipasa A₂ (cPLA₂) en respuesta a estímulos hormonales, neuronales y locales (Johansson y Bergström, 1982; Atay et al., 2000). El ácido araquidónico liberado puede ser metabolizado por el citocromo P-450 generando epoxi y omega derivados, también por la vía de las lipooxigenasas (LOX) generando leucotrienos, lipoxinas y ácidos grasos hidroxilados o por la vía de las ciclooxygenasas (COX) generando tromboxano y prostaglandinas, siendo estas últimas de nuestro interés debido a su acción en el tracto gastrointestinal (Johansson y Bergström, 1982; Atay et al., 2000; Martin y Wallace, 2006).

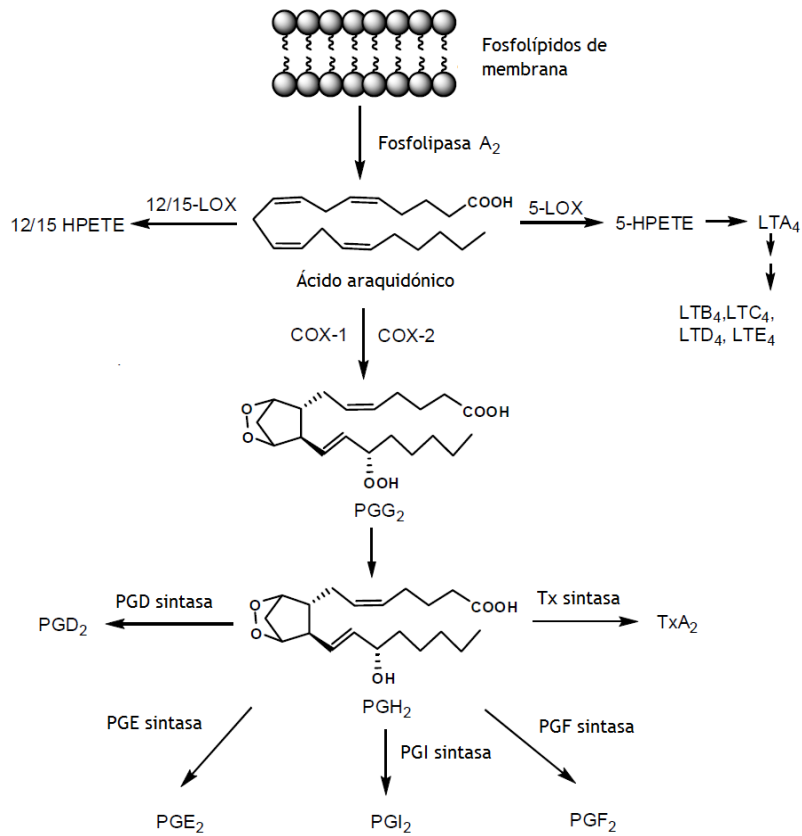


Figura 2. Esquema representativo de la biosíntesis de prostaglandinas. Fuente: Rao y Knaus, 2008.

La enzima ciclooxigenasa (prostaglandina-endoperóxido sintasa) tiene dos isoformas denominadas COX-1 y COX-2; dichas enzimas convierten el ácido araquidónico a prostaglandina G_2 mediante la inserción de dos moléculas de oxígeno y la posterior reducción de este intermediario a prostaglandina H_2 , que finalmente puede ser convertido en prostaglandina D_2 (PGD_2), prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), prostaciclina (PGI_2) y tromboxano A_2 (TXA_2) (Rao y Knaus, 2008).

En la mucosa gástrica la acción de la COX-1 produce de manera constitutiva PGE_2 y PGI_2 ; siendo PGE_2 a través de su receptor EP3 el que inhibe la secreción de HCl en las células parietales por la disminución de AMPc; mientras que en células epiteliales permite la secreción de moco y bicarbonato a través del receptor EP1, también pueden reducir la permeabilidad del epitelio y disminuir la retrodifusión ácida (Aihara et al., 2005; Kato et al., 2005; Takeuchi et al., 2010). Por otro lado PGI_2 en la micro circulación sirve como un potente vasodilatador, que a través de sus receptores IP incrementa el flujo sanguíneo en mucosa previniendo el daño por isquemia; por lo tanto, la producción de prostaglandinas de manera fisiológica por parte de la mucosa gástrica, es crucial ya que la mayoría de los mecanismos de defensa son estimulados o facilitados por ellas (Narumiya et al., 1999; Martin y Wallace, 2006; Laine et al., 2008; Wallace, 2008). Se ha reportado que la COX-1 es producida de manera constante en la mucosa, mientras que la COX-2 solo es detectada en presencia de estímulos inflamatorios; sin embargo ha sido ampliamente reportado que ambas enzimas son necesarias para la protección de la mucosa, ya que experimentalmente al inhibir las dos isoformas se produce daño gástrico considerable que no es producido al inhibirlas por separado (Atay et al., 2000; Wallace et al., 2000).

Una vez que ha ocurrido la lesión de la mucosa, otro de los mecanismos a través de los cuales las prostaglandinas reducen la severidad del daño gástrico es la modulación de las células inmunológicas en la mucosa, en donde la PGE_2 inhibe la activación de mastocitos y la adherencia de leucocitos al endotelio vascular, además de modular la liberación de

diversos mediadores de la inflamación, entre los que se encuentra TNF- α e IL-1 β , así como participar en el proceso de reparación de la mucosa (Wallace y Ma, 2001).

1.2.2 Otras moléculas que participan indirectamente en la defensa mucosal

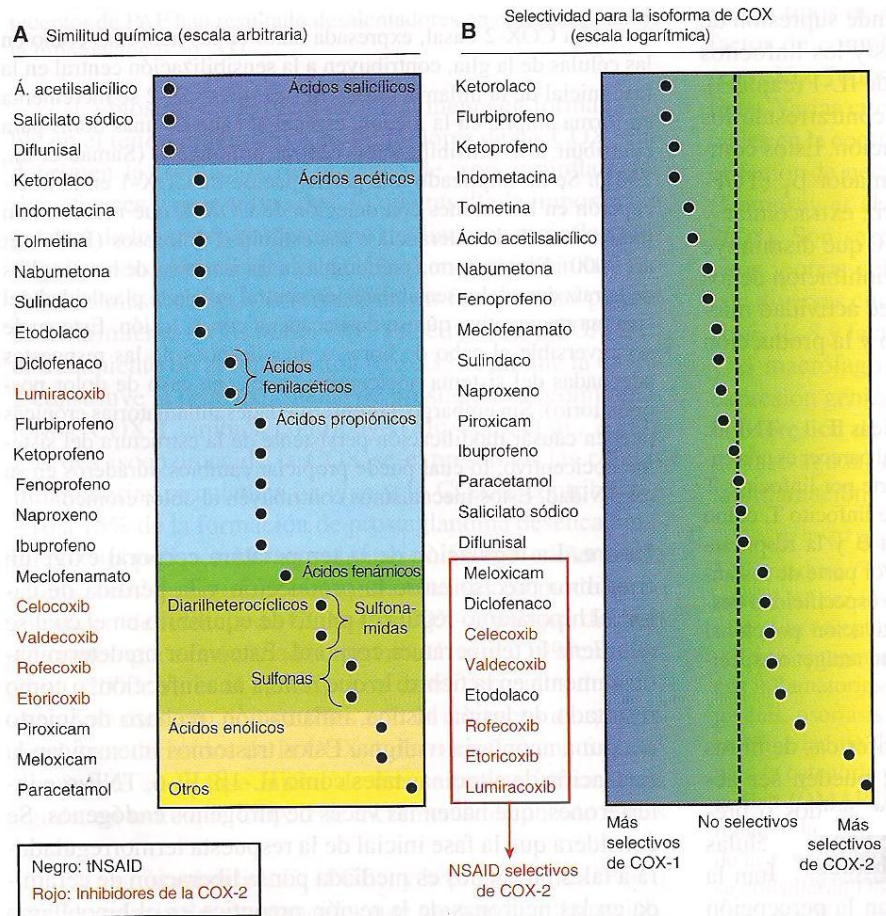
Existen otras moléculas que participan indirectamente en la defensa de la mucosa como lo es el óxido nítrico (ON), sintetizado durante la conversión de L- arginina a dosis equimolares de L-citrulina y ON. A nivel gastrointestinal, las enzimas óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) permiten la expresión basal de ON, el cual activa a la enzima guanilato ciclasa citosólica aumentando la concentración de GMP cíclico lo que conduce a una relajación del musculo liso vascular y por ende un aumento del flujo sanguíneo gástrico, contribuyendo a la rápida regeneración de úlceras (Lanas, 2008). Además se ha reportado que el ON activa la síntesis de PGI₂ y en ciertas condiciones media la secreción de mucus e inhibe la secreción de HCl, además de participar en la protección ante el daño gástrico ocasionado por etanol, lo que ha permitido el diseño de fármacos liberadores de ON (Chen et al., 2008; Lanas, 2008; Medeiros et al., 2008). Sin embargo, existen discrepancias en la concentración a la cual el ON participa como gastroprotector y la concentración a la cual el ON contribuye a la lesión de la mucosa durante procesos inflamatorios (Martin y Wallace, 2006; Chen et al., 2008).

1.3 Generalidades de los anti inflamatorios no esteroideos (AINES)

En la clínica, existen fármacos utilizados ampliamente en los procesos inflamatorios, que recientemente se han asociado con el daño a la mucosa gástrica. Un ejemplo de ellos son los anti inflamatorios no esteroideos (AINES), que son un grupo de fármacos químicamente heterogéneos y que comparten determinados efectos terapéuticos como las acciones analgésicas, anti inflamatorias y antipiréticas; pueden clasificarse acorde a su similitud química y según su selectividad para la isoforma de ciclooxigenasa (Cuadro 1), siendo esta última clasificación la que resulta más útil para nuestra investigación (Brunton y Chabner,

2012). Su mecanismo de acción se genera principalmente a partir de la inhibición competitiva y reversible (en la mayoría de los casos) del sitio activo de las enzimas ciclooxigenasa COX-1 y COX-2, por lo que interfieren con la respuesta inflamatoria normal y disminuyen la producción de prostaglandinas (Rao y Knaus, 2008). En la clínica, las aplicaciones terapéuticas de los AINES incluyen desde el tratamiento de patologías crónicas como osteoartritis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante y gota hasta el tratamiento de patologías frecuentes como la dismenorrea, dolor dental y dolor de cabeza, constituyendo uno de los grupos de fármacos más prescritos en el mundo (Becker et al., 2004; Fiorucci et al., 2007).

Por otra parte, el uso de AINES se ha asociado con efectos gastrointestinales ya que se han reportado erosiones, hemorragias e incluso ulceraciones gástricas en el 30 -75 % de los pacientes que están bajo tratamiento con AINES (Badd, 1992; Becker et al., 2004). Debido a lo anterior, se logró la síntesis y el uso de inhibidores selectivos para COX-2 (Coxibs) que presentaron una disminución en el daño gástrico; sin embargo, al inhibir la síntesis de PGI₂ (con acción anti- trombótica) por parte de la COX-2, pero no inhibir a la COX-1 encargada de la síntesis del TXA₂ (con acción pro-trombótica) en plaquetas, alteran el equilibrio natural existente entre ambos efectos conduciendo a un aumento en los eventos trombótico cardiovasculares en pacientes que ingieren de manera crónica los AINES selectivos para la COX-2 (Watson et al., 2000; Whelton et al., 2006; Fiorucci et al., 2007; Süleyman et al., 2007). Siendo celecoxib uno de los coxibs que demostró no presentar alta incidencia en los efectos cardiovasculares, debido a que no interfiere significativamente con la función plaquetaria y presentar una incidencia más baja que la relacionada con el uso de otros AINES tradicionales como el diclofenaco y el ibuprofeno (Whelton et al., 2006; Süleyman et al., 2007).



Cuadro 1. Clasificación de los analgésicos anti inflamatorios no esteroideos (AINES) por similitud química (A) y por su selectividad para la isoforma de COX (B). Fuente: Brunton y Chabner, 2012.

1.3.1 Indometacina

Indometacina [2-[1-(4-clorobenzoil)- 5-metoxi-2-metilindol-3-il] ácido acético] (Figura 3) es derivado del ácido indolacético que pertenece al grupo de los AINES no selectivos, ha estado disponible en el mercado desde principios de 1960 y se ha convertido en uno de los AINES más utilizados (Burke et al., 1983; Waller, 1983). Sus concentraciones máximas en plasma se alcanzan de 1 a 2 h (Tmax) después de la administración oral, la unión a proteínas plasmáticas es de 90% y no tiene selectividad por un tejido particular; la concentración máxima en plasma (Cmax) presenta variabilidad inter e intra individual siendo considerada 1 µg/ml la concentración terapéutica y tóxica a partir de 6 µg/ml

(Waller, 1983). Se metaboliza en hígado por O-desmetilación (50%), conjugación con ácido glucorónico (~10%) y N-desacilación a metabolitos inactivos; entre el 10 a 15 % de fármaco sin modificar se excreta por orina y sus metabolitos también se eliminan por bilis y heces siendo capaces de experimentar un ciclo enterohepático; la vida media ($t_{1/2}$) en plasma es variable con un promedio de 2 h 30 min. Sus aplicaciones terapéuticas, incluyen el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, osteoartritis, bursitis, tendinitis, sinovitis traumática, espondilitis anquilosante y como tratamiento para el cierre del conducto arterioso persistente en lactantes prematuros; para enfermedades osteoarticulares crónicas suelen emplearse dosis de 25 hasta 100 mg al día (Polat et al., 2010; Brunton y Chabner, 2012).

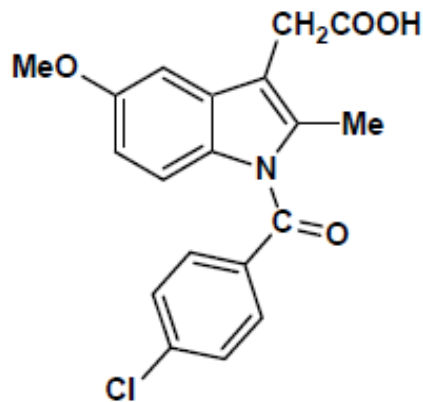


Figura 3. Estructura química de la indometacina. Fuente: Rao y Knaus, 2008.

1.3.2 Mecanismo de daño gástrico por indometacina

El uso de indometacina también se encuentra asociado a complicaciones del tracto gastrointestinal tales como hemorragias y úlceras, tanto a corto como a largo plazo (Tanaka et al., 2002). Autores como Suwa et al., en 1987 reportaron que causa mayor daño gástrico en menores dosis que otros AINES en modelos animales, por lo que ha sido empleada desde entonces para inducir daño gástrico (Suwa et al., 1987; Wallace et al., 2000). La indometacina al igual que todos los AINES, pueden alterar el equilibrio de la mucosa a través de mecanismos que se dividen en acciones locales y sistémicas (Wallace et al., 2000; Wallace, 2006). Los efectos locales involucran la necrosis del epitelio secundaria a la lisis

osmótica, mientras que sistémicamente al suprimir la síntesis de prostaglandinas reducen la secreción de moco y bicarbonato, además disminuyen el flujo sanguíneo haciendo a la mucosa más susceptible a los agentes agresores, invasión bacteriana y actividad de endotoxinas (Bastaki y Wallace, 1999; Wallace et al., 2000; Wallace, 2006; Wallace, 2008).

Además de la inhibición de las COXs, se han identificado otros mecanismos relacionados con el daño gástrico generado por AINES, que al atravesar fácilmente la membrana plasmática se ionizan perdiendo su liposolubilidad, comenzando a acumularse dentro del ambiente neutro de las células; presentando efectos en mitocondria donde desacoplan la fosforilación oxidativa causando un decremento de ATP, generación de especies reactivas a oxígeno (ROS) y liberación de calcio mitocondrial (Ca^{2+}) lo que conduce a un desbalance osmótico junto con la pérdida de control sobre las uniones celulares, que finalmente da como resultado el aumento de la permeabilidad y un daño estructural (Leite et al., 2001; Maity et al., 2009; Matsui et al., 2011).

Cuando por el efecto irritante local de la indometacina o por el efecto de los agentes agresores de la mucosa, los mecanismos de protección se ven sobrepasados, se origina necrosis del epitelio gástrico, acompañado de la excreción del contenido intracelular hacia el intersticio (Wallace y Granger, 1996; Lanas, 2008). Este hecho, estimula al mastocito a liberar moléculas proinflamatorias como las citocinas (entre ellas $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$), que pueden afectar la síntesis de prostaglandinas a través de la modulación de la actividad de COX y, aunque el mecanismo no ha sido claramente reportado, las prostaglandinas son parcialmente responsables de la liberación de las citocinas, debido a que su regulación es un proceso complejo que involucra a diversas moléculas, esto por su naturaleza pleiotrópica (Wallace y Granger, 1996; Atay et al., 2000). La expresión de citocinas, desencadena el reclutamiento masivo de neutrófilos en un proceso de extravasación que consiste en la marginación, rodadura, adhesión, diapédesis y migración del leucocito desde el endotelio vascular hacia los tejidos y que es totalmente dependiente de la expresión de moléculas de adhesión de alta afinidad en el endotelio como ICAM-1 e integrinas CD11/ CD18 en

leucocito (Wallace y Granger, 1996; Uchida et al., 2001; Laine et al., 2008; Wallace, 2008; Cruvinel et al., 2010; Matsui et al., 2010). Una vez que el leucocito llega al sitio de lesión libera leucotrieno B₄ (LTB₄) que funciona como un quimioatrayente para más leucocitos, los cuales se adhieren a pared del vaso y disminuyen la perfusión vascular provocando isquemia en el tejido; además los leucocitos liberan proteasas y permiten la liberación de óxido nítrico mediado por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), este óxido nítrico reacciona con los aniones superóxido producido también por neutrófilos, formando peroxinitrito que provoca mayor necrosis epitelial (Wallace y Granger, 1996; Uchida et al., 2001; Lanas, 2008; Wallace, 2008; Cruvinel et al., 2010; Matsui et al., 2011).

1.3.3 Moléculas implicadas en el daño gástrico generado por AINES

Como se ha mencionado anteriormente, existen diversas moléculas implicadas en el daño gástrico generado por AINES, cada una posee características particulares que son importantes de revisar, siendo LTB₄, TNF- α e IL-1 β las que generan mayor interés en nuestra investigación.

1.3.3.1 Leucotrieno B₄ (LTB₄)

El leucotrieno B₄ (LTB₄) es un eicosanoide que forma parte de la familia de los leucotrienos; es un mediador proinflamatorio de naturaleza lipídica, se sintetiza rápidamente a partir de los fosfolípidos de membrana principalmente en las células inmunes, después de un estímulo por daño mecánico, alérgenos, citocinas y factores de crecimiento (Ohnishi et al., 2008). La lipooxigenasa 5 (5-LO) ya activa, convierte el ácido araquidónico producido por la cPLA₂ en ácido 5-hidroxi-peroxieicosatetraenoico (5-HPETE) y después al intermediario leucotrieno A₄ (LTA₄), que finalmente es hidrolizado por la leucotrieno A₄ hidrolasa, produciendo el LTB₄ (Atay et al., 2000; Ohnishi et al., 2008). El LTB₄ se genera en polimorfonucleares, eosinófilos, macrófagos, células epiteliales y

endoteliales, actuando a través de receptores de alta afinidad como el BLT1 en dichas células; se inactiva a través de la degradación, por ω -oxidación microsomal y por la β -oxidación mitocondrial (Monteiro et al., 2011). Está relacionado con enfermedades como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, conjuntivitis alérgica, artritis reumatoide y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Atay et al., 2000; Ohnishi et al., 2008; Monteiro et al., 2011).

El papel de los leucotrienos en la mucosa gástrica ha sido extensamente estudiado, se ha reportado que de forma general estimulan la secreción de pepsina, reducen el flujo sanguíneo e interfieren con el vaciamiento gástrico (Wallace y Granger, 1996; Atay et al., 2000). En el daño gástrico inducido por AINES como la indometacina, el LTB₄ estimula la síntesis de enzimas pro inflamatorias como TNF- α e IFN- γ ; también permite la expresión de moléculas como las integrinas β 2 (CD11/ CD 18) que promueven la adherencia del leucocito al vaso, con lo que contribuye a la reducción del flujo sanguíneo y además, participan en la generación de otras moléculas que alteran al endotelio vascular y a la mucosa gástrica como las especies reactivas a oxígeno (ROS) (Wallace y Granger, 1996; Davies y Wallace, 1997; Wallace et al., 2001). Por lo anterior, el exceso de LTB₄ combinado con el déficit de PGE₂ contribuye a la lesión gástrica ya provocada por los AINES (Atay et al., 2000; Wallace, 2001).

1.3.3.2 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) es una hormona polipeptídica, perteneciente a la super familia de mediadores que llevan su nombre, incluyendo al menos 15 citoquinas pro inflamatorias (Camussi et al., 1991). En cuanto a su conformación proteica es una glicoproteína que se produce *de novo* en el momento de la activación celular, se sintetiza como un propéptido (de 233 aa y 26 kDa) que se encuentra en la superficie de la membrana celular, el cual es procesado por cortes en el residuo 76 por acción de la enzima convertidora del TNF- α (TACE) a la forma soluble de TNF- α (de 157 aa y 17 kDa) y que tiene actividad biológica (Camussi et al., 1991; Newton y Decicco, 1999).

Su producción es inducida por virus, parásitos, bacterias, células tumorales, isquemia, trauma e irradiación, así como por citoquinas tales como interferón Gamma (IFN- γ), factor activador de plaquetas (PAF) y el mismo TNF- α (Camussi et al., 1991). Es secretada principalmente por células del sistema inmune, tales como los monocitos, macrófagos, neutrófilos y células natural killer; aunque, también existen reportes de que puede ser producido por otras células tales como astrocitos, células kuppfer, microglías, miocitos, osteoblastos, fibroblastos y células endoteliales bajo ciertas circunstancias (Camussi et al., 1991; Korzekwa et al., 2011). El efecto pleiotrópico del TNF- α tiene como resultado la síntesis de citocinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- γ), siendo estos mediadores los que actúan a su vez como inhibidores de su expresión, tales como IL-6, IL-10, PGE₂ y el cortisol (Kunkel et al., 1986; Camussi et al., 1991). Debido a su acción proinflamatoria, se ha considerado que el TNF- α desempeña un papel importante en muchos trastornos inflamatorios crónicos, incluyendo artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, vasculitis sistémica, rechazos a los injertos, entre otros (Camussi et al., 1991; Newton y Decicco, 1999).

TNF- α posee una actividad biológica en adipocitos y hepatocitos, donde provoca catabolismo, lipólisis y glucogenólisis; en el daño gástrico generado por AINES, produce un incremento de adherencia de leucocitos al endotelio vascular, por un proceso definido como “activación endotelial”, en donde el TNF- α hace que las células endoteliales generen proteínas que le permiten reorganizarse estructuralmente y facilitar la expresión de moléculas de adhesión endoteliales como ICAM-1 (Appleyard et al., 1996). En la inflamación, TNF- α es quimiotáctico para los monocitos y polimorfonucleares, estimulando la actividad fagocítica, la adhesión al endotelio y la producción de especies reactivas de oxígeno en estas células (Appleyard et al., 1996).

1.3.3.3 Interleucina 1 beta (IL-1 β)

IL-1 β es miembro de la familia de interleucinas 1, y junto con otras 11 citocinas forma parte del grupo de mediadores de inflamación más importantes; es una proteína producida principalmente por monocitos, macrófagos y células dendríticas aunque también por células endoteliales y fibroblastos bajo ciertas circunstancias (Eder, 2008; Wallace, 2006). La producción de IL-1 β es inducida por estímulos como los lipopolisacáridos (LPS) de microorganismos, que son reconocidos a través de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y además de diversas proteínas que son reconocidas por patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Eder, 2008). Tanto los PAMPs como los DAMPs, permiten la activación de los receptores de membrana tipo toll (TLRs) que desencadenan la síntesis del pro péptido de IL-1 β (31 kDa) localizado en vesículas secretoras (Eder, 2008). Este pro péptido gracias a la acción de la enzima convertidora de interleucina 1 (ICE), es procesado en el residuo 116 y se convierte en una molécula IL-1 β activa (de 269 aa y 17.5 kDa) que es llevada hacia el exterior de las células por medio de exocitosis, no hallándose en la circulación general excepto en casos de patología severa (Martinon et al., 2002; Eder, 2008; López- Castejon et al., 2011).

IL-1 β es una citocina que actúa en diversos tejidos y que tiene principalmente funciones inmuno reguladoras; permitiendo la inducción de fiebre, proliferación, maduración de linfocitos y fibroblastos, así como el aumento del catabolismo muscular (Eder, 2008; Sahoo et al., 2011). En el daño gástrico generado por AINES, participa mediante el reclutamiento de neutrófilos, activación de moléculas de adhesión y la inducción de otras citocinas; sin embargo, también es un potente inhibidor de la secreción de HCl y paradójicamente puede ser capaz de inducir la expresión de COX-2 e iNOs, generando cierto grado de resistencia a las lesiones, por lo que su papel en el daño gástrico aun no es comprendido del todo (Wallace, 2006; Wallace et al., 2011).

1.4 Alternativas terapéuticas para reducir el daño gástrico generado por AINES

Como se ha mencionado anteriormente, las prostaglandinas que contribuyen a mantener la integridad de la mucosa gástrica de manera basal provienen principalmente de la COX-1, mientras que las derivadas de COX-2 participan en circunstancias donde la integridad de la mucosa está comprometida o durante procesos inflamatorios (Laine et al., 2008). La literatura señala que 300 millones de personas en todo el mundo usan AINES, y al menos el 8% de la población de la tercera edad padece una enfermedad crónica inflamatoria; reportándose un incremento en el uso de estos AINES de manera proporcional a la edad (Cavallini et al., 2006). Por ello, con la finalidad de reducir el daño gástrico generado por AINES y ayudar en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, se diseñaron los AINES selectivos para la COX-2 (Coxib), entre los que se encuentran el rofecoxib, los cuales lograron una reducción del daño gástrico; pero estos fármacos administrados de manera crónica comenzaron a inducir en los pacientes que los consumían de manera crónica, efectos tales como tromboembolias e infarto al miocardio, obligando a retirar del mercado a rofecoxib en 2004 e incluso a recomendar discreción en el uso de otros AINES, por lo que el uso de los Coxib no logró ser una estrategia óptima para reducir el daño gástrico generado por AINES (Watson et al., 2000; Fosbøl et al., 2010).

Hasta el momento, las estrategias para reducir el daño gástrico más utilizadas incluyen la coterapia con otro tipo de fármacos entre ellos los antagonistas de receptores de histamina tipo H₂, entre los que se encuentran la cimetidina, famotidina, nizatidina y ranitidina (siendo esta última la más utilizada) (Becker et al., 2004). Estos fármacos inhiben de manera competitiva la unión de histamina con los receptores de histamina H₂ de la célula parietal logrando suprimir la secreción de HCl, sin embargo incrementan el riesgo de sangrados gástricos, ya que suelen enmascarar los síntomas de alarma (vómitos, dolor estomacal o dolor de cabeza), por lo que ha comenzado a disminuir su uso en la prevención de la gastropatía generada por AINES (Becker et al., 2004). Otros de los fármacos empleados en la coterapia para el daño gástrico generado por AINES son los inhibidores de la bomba

de protones (H^+ , K^+ -ATPasa) como el lansoprazol, pantoprazol y omeprazol, siendo este último el más utilizado a dosis de 20 mg diarios, y cuyo mecanismo de acción consiste en formar una unión covalente entre su subunidad alfa y la H^+/K^+ -ATPasa, inhibiendo la actividad de esta última de forma irreversible; estos fármacos reducen el daño gástrico en combinación con AINES tradicionales, pero tienen como desventaja el alto impacto económico en los pacientes, ya que tendrán que sostener un tratamiento de hasta 8 semanas en promedio para disminuir la lesión (Biswas et al., 2003; Abramson y Weaver, 2005; Latimer et al., 2009).

Entre las terapias para disminuir el daño gástrico generado por AINES no tan empleadas, se encuentra el uso del misoprostol, un análogo de la prostaglandina que se utiliza para sustituir localmente las prostaglandinas inhibidas por AINES y que en la clínica logra una reducción efectiva del daño gástrico; desafortunadamente sus efectos secundarios como diarrea frecuente, dolor abdominal constante y ser un potente abortivo limitan su uso, por lo que rara vez son prescritos (Becker et al., 2004; Cavallini et al., 2006). En cuanto a los AINES tradicionales como la aspirina, se han sintetizado fármacos como aspirina liberadora de óxido nítrico (NO-NSAID) y sulfuro de hidrógeno (H_2S -NSAID) que han reportado una disminución del daño gástrico; esta clase de fármacos aún se encuentran en fase experimental por lo que sus efectos secundarios no han sido definidos (Wallace, et al., 2004).

1.5 Ácido docosahexanoico (DHA)

En la actualidad, se ha mostrado predilección por el empleo de terapias con productos de origen natural; por ello han formado parte importante de nuestra dieta diaria, como es el caso del aceite de pescado, el cual se emplea frecuentemente debido a sus múltiples efectos benéficos y a que contiene entre sus componentes al ácido docosahexanoico [22:6n-3, DHA] . En cuanto al ácido Docosahexanoico, este está formado por 22 carbonos y 6 dobles enlaces (Figura 4), y es un ácido graso poliinsaturados omega-3 (PUFA n-3) cuya

nomenclatura se basa en la posición del primer doble enlace contado desde el grupo metilo (omega) terminal; en los seres humanos no puede sintetizarse de novo (al carecer de $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturasas), pero puede obtenerse directamente del consumo de alimentos ricos en ácidos grasos esenciales como son el aceite de pescado (salmón, atún, sardinas, mariscos y arenque) cuya composición de DHA varía entre un 6 a 12 % dependiendo de su origen, pero también lo podemos encontrar en las semillas de girasol, cártamo, calabaza, sésamo, maíz, soja, haba, nuez, linaza, germen de trigo en rangos de 7 a 20 %, en forma de precursores (Applegate y Glomset, 1986; Sargent, 1997; Holub, 2002; Tvrzicka et al., 2011).

Al ser ingerido en forma de *cis* $\Delta 11$ ácido docosenoico o como un precursor llamado ácido alfa linolénico (18:3n-3) sufre la introducción de un doble enlace en el carbono 6 por acción de la $\Delta 6$ desaturasa formando un intermediario denominado ácido estearidónico (18:4n-3), siendo esta reacción el paso limitante en la vía de su síntesis, seguido por la adición de dos carbonos por la actividad elongasa formando el ácido eicosatetraenoico (20:4n-3) y luego de una desaturación en el carbono 5 por la $\Delta 5$ desaturasa forma ácido eicosapentaenoico (20:5n-3), posteriormente ocurre una elongación que sintetiza ácido docosapentaenoico (22:5n-3) y luego DHA por medio de la $\Delta 4$ desaturasa (Holub, 2002; Burdge, 2004). La conversión de ácido alfa linolénico hacia DHA ocurre con una eficiencia < 0.1% en hombres y 9% en mujeres; debido al hecho de que gran parte del ácido alfa linolénico que se consume en la dieta se somete a la β oxidación en mitocondrias y sólo una pequeña cantidad queda disponible para la conversión hacia DHA. En el caso de las mujeres, una menor tasa de utilización de ácido alfa linolénico en la β oxidación hace que puedan convertir más DHA y como la regulación de $\Delta 6$ desaturasa es responsabilidad de las acciones de los estrógenos, permiten mantener los niveles de DHA durante el embarazo (Burdge et al., 2002; Burdge, 2004). Surgiendo la importancia del consumo de DHA preformado en la dieta para el mantenimiento de concentraciones adecuadas de DHA en los tejidos, en donde el género ya no influye en la utilización y acción del mismo (Burdge, 2004).

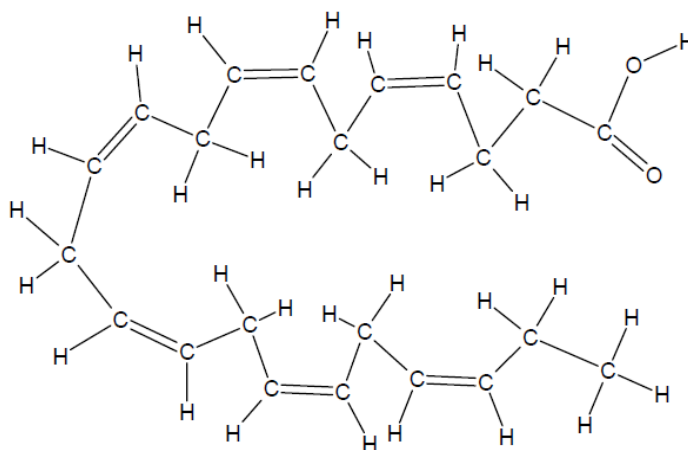


Figura 4. Estructura química del ácido docosahexaenoico. Fuente: Holub, 2002.

El papel esencial de los ácidos grasos poli insaturados omega-3 (PUFA n-3) cobró interés a partir de 1970, con las observaciones en la baja incidencia de diversas enfermedades con un componente inflamatorio en poblaciones con alto consumo de PUFA n-3, que impulsaron el desarrollo de investigaciones en modelos animales, cultivos celulares y seres humanos; dichas investigaciones reportan el papel esencial del DHA para el desarrollo de la sinaptogénesis en el sistema nervioso central (SNC) de los seres humanos, ya que puede encontrarse en los aminofosfolípidos fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS) de las membranas neuronales y fotorreceptores (Lukiw y Bazan, 2008). Aunque los detalles de su acción e interacción a nivel molecular permanecen en investigación, conclusiones preliminares refieren que su acción puede involucrar el alto grado de flexibilidad conformacional que le confiere el metileno presente en su estructura, siendo este lo que le permite formar un ángulo que encaja con las superficies de otras moléculas como los fosfolípidos de membrana celular; por ello, el DHA puede alterar las propiedades físico-químicas de la membrana celular modificando la señalización celular, la expresión de genes y los procesos biosintéticos (Applegate y Glomset, 1986).

El DHA se utiliza como un suplemento nutricional con dosis recomendada de hasta 200 mg al día solo y de hasta 450 mg al día en combinación con otros omega-3 (Morisseau

et al., 2011; Tvrzicka et al., 2011). Se han documentado extensamente los beneficios de sus propiedades antiaterogénicas y antitrombóticas pero principalmente su papel como cardioprotector y neuroprotector, además se ha comenzado a estudiar su participación en la inflamación y el dolor (Morisseau et al., 2011; Mayurasakorn et al., 2011; Tvrzicka et al., 2011). Existen reportes en donde el consumo PUFA n-3 ejerce efectos en la resolución de la respuesta inflamatoria; debido a un mecanismo que involucra la competencia del DHA con el ácido araquidónico por las enzimas omega oxidasas del citocromo P450 (CYP) específicamente por la CYP4F2, reemplazando al ácido araquidónico en las vías de lipooxigenasa (LOX) o ciclooxigenasa (COX) particularmente COX-2, lo que resulta en el bloqueo de la producción de los eicosanoides inflamatorios (Morisseau et al., 2011; Nauroth et al., 2010).

2. ANTECEDENTES

Hasta el momento no se han realizado estudios que eluciden la participación o efecto protector del DHA; sin embargo, contamos con el antecedente de los estudios que se han hecho sobre la administración de aceite de pescado en modelos murinos, entre estos destacan los siguientes:

En 1989, Faust y colaboradores, observaron un menor número de lesiones gástricas en ratas que recibieron una dieta suplementada con 10% de aceite de pescado por 8 semanas, comparadas con las ratas que recibieron el vehículo y la inducción de daño gástrico por etanol.

En el 2006, Battacharya y colaboradores, indican que la administración de 200 mg/kg de aceite de pescado dos veces al día durante 5 días ejerce un efecto gastroprotector de hasta un 80% en modelos murinos de daño gástrico inducidos por aspirina, estrés debido a frío, etanol y la ligadura de píloro.

En 2011, Qun Zhang y colaboradores, reportan que ácidos grasos omega-3 a dosis de 5g/kg aumentan la motilidad gástrica después de una gastrostomosis en modelo murino, a través de la inhibición de ácido gástrico, disminuyendo la inflamación post operatoria por la reducción de los niveles de IL-1 β y TNF- α .

Existen múltiples estudios acerca de los mecanismos y moléculas implicadas en el daño gástrico generado por AINES, para fines de nuestra investigación es oportuno mencionar los siguientes:

En 1987, Suwa y colaboradores, demuestran que al comparar la administración única de diferentes AINES, la indometacina es la que provoca un mayor daño gástrico en

comparación con los demás AINES y que su mecanismo está relacionado con la disminución de prostaglandinas en tejido gástrico.

En 1992, Asako y colaboradores, observaron que la administración de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de indometacina provoca el aumento de los niveles de LTB_4 en el mesenterio de la rata, además de que el daño gástrico por indometacina involucra la adherencia de leucocitos en endotelio vascular a través de un mecanismo dependiente de LTB_4 .

En 1996, Appleyard y colaboradores, indican que en la adherencia de leucocitos al endotelio vascular involucrada en el daño gástrico por indometacina, existe también un incremento en los niveles plasmáticos de $\text{TNF-}\alpha$, por lo que dicha citocina juega un papel importante en este daño.

En 2000, Wallace y colaboradores, reportan que es necesaria la inhibición de las dos formas de ciclooxigenasa para que los AINES generen un daño gástrico, siendo que la administración de indometacina provoca una disminución en la síntesis de PGE_2 en tejido gástrico de rata y el aumento de la adherencia de leucocitos al endotelio del mesenterio en rata.

En 2008, Zhang y colaboradores, demuestran que la administración intragástrica de indometacina a dosis de 48 mg/kg induce un incremento en las concentraciones de $\text{IL-1}\beta$ y $\text{TNF-}\alpha$ en la mucosa gástrica de la rata.

3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

Los AINES son los medicamentos más prescritos en el mundo; se ha demostrado que el consumo crónico de alcohol, tabaquismo, infección por *H. pylori* y el uso crónico de AINES son causas principales de lesiones gástricas, entre ellas las úlceras que se caracterizan por inflamación y sangrado en los pacientes no tratados, desarrollando a la larga complicaciones como atrofia e incluso cáncer gástrico. En México, las úlceras gástricas y duodenales se reportan semanalmente en el Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica con la clave CIE 10 K25-K29, ubicándose entre las 20 primeras causas de mortalidad en la población en los últimos 5 años, y ocupando el cuarto lugar dentro de las veinte principales causas de enfermedad durante el 2008 con una morbilidad de 1 767.07 casos por cada 100 000 habitantes, en donde han permanecido durante 2009 y 2010 con una incidencia de 1780.69 casos por cada 100 000 habitantes, siendo más alta en grupos de edad entre 45 a 64 años (INEGI, 2011; CENA VECE, 2011). Esta alta incidencia está asociada con el uso frecuente de AINES para el alivio del dolor e inflamación de enfermedades osteoarticulares (INEGI, 2011; CENA VECE, 2011).

Ha sido bien establecido que los AINES bloquean las ciclooxygenasas que intervienen en la respuesta inflamatoria normal y por lo tanto, bloquean la producción local de prostaglandinas, asociándose con incremento en la permeabilidad de ácido y pepsina en la mucosa originando erosiones y úlceras gástricas (Bastaki y Wallace, 1999). La mayoría de los AINES existentes no son selectivos, por ello los enfoques terapéuticos para reducir los efectos gastrointestinales asociados a los AINES están dirigidos a un cotratamiento, ya sea con inhibidores de la bomba de protones, agonistas de receptores de histamina H₂ y antiácidos junto con la implementación de medidas higiénico dietéticas; sin embargo, no se ha alcanzado una reducción en la incidencia de estos casos. Surgiendo de ahí la importancia de diseñar nuevas terapéuticas para la prevención del daño gástrico ante el uso crónico de AINES. Además, el daño gástrico generado por AINES involucra la lesión del tejido per se, por lo tanto es importante averiguar la participación de moléculas como las que derivan de

ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (PUFA); siendo particularmente de interés el ácido docosahexaenoico (DHA), del cual se han reportado estudios que destacan sus efectos citoprotectores en otros sistemas. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado el efecto gastroprotector del DHA en modelos de daño gástrico, por lo que consideramos importante determinar su posible efecto terapéutico.

4. HIPÓTESIS

El DHA (ácido docosahexaenoico) podría generar un efecto gastroprotector en el modelo murino de daño gástrico inducido por indometacina, probablemente este se llevaría a cabo a través de la modulación de PGE₂, LTB₄, TNF- α e IL-1 β .

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto y mecanismo gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gástrico inducido por indometacina en un modelo murino.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el daño gástrico generado por la administración de indometacina a diferentes dosis en un modelo murino.
2. Identificar el efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoíco) en el daño gástrico inducido por indometacina en la rata.
3. Cuantificar los niveles de PGE₂ y LTB₄ en tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina.
4. Determinar la expresión de las proteínas TNF- α e IL-1 β en tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para desarrollar la presente investigación, se empleó la siguiente estrategia metodológica general (Diagrama 1):

Primero a través de la administración de diferentes dosis de indometacina en ratas durante diferentes tiempos, se evaluó el modelo de daño gástrico generado por la administración aguda, así como la obtención de una dosis estandarizada (ver Diagramas 2 y 3 en anexo); después se evaluó el daño gástrico generado después de un pretatamiento con DHA en el modelo de daño gástrico por indometacina en la rata, obteniendo muestras de tejido (ver Diagrama 4 en anexo); a las que posteriormente se les cuantificó por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), los niveles de PGE_2 y LTB_4 (ver Diagrama 5 en anexo); también se determinó por la técnica de Western blot la expresión de proteínas $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$ (ver Diagrama 6 en anexo), y finalmente se realizó un análisis, presentación y discusión de resultados que nos permitieron la elaboración de conclusiones.

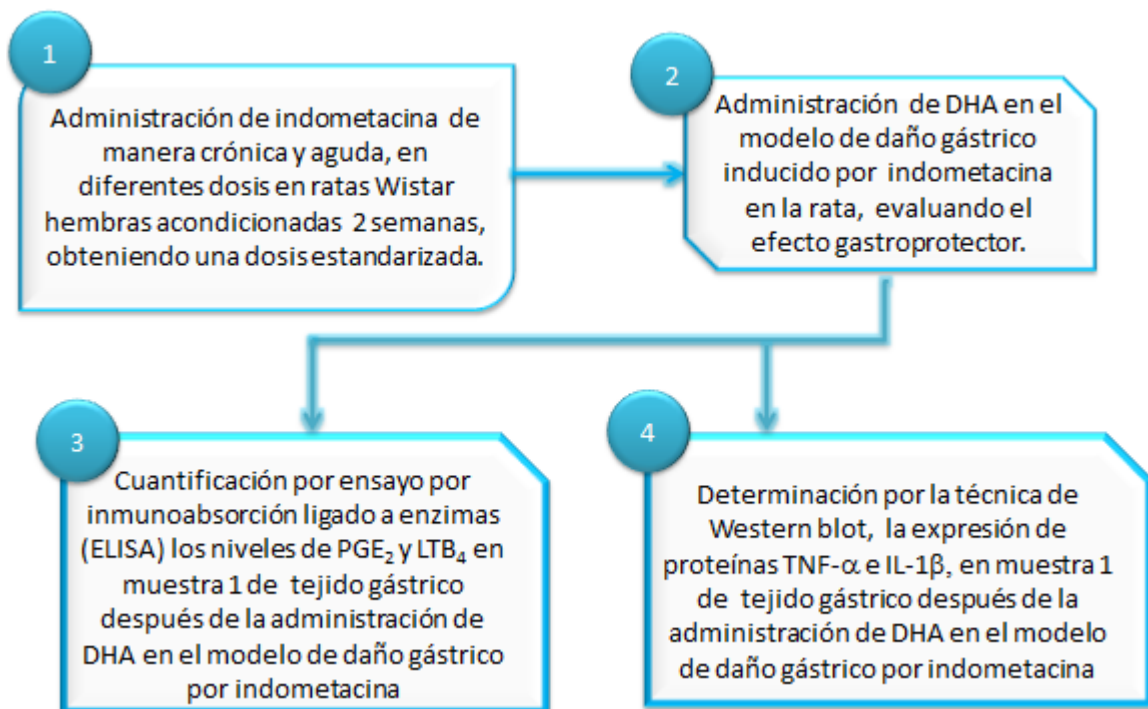


Diagrama 1. Estrategia metodológica general

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Fármacos y Reactivos

Todos los reactivos y fármacos fueron preparados momentos previos a su uso; la indometacina fue disuelta en NaHCO_3 al 0.5%, el omeprazol fue disuelto en NaCl 0.9 % y se utilizó aceite de oliva como vehículo para el ácido docosahexaenoico. Indometacina (I7378), omeprazol (O104), ácido docosahexaenoico (D2534), albumina sérica bovina (B4287), laemmli 2X (S3401), dodecil sulfato sódico (436143), fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Los kits de inmunoensayo ligado a enzimas para PGE_2 (514010) y LTB_4 (52011) fueron obtenidos de Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA). El agua usada para el inmunoensayo fue purificada en un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). El Coctel inhibidor de proteasas libre de EDTA (11873580001) se obtuvo de Roche. La membrana de nitrocelulosa (1620115), azul de coomasie G 250 (1610406), tris [hidroximetil] aminometano (1610719), glicina (1610718), persulfato de amonio (1610700), tetra-metil- etilendiamina. (1610700), tween 20 (1706531), solución a 40% / bis acrilamida (1610146) y marcador de peso molecular dual color (2S002) obtenidos de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). NaHCO_3 (3606-07), NaCl (3624-19), KH_2PO_4 (3246-19), Na_2HPO_4 (4062-02), CH_3OH (9070-03), $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (9014-03), ácido fosfórico (0260-03), obtenidos de JT. Baker Chemical Co. (Center Valley, PA, USA). Los anticuerpos primarios para $\text{TNF-}\alpha$ (1350), $\text{IL-1}\beta$ (1252), actina (1615) y el anticuerpo secundario mouse anti- goat IgG- HRP (2354) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). El reactivo para detección de Western blotting ECL (34080) fue obtenido de Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, IL USA).

8.2 Animales

Todos los animales experimentales fueron tratados cumpliendo con las normas internacionales y acorde a la Norma Oficial Mexicana (NOM- 062- ZOO-1999) para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. El tamaño de las muestras por grupo fue de 6 ratas. Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar con un peso de 180 a 220 gramos, obtenidos del bioterio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). Las ratas fueron acondicionadas en jaulas de policarbonato bajo condiciones de temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), con ciclos de luz-oscuridad (12 h), alimentadas con comida en pellets estándar y agua de grifo ad libitum durante 2 a 3 semanas previas al experimento. Los animales fueron privados de alimento pero con libre acceso al agua, colocándolos en jaulas con gradilla para evitar la coprofagia de 18 a 20 h previas al experimento.

8.3 Modelo de daño gástrico generado por indometacina

La inducción de daño gástrico se realizó siguiendo la metodología descrita por Wallace, en 2000 y Chávez-Piña et al., en 2008 con algunas modificaciones. Brevemente, el daño gástrico se produce por la administración de indometacina por vía oral (a través de una cánula metálica) a los animales de experimentación con ayuno previo de 18 a 20 h y con libre acceso al agua. Tres horas después de la administración, los animales fueron sacrificados en cámara de CO_2 extrayendo el estómago y abriéndolo por la curvatura mayor para una completa extensión; finalmente se efectuó el análisis macroscópico de las lesiones, el cual consiste en medir el largo y ancho de cada lesión y obtener la suma total del área de lesión (mm^2) para cada rata; este modelo se puede adaptar a crónico si se efectúa la administración diaria de indometacina a dosis bajas (Polat et al., 2011).

8.3.1 Evaluación del daño gástrico generado por la administración crónica de indometacina a diferentes dosis.

Para determinar si el modelo de daño gástrico que utilizamos es el óptimo, ratas Wistar hembras en las condiciones antes descritas fueron divididas aleatoriamente en grupos, a las cuales se les administró diariamente indometacina por vía oral en dosis de 0.5, 3 y 5 mg/kg o el mismo volumen de vehículo (NaHCO₃ al 0.5%) durante 1 semana y por 3 semanas, respectivamente. La hora de administración para todos los grupos se mantuvo constante. La evaluación del daño gástrico fue determinada de acuerdo al punto 8.3. Las dosis utilizadas estuvieron basadas en las descritas por Polat y colaboradores, en el 2011.

8.3.2 Evaluación del daño gástrico generado por la administración aguda de indometacina a diferentes dosis.

Ratas Wistar hembras en las condiciones descritas previamente, fueron divididas aleatoriamente en grupos, sometidas a un ayuno previo de 18 a 20 h; a las cuales se les administró por vía oral indometacina en dosis única de 3, 10 y 30 mg/kg o el mismo volumen de vehículo (NaHCO₃ al 0.05%), respectivamente. La evaluación del daño gástrico fue determinada de acuerdo al punto 8.3. Finalmente al evaluar los resultados, se elige la dosis de 30 mg/kg para evaluar el efecto gastroprotector de DHA, basándonos además en las dosis utilizadas en estudios como los de Wallace et al., en 1993 y Zhang et al., en 2008.

8.4 Efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gástrico agudo inducido por indometacina en la rata.

Ratas Wistar en condiciones previamente descritas, fueron divididas aleatoriamente en grupos y sometidas a un ayuno previo de 18 a 20 h, se les administró por vía oral ácido docosahexaenoico en dosis única de 3, 10 y 30 mg/kg o el mismo volumen de vehículo (aceite de oliva), 2 h después se administró indometacina en dosis única de 30 mg/kg por vía oral para inducir daño gástrico o el mismo volumen de vehículo (NaHCO₃ al 0.05%). Tres

horas después de su administración, los animales fueron sacrificados en cámara de CO₂ extrayendo el estómago y abriéndolo por la curvatura mayor para una completa extensión. Finalmente se efectuó el análisis macroscópico de las lesiones, el cual consiste en medir el largo y ancho de cada lesión y obtener la suma total del área de lesión (mm²) para cada rata. Se eligió ese tiempo para la administración del DHA basados en reportes como el de Christensen et al., 1995 y Schuchardt et al., 2011 donde se indica que los niveles plasmáticos de DHA son detectables desde las 2 h de su administración oral.

8.4.1 Efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoico) frente al efecto gastroprotector del omeprazol en el daño gástrico agudo inducido por indometacina en la rata.

Ratas Wistar en condiciones previamente descritas, fueron divididas aleatoriamente en grupos y sometidas a un ayuno previo de 18 a 20 h, se les administró por vía oral una dosis única de 30 mg/kg de omeprazol o el mismo volumen de vehículo (NaCl 0.9 %), 30 min después se administró indometacina en dosis única de 30 mg/kg por vía oral para inducir daño gástrico o el mismo volumen de vehículo (NaHCO₃ al 0.05%). La evaluación del daño gástrico se determinó de acuerdo al punto 8.3. El tiempo y las dosis fueron seleccionadas basándonos en la metodología descrita por Navarrete et al., en 2005.

8.5 Cuantificación de los niveles de PGE₂ y LTB₄ en tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido indometacina.

Una muestra del cuerpo del estómago fue colocado en un microtubo (tubo eppendorf) que contiene 1 ml de amortiguador de fosfatos (NaH₂PO₄ y NaHPO₄ 10mM/ L ; pH 7.4); el tejido fue cortado con tijeras por 30 s, incubado en baño de agua (37 °C) con movimiento por 20 min, posteriormente la muestra fue centrifugada (13 000 rpm) por 1 minuto, el sobrenadante fue guardado en un microtubo y almacenado a - 70°C para la

posterior cuantificación de PGE₂ y LTB₄ por el método de ELISA, de acuerdo a la metodología descrita por Chávez-Piña et. al., en 2008.

La cuantificación de PGE₂ y LTB₄ respectivamente, se realizó acorde a las instrucciones de los kits de inmunoensayo ligado a enzimas para PGE₂ (514010) y LTB₄ (52011) de Cayman Chemical Co. . Brevemente, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de los kits están basado en la competencia entre una cantidad constante de PGE₂ o LTB₄ ligado a acetilcolinesterasa (AChE), y la cantidad indeterminada de PGE₂ o LTB₄ en las muestras por la unión a una cantidad constante de anticuerpo anti PGE₂ o anti LTB₄. Este complejo de anticuerpo - PGE₂ o LTB₄, se une a un anti- IgG que esta previamente unido al pozo; después de 18 h, la micro-placa se lavó para eliminar el exceso no unido y, posteriormente se añadió un sustrato para acetilcolinesterasa. Este sustrato permite una reacción enzimática, que da como resultado una coloración amarilla que puede ser leída en un espectrofotómetro a 412 nm; la intensidad del color, es inversamente proporcional a la cantidad de PGE₂ o LTB₄ libres presentes en las muestras durante el tiempo de desarrollo del ensayo.

8.6 Determinación de la expresión de TNF- α e IL-1 β por la técnica de Western blot

Para determinar la expresión de las proteínas TNF- α e IL-1 β con la finalidad de evaluar su posible participación en el efecto gastroprotector del DHA, una muestra del cuerpo del estómago de los grupos tratados con DHA, así como en condiciones basales y los respectivos vehículos, fueron colocados en microtubos, pesados y congelados en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a - 70°C (Martin et al., 2008).

8.6.1 Obtención de extractos proteicos

Para la obtención de extractos proteicos totales, se efectuó la pulverización mecánica del tejido en un mortero pre congelado para después colocar la muestra en un

amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 7.4) a proporción 1:3 al cual se le incorporó un cocktail de inhibidores de proteasas y PMSF (100 mM) de acuerdo a la metodología descrita por Martin et al., en 2008. Las muestras fueron colocadas en microtubos y centrifugadas a 14 000 rpm por 15 min en una micro centrifuga refrigerada a 4°C, transcurrido el tiempo se recolectó el sobrenadante y fueron almacenados a - 70°C.

8.6.2 Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford

Se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford mediante la comparación de una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) (1 µg / ml), H₂O 800 µl y reactivo de Bradford 200 µl. La BSA fue utilizada en un rango de concentraciones de 0 a 10 µg, mientras que las muestras fueron leídas a dilución 1:6 debido a la alta concentración proteica de las mismas. Tanto la BSA como las muestras se leyeron a una longitud de onda de 595 nm, en un espectrofotómetro; después se determinó la concentración proteica interpolando el valor de las muestras en la curva estándar de BSA.

8.6.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

A partir de los extractos proteicos obtenidos en el procedimiento previo, se continuó con la preparación de la muestras agregando un amortiguador de carga (Laemmli 2x) en una proporción 1:1, y calentado a 90 °C por 5 min en baño María. Las proteínas fueron separadas por el método SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico); el porcentaje de gel separador usado fue del 12% para TNF- α y 15 % para IL-1 β . Para la electroforesis, se usó una carga de 80 µg de proteína por muestra y finalmente se corrió la electroforesis a 120 V por 90 min para TNF- α y a 120 V por 120 min para IL-1 β , usando el sistema de electroforesis MiniPROTEAN 3 (Bio- Rad). Al término de la misma se efectuó la tinción de los geles con azul de Coomassie para verificar la integridad de proteínas y en su caso se continuó con la transferencia a membrana de nitrocelulosa.

8.6.4 Transferencia a membrana de nitrocelulosa

Una vez completada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, que fue hidratada en el amortiguador de transferencia, junto con el papel filtro y esponjas. Se preparó el “sándwich” típico de transferencia con el siguiente orden del ánodo hacia el cátodo: esponja, papel filtro, gel, membrana de nitrocelulosa, papel filtro y esponja. La transferencia húmeda fue llevada a cabo con el sistema mini transblot Cell System (biorad) durante 90 min a 310 mA a 4 °C para ambas proteínas. Al término de la transferencia se colocó la membrana en rojo ponceu para verificar la eficiencia de la transferencia, dejándose por algunos min, y posteriormente se lavó la membrana con H₂O bidestilada hasta eliminar por completo el colorante.

8.6.5 Bloqueo e incubación de la membrana con anticuerpos de interés

Para efectuar el bloqueo de las membranas, se realizó la siguiente metodología:

Bloqueo de Membrana	Lavados	Proteína de interés
PBS-Tween 0.05% con 15% de leche libre de grasa por 1 h a temperatura ambiente	3 veces con PBS- Tween 0.05% de 5, 10 y 15 min cada uno	TNF- α
TBS-Tween 0.05% con 5% de leche libre de grasa toda la noche a 4°C	3 veces con TBS- Tween 0.05% de 10 min cada uno	IL-1 β
	1 vez con PBS- Tween 0.05% de 10 min	β actina

Al término de los lavados, se realizó la incubación con el anticuerpo primario con las siguientes condiciones:

Anticuerpo Primario	Dilución	Incubación
TNF- α policlonal (SC-1350)	dilución 1:200	toda la noche a 4°C
IL-1 β policlonal (SC-1252)	dilución 1:500	2 h a temperatura ambiente
β actina policlonal (SC-1615)	dilución 1:200	toda la noche a 4°C

El anticuerpo TNF- α es un anticuerpo policlonal dirigido al extremo N terminal de TNF- α , obtenido de cabra y purificado por afinidad; el anticuerpo IL-1 β es un anticuerpo policlonal dirigido al extremo C terminal de IL-1 β , obtenido de cabra y purificado por afinidad; el anticuerpo β actina es un anticuerpo policlonal dirigido al extremo C terminal de actina, obtenido de cabra y purificado por afinidad; finalmente el anticuerpo secundario es un anticuerpo monoclonal dirigido a IgG de cabra y conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) obtenido de ratón y purificado por afinidad. Como se mencionó anteriormente, después de revelar las membranas con las proteínas de interés, se reutilizaron las membranas para incubar con β actina como control de referencia por ser una proteína constitutiva en todas las células.

Al final del tiempo de incubación, se efectuaron los lavados respectivos con PBS-Tween 0.05% y TBS-Tween 0.05%; posteriormente se incubaron todas las proteínas de interés con el anticuerpo secundario ratón anti-cabra HRP (SC-2354) en una dilución 1:3000, durante 1 h en agitación orbital a temperatura ambiente. Finalmente, se hicieron los lavados con PBS-Tween 0.05% y TBS-Tween 0.05% respectivamente y se continuo con el revelado.

8.6.6 Revelado

Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia, utilizando luminol en presencia de peróxido de hidrógeno en una relación 1:1, procurando cubrir la membrana en su totalidad y colocándolas en un casete de revelado exponiéndola a una placa radiográfica del mismo tamaño. Finalmente, se cerró el casete para detectar la quimioluminiscencia por tiempos de exposición desde 30 s a 35 min. La mezcla de luminol y peróxido sirvió como sustrato para la peroxidasa de rábano (HRP) que esta conjugada con el anticuerpo secundario, lo que permite una la quimioluminiscencia que se puede detectar al exponerla membrana a la placa radiográfica del mismo tamaño de la membrana.

8.6.7 Análisis densitométrico

El análisis densitométrico de cada una de las bandas obtenidas en cada Western blot se valoró con el Programa Image J, el cual analiza la densidad óptica del área de cada banda determinando un valor en unidades ópticas para cada una. Al final se realiza la normalización de los valores obtenidos para las bandas de TNF- α y IL-1 β con su β actina respectiva, para así obtener la expresión relativa de cada proteína.

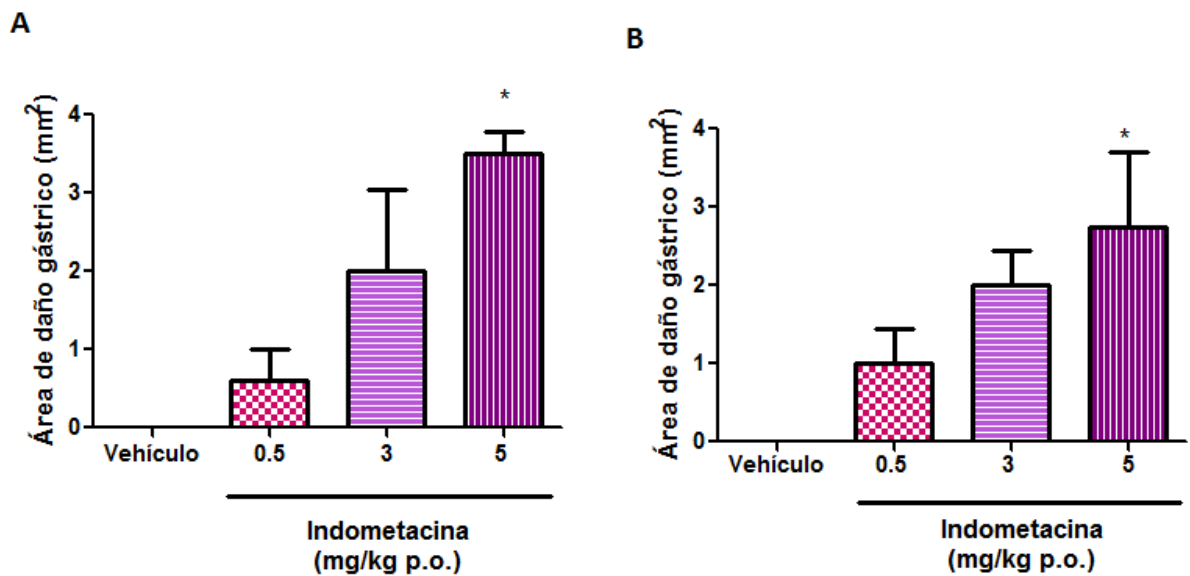
8.7 Análisis Estadístico

Todos los resultados fueron analizados por medio de la prueba estadística del análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de comparación multiple Newman-Keuls obtenidas con el programa GraphPad Prism 5. La significancia estadística fue considerada cuando p es ≤ 0.05 .

9. RESULTADOS

9.1 Evaluación del daño gástrico generado por la administración crónica de indometacina a diferentes dosis

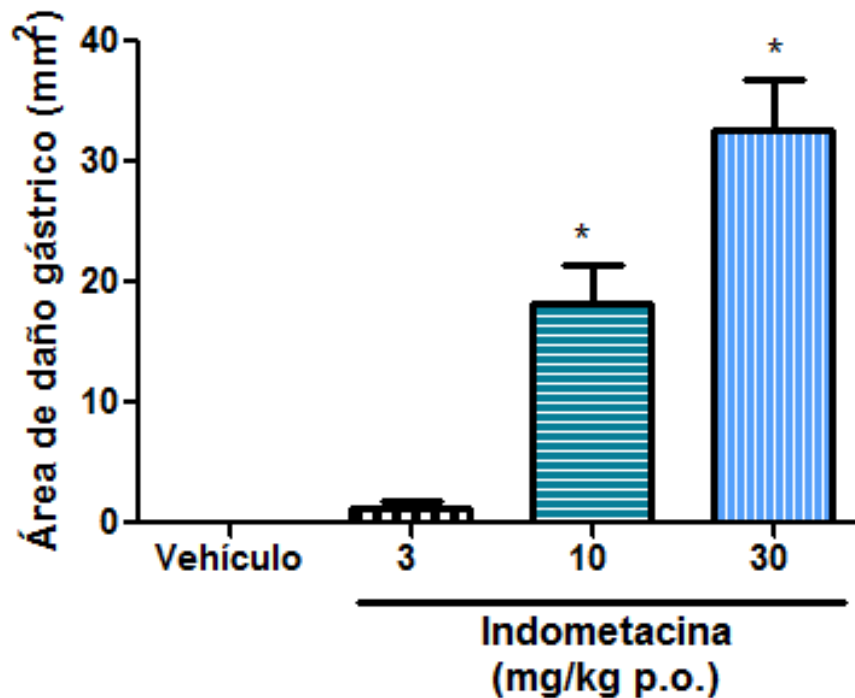
La administración vía oral de indometacina en dosis única diaria por 1 y 3 semanas, causa un área de daño gástrico (mm^2) de manera dosis dependiente, siendo la dosis de 5 mg/kg administrada durante una y tres semanas la que presentó una mayor área de daño en comparación con su vehículo (NaHCO_3 al 0.5 %) ($3.5 \pm 0.5 \text{ mm}^2$ y $2.75 \pm 0.9 \text{ mm}^2$, respectivamente) (Gráfica 1).



Gráfica 1. Daño gástrico inducido por la administración crónica de indometacina (0.5, 3 y 5 mg/kg, p.o.) durante 1 (A) y 3 (B) semanas. Los datos son expresados como la media \pm el error estándar (n= 6). * P \leq 0.05 vs vehículo (NaHCO_3 al 0.5 %).

9.1.2 Evaluación del daño gástrico generado por la administración aguda de indometacina a diferentes dosis

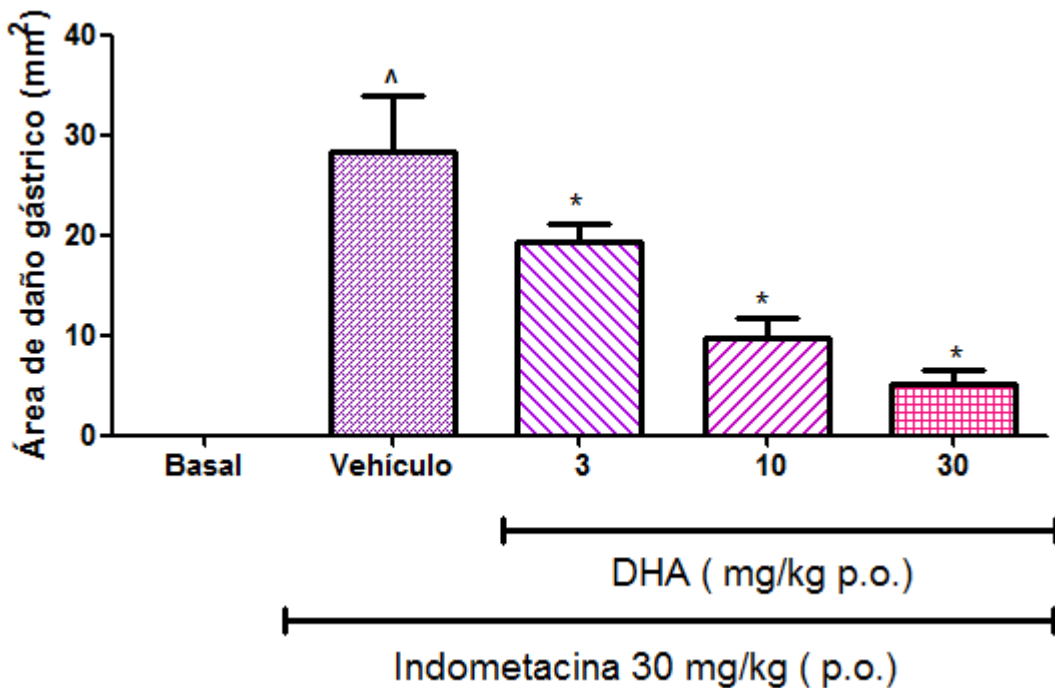
La administración por vía oral de una dosis única de indometacina, causa un área de daño gástrico (mm^2) de manera dosis dependiente, siendo la dosis de 10 y 30 mg/kg las que presentaron una mayor área de daño en comparación con su vehículo (NaHCO_3 al 0.5 %) ($18.1 \pm 3.2 \text{ mm}^2$, $32.6 \pm 4.2 \text{ mm}^2$ y 0 mm^2 , respectivamente); en donde la dosis de 30 mg/kg presenta la mayor área de daño reportado, por lo que se utiliza esta dosis para inducir daño gástrico (Gráfica 2).



Gráfica 2. Daño gástrico inducido por la administración aguda de indometacina (3, 10 y 30 mg/kg, p.o.). Los datos son expresados como la media \pm el error estándar ($n=6$). * $P \leq 0.05$ vs vehículo (NaHCO_3 al 0.5%).

9.2 Efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gástrico agudo inducido por indometacina en la rata

El pre-tratamiento por vía oral de DHA (3, 10 y 30 mg/kg) demostró una disminución del área de daño gástrico (mm^2) causado por la administración de indometacina en dosis única (30 mg/kg p.o.), presentando dicha disminución de forma dosis dependiente ($19.3 \pm 1.7 \text{ mm}^2$, $9.6 \pm 2.0 \text{ mm}^2$ y $5.1 \pm 1.03 \text{ mm}^2$, respectivamente); siendo este daño menor en todas las dosis evaluadas y estadísticamente significativo en comparación con el efecto producido por el vehículo (NaHCO_3 al 0.5 %) ($28.38 \pm 5.6 \text{ mm}^2$). Mientras que el grupo en condiciones basales al que solo se le administraron los vehículo de indometacina (NaHCO_3 al 0.5%) y DHA (aceite de oliva) no presentó daño gástrico (Gráfica 3).



Gráfica 3. Efecto del DHA (3, 10 y 30 mg/ kg, p.o.) en el daño gástrico inducido por la administración aguda de indometacina (30 mg/kg, p.o.). Las ratas fueron pre tratadas con vehículo (aceite de oliva) o DHA, 2 h antes de la administración de indometacina. Los datos son expresados como la media \pm el error estándar (n= 6). * $P \leq 0.05$) vs vehículo (aceite de oliva). $^ P \leq 0.05$ vs Basal.

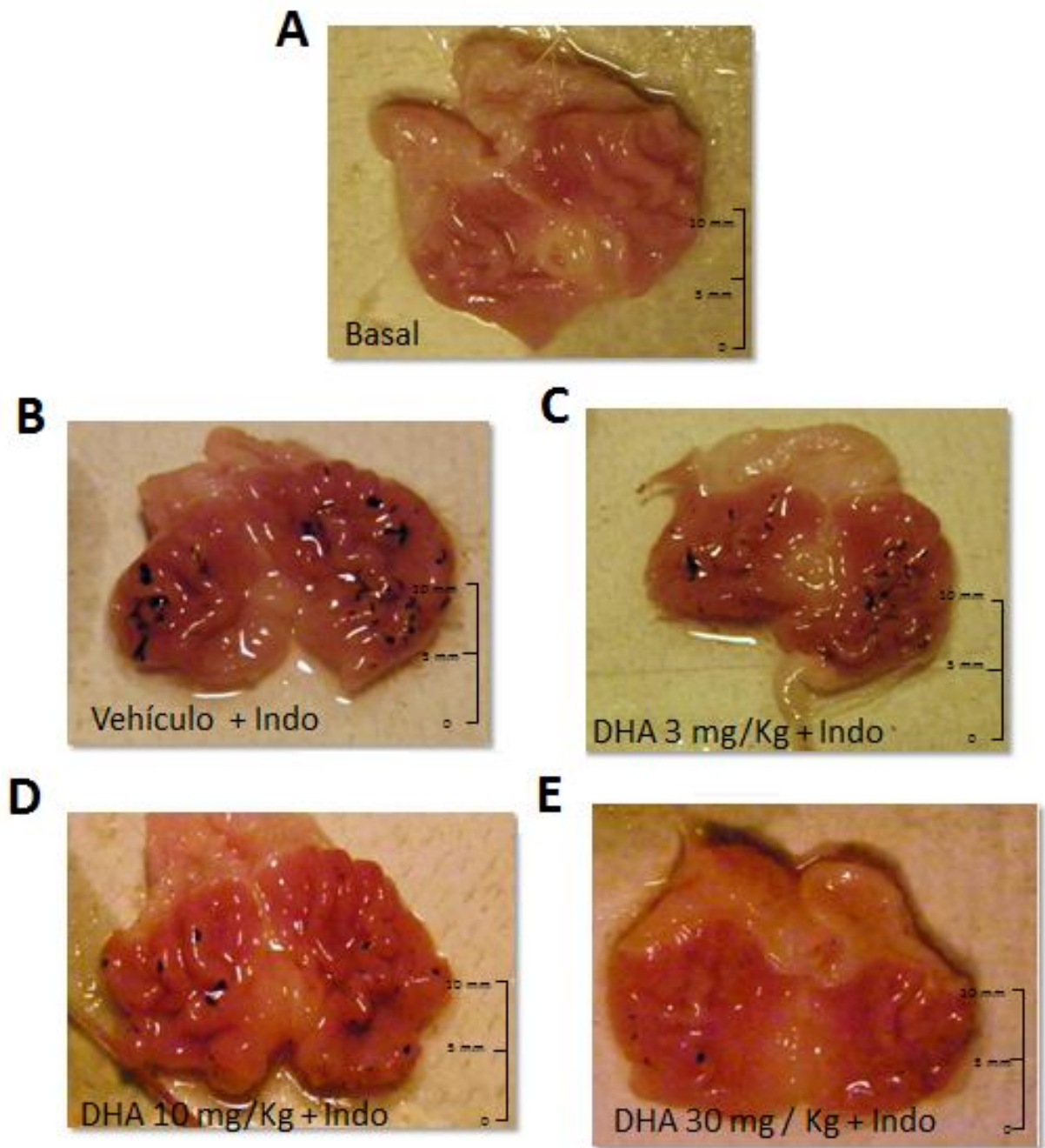
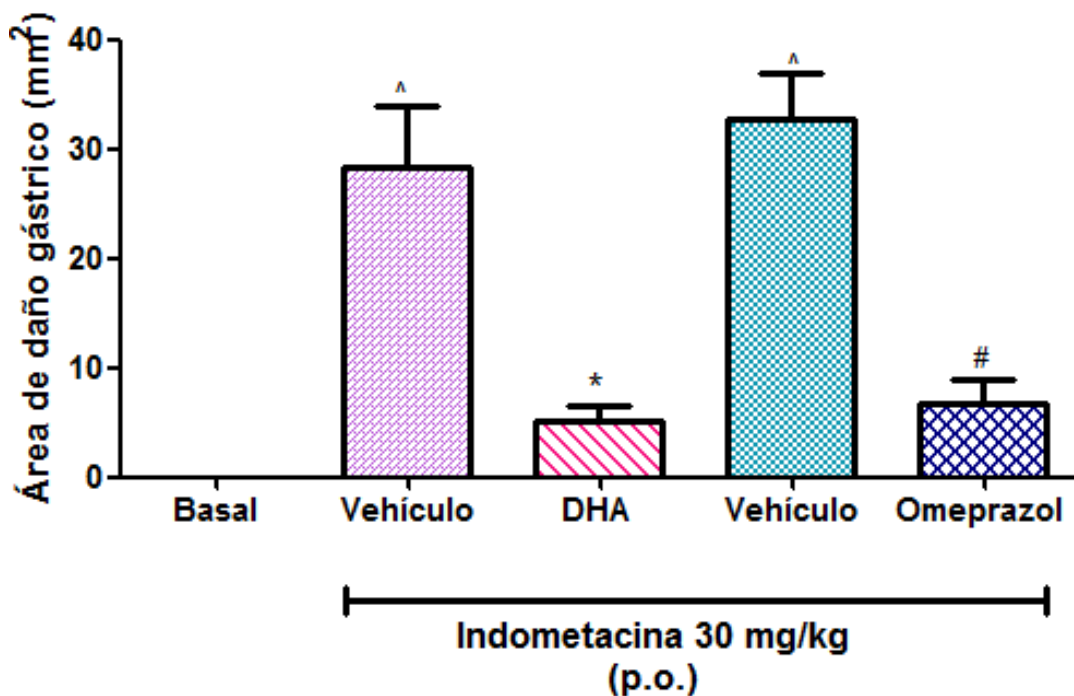


Figura 5. Imágenes representativas de las lesiones en cuerpo del estómago después de los diversos tratamientos. (A) Basal, (B) aceite de oliva + indometacina 30 mg/kg, (C) DHA 3 mg/kg + indometacina 30 mg/kg, (D) DHA 10 mg/kg + indometacina 30 mg/kg, (E) DHA 30 mg/kg + indometacina 30 mg/kg.

9.3 Efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoico) frente al efecto gastroprotector del omeprazol en el daño gástrico agudo inducido por indometacina en la rata

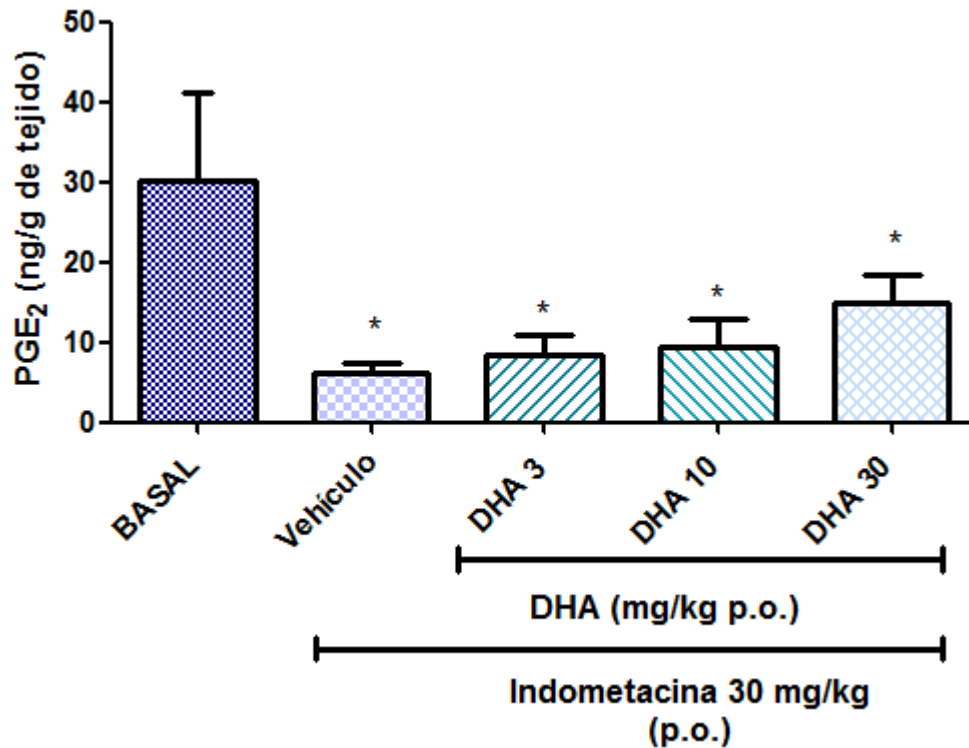
El pre-tratamiento por vía oral de DHA (30 mg/kg) y omeprazol (30 mg/kg) mostró en ambos casos una disminución del área de daño gástrico (mm^2) que causa la administración de indometacina en dosis única (30 mg/kg) ($5.1 \pm 1.03 \text{ mm}^2$ y $6.6 \pm 2.2 \text{ mm}^2$, respectivamente), siendo estos efectos estadísticamente significativos en comparación con el efecto producido por los grupos de daño ($28.38 \pm 5.6 \text{ mm}^2$ y $32.6 \pm 4.2 \text{ mm}^2$, respectivamente) y no presentando diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Gráfica 4).



Gráfica 4. Comparación del efecto del DHA (30 mg/kg, p.o.) y omeprazol (30 mg/kg, p.o.) en el daño gástrico en mm^2 inducido por la administración aguda de indometacina (30 mg/kg p.o.). Las ratas fueron pre tratadas con DHA o su vehículo (aceite de oliva) 2 h y con omeprazol o su vehículo (NaCl 0.9 %) 30 min antes de la administración de indometacina. Los datos son expresados como la media \pm el error estándar ($n = 6$). * indica $P \leq 0.05$ vs su respectivo vehículo. ^ $P \leq 0.05$ vs Basal.

9.4 Cuantificación de los niveles de PGE₂ en tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido por indometacina

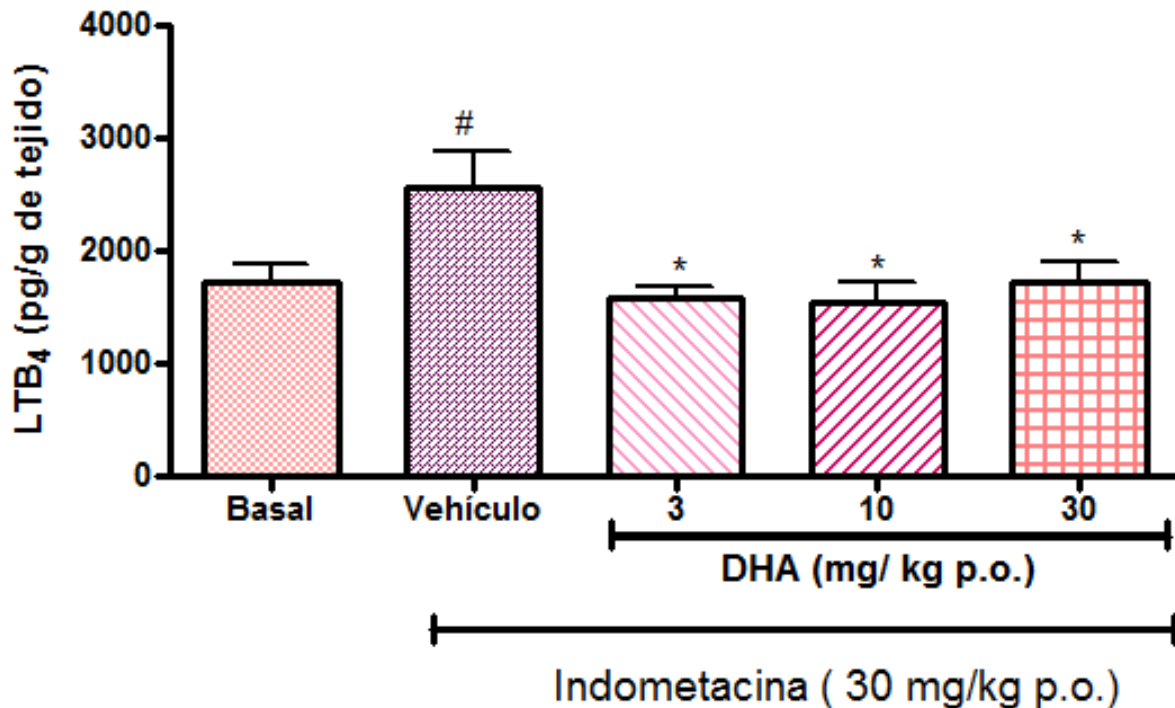
Se efectuó la cuantificación de los niveles de PGE₂, en las muestras de tejido gástrico de ratas pre tratadas con DHA vía oral (3, 10 y 30 mg/kg) y con inducción de daño gástrico por la administración de indometacina en dosis única (30 mg/kg), los niveles de PGE₂ en dicho pre-tratamiento (7.63 ± 1.2 ng/g de tejido, 9.01 ± 1.6 ng/g de tejido, 13.73 ± 1.4 ng/g de tejido, respectivamente). La administración de DHA no modificó la disminución de niveles de PGE₂ que causa la indometacina (31.10 ± 4.9 ng/g de tejido) en comparación con niveles basales (5.93 ± 0.5 ng/g de tejido) (Gráfica 5).



Gráfica 5. Niveles gástricos de prostaglandina E₂ (PGE₂) en ng/g de tejido, después del pre-tratamiento de DHA (3, 10 y 30 mg/kg, p.o.) en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina (30 mg/kg p.o.) en ratas Wistar. Los datos son expresados como la media ± la desviación estándar (n= 6). * P ≤ 0.05 vs Basal.

9.5 Cuantificación de los niveles de LTB_4 en tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido por indometacina

Se efectuó la cuantificación de los niveles de LTB_4 , en las muestras de tejido gástrico de ratas pre tratadas con DHA vía oral (3, 10 y 30 mg/kg) y con inducción de daño gástrico por la administración de indometacina en dosis única (30 mg/kg). Todos los grupos administrados con dosis de DHA mostraron un restablecimiento de los niveles de LTB_4 (1578 ± 104 pg/g de tejido, 1536 ± 186 pg/g de tejido y 1716 ± 197 pg/g de tejido, respectivamente) en comparación con su vehículo ($NaHCO_3$ al 0.5 %) (2566 ± 317.7 pg/g de tejido) (Gráfica 6)



Gráfica 6. Niveles gástricos de leucotrieno B_4 (LTB_4) en pg / g de tejido, después del pre-tratamiento con DHA (3, 10 y 30 mg/kg, p.o.) en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina (30 mg/kg p.o.) en ratas Wistar. Los datos son expresados como la media \pm el error estándar (n = 6). * $P \leq 0.05$ vs vehículo. # $P \leq 0.05$ vs Basal.

9.6 Integridad de las proteínas totales del tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina

Se realizó la obtención de extractos proteicos totales de las muestras de tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina, los diferentes extractos del tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina que se obtuvieron se corrieron en geles de acrilamida –SDS al 12 % en el que se colocaron 80 µg de cada extracto para verificar su integridad por Tinción de Coomasie y entonces proceder a su utilización para Western blot. En la Figura 6 se muestran una imagen representativa de la calidad de los extractos utilizados, en donde se observa que hay una plena integridad de los mismos y no hay degradación.

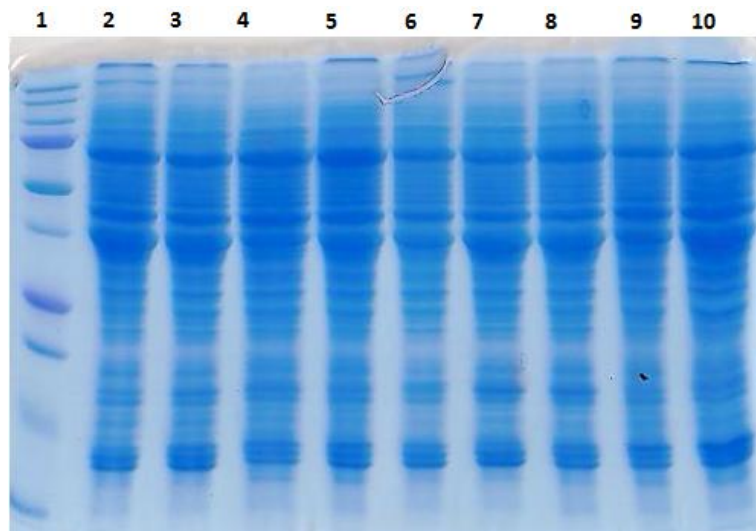


Figura 6. Imagen representativa de la integridad del extracto de proteínas totales del tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina en gel de acrilamida- SDS al 12% con Tinción de Coomasie. Carril 1 Marcador, Carril 2 ratas en condiciones basales, Carril 3 y 7 ratas con indometacina 30 mg/kg, Carril 4 y 8 rata con pre-tratamiento DHA 3 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 5 y 9 con pre-tratamiento DHA 10 mg/kg e indometacina 30 mg/kg y Carril 6 y 10 rata con pre-tratamiento DHA 30 mg/kg e indometacina 30 mg/kg.

9.7 Determinación de la expresión de TNF- α por la técnica de Western blot en tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina

Se determinó la expresión de TNF- α , en las muestras de tejido gástrico de ratas pre tratadas con DHA vía oral (3, 10 y 30 mg/kg) y con inducción de daño gástrico por la administración de indometacina (30 mg/kg), a través de la técnica de Western blot (Figura 7); posteriormente se efectuó un análisis densitométrico y normalización con β actina. Los grupos administrados con dosis de DHA de 10 y 30 mg/kg mostraron una disminución de los niveles de TNF- α (0.5436 ± 0.05 y 0.5590 ± 0.04 unidades relativas de densidad óptica, respectivamente) en comparación con los niveles basales y con su vehículo, así como con la dosis de DHA de 3 mg/kg (0.7581 ± 0.08 , 0.8287 ± 0.04 y 0.6392 ± 0.06 unidades relativas de densidad óptica), estos últimos no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Gráfica 7).

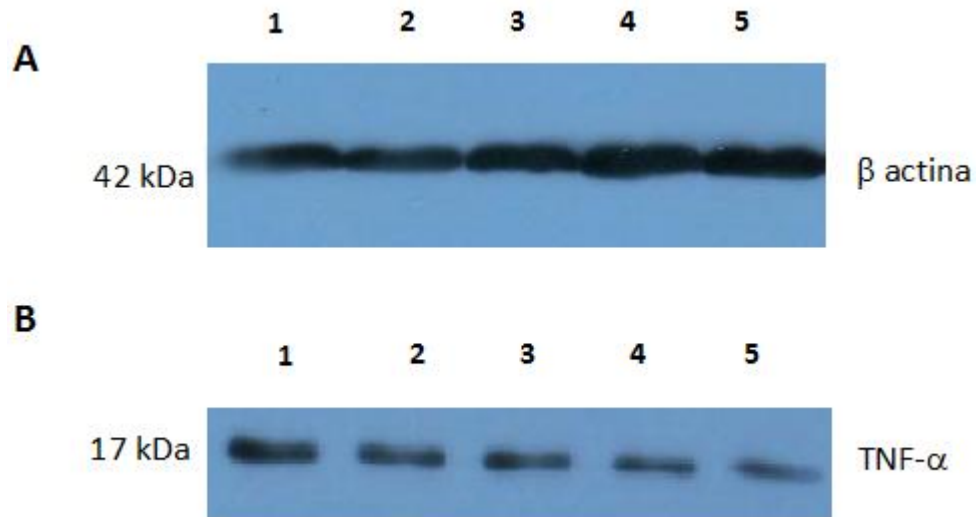
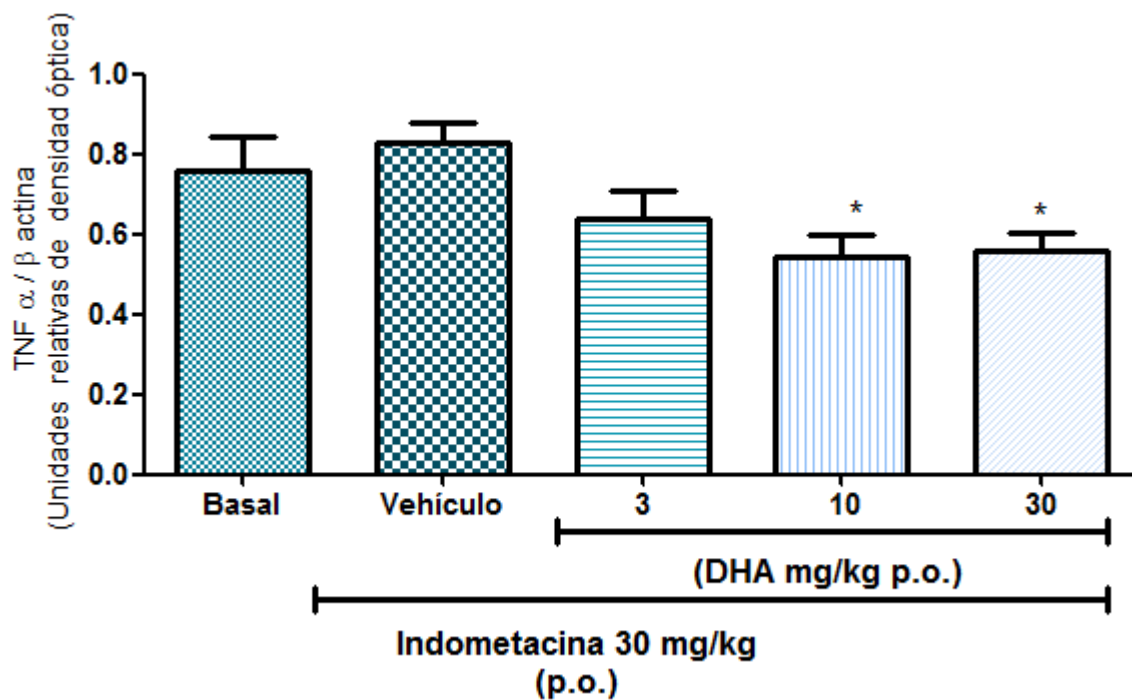


Figura 7. Expresión de TNF- α (B) y β actina (A) en el tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina. Carril 1 en condiciones basales, Carril 2 con indometacina 30 mg/kg, Carril 3 con pre-tratamiento DHA 3 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 4 con pre-tratamiento DHA 10 mg/kg e indometacina 30 mg/kg y Carril 5 con pre-tratamiento DHA 30 mg/kg e indometacina 30 mg/kg.



Gráfica 7. Niveles relativos de TNF- α / β actina en unidades relativas de densidad óptica, después del pre-tratamiento con DHA (3, 10 y 30 mg/kg, p.o.) en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina (30 mg/kg p.o.) en ratas Wistar. Los datos son expresados como la media \pm el error estándar (n = 6). * P \leq 0.05 vs vehículo.

9.8 Determinación de la expresión de IL-1 β por la técnica de Western blot en tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina

Se determinó la expresión de IL-1 β , en las muestras de tejido gástrico de ratas pre tratadas con DHA vía oral (3, 10 y 30 mg/kg) y con inducción de daño gástrico por la administración de indometacina (30 mg/kg), a través de la técnica de Western blot (Figura 8); posteriormente se efectuó un análisis densitométrico y normalización con β actina. Tanto el grupo tratado con vehículo y dañado con indometacina, como los grupos pretratados con DHA y dañados con indometacina reportaron un aumento de los niveles de IL-1 β (0.8598 ± 0.03 , 0.8522 ± 0.04 , 0.8819 ± 0.02 y 0.8542 ± 0.03 unidades relativas de densidad óptica, respectivamente), dicho aumento no presentó diferencia significativa entre ellos, por lo que la administración de DHA no modificó el aumento de niveles de IL-1 β ; mientras que en comparación con los niveles basales (0.6824 ± 0.07 unidades relativas de densidad óptica) todos los grupos presentan una diferencia estadísticamente significativa (Gráfica 8).

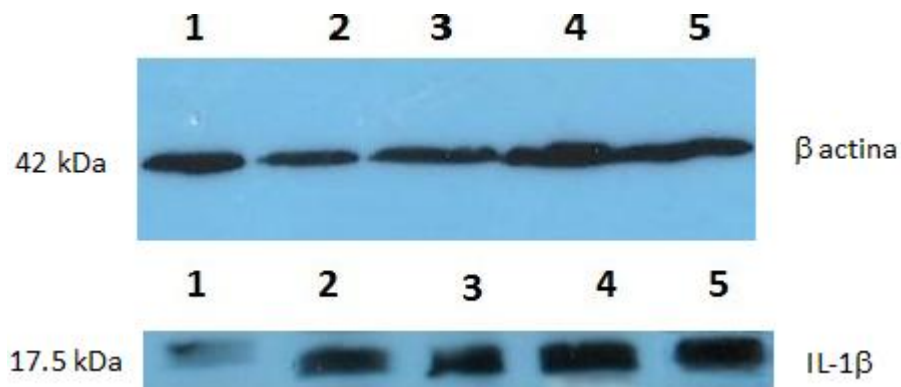
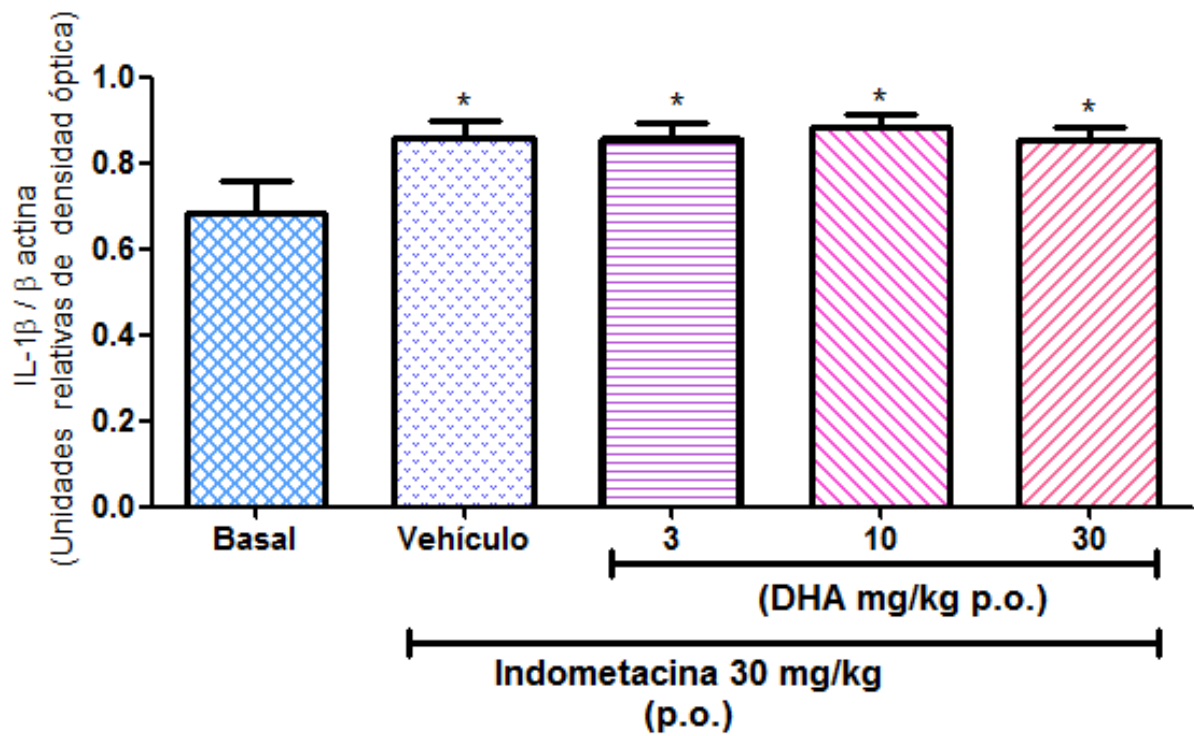


Figura 8. Expresión IL-1 β (B) y de β actina (A) e en el tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina. Carril 1 en condiciones basales, Carril 2 con indometacina 30 mg/kg, Carril 3 con pre-tratamiento DHA 3 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 4 con pre-tratamiento DHA 10 mg/kg e indometacina 30 mg/kg y Carril 5 con pre-tratamiento DHA 30 mg/kg e indometacina 30 mg/kg.



Gráfica 8. Niveles relativos de IL-1 β / β actina en unidades relativas de densidad óptica, después del pre-tratamiento con DHA (3, 10 y 30 mg/kg, p.o.) en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina (30 mg/kg p.o.) en ratas Wistar. Los datos son expresados como la media \pm el error estándar (n = 6). * $P \leq 0.05$ vs Basal.

10. DISCUSIÓN

La toxicidad gastrointestinal asociada con los fármacos anti inflamatorios no esteroideos continua siendo un problema médico y socioeconómico importante a pesar de los recientes avances farmacéuticos. La gastropatía por AINES se considera una "epidemia silenciosa" y, por lo tanto, se enfatiza la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para mejorar la tolerabilidad de los AINES, especialmente en pacientes con ingesta recurrente de los mismos, lo que ha originado un área de intensa investigación al respecto; ya que los AINES constituyen la principal terapia en las condiciones crónicas caracterizadas por inflamación y dolor (David y Wallace, 1997; Abramson y Weaver, 2005). Todos los estudios que reportan la torelabilidad y seguridad de los AINES se han efectuado en modelos animales que se aproximan bastante a los escenarios clínicos en seres humanos; en donde se ha reportado ampliamente que la administración de AINES y particularmente de indometacina generan una variedad de alteraciones en el sistema gastrointestinal que incluyen erosiones, las cuales son frecuentemente encontradas en el antro pero más severas y extensas en el cuerpo del estómago (Wallace and Del Soldato, 2003); así mismo se tienen reportes de que el daño gástrico por AINES es más frecuente y ocurre con mayor severidad en pacientes que hacen uso crónico de los mismos, por lo que esto es una limitación para su utilización (Blackler et al., 2012).

La administración oral de indometacina causa un área de daño gástrico (mm^2) de manera dosis dependiente como se comprobó en nuestros esquemas de administración crónica y aguda; sin embargo, el modelo agudo resulta de mayor utilidad para la evaluación del efecto gastroprotector, ya que a las 3 horas de su administración se reporta un máximo número de lesiones de características puntuales y superficiales en comparación con las lesiones erosivas y diseminadas del esquema crónico, siendo la administración aguda en modelos experimentales la que más se correlaciona en la clínica con las gastropatías por AINES en seres humanos (Wallace and Del Soldato, 2003; Takeuchi, 2012), además de que el tiempo empleado en la administración aguda suele ser suficiente para la expresión y

participación de todas las moléculas implicadas en el daño como lo reportan Antoon y Perry, en 1997.

Otras ventajas para el empleo de la administración aguda son la facilidad con la que se puede llevar a cabo el análisis macroscópico de las lesiones, pues no requiere del uso de equipo especializado, ni la preparación de las muestras o de un especialista para interpretar los resultados, como lo requiere un corte histológico. En nuestra investigación, una de las evidentes ventajas de la administración aguda de indometacina, es la viabilidad de utilizar el mismo tejido después de su análisis macroscópico, para efectuar la cuantificación de PGE₂, LTB₄ y la determinación de las proteínas TNF- α e IL-1 β , con lo que nuestros resultados proporcionan mayor exactitud en cada uno de los aspectos analizados. Además, el modelo de administración aguda tiene claras ventajas, entre ellas la optimización de recursos y principalmente la viabilidad de los grupos durante el desarrollo experimental; ya que autores como Polat en 2010 indican que al administrar dosis altas del agente irritante se genera la pérdida de los animales experimentales debido al efecto gastrotóxico de la indometacina.

La indometacina es uno de los AINES con mayor utilidad en patologías crónicas de carácter inflamatorio, experimentalmente es elegido por causar un mayor área de lesiones gástricas en comparación con otros AINES como lo reportan estudios como el de Suwa et al., en 1987 y Wallace et al., en 1993. Los resultados que obtuvimos en el experimento de la administración aguda de indometacina, nos permiten definir la dosis de 30 mg/kg (p.o.) de indometacina como la óptima para evaluar el efecto gastroprotector del DHA; ya que de las dosis empleadas, fue la que produjo una mayor área de daño gástrico y además esta dosis se encuentra entre el rango de dosis empleadas por autores como Wallace et al., en 1992 para la evaluación del mecanismo involucrado en el daño por AINES, y son consistentes con las dosis empleadas en estudios como Zhang et al., en 2008, Polat et al., en 2011 y Takeuchi en 2012 para evaluar el efecto gastroprotector de diversos compuestos.

Los beneficios de la administración crónica de aceite de pescado han sido reportados ampliamente en sistema nervioso, cardiovascular y en el tracto digestivo; autores como Al-Harbi en 1995, Manjari y Das en 2000 o Bhattacharya en 2006 mencionan que este beneficio se debe a que el aceite de pescado es rico en ácidos grasos poliinsaturados omega -3; ya que entre los principales componentes de este, se encuentran el ácido eicosapentanoico (*EPA*) y el ácido docosahexaenoico (*DHA*), cuyas proporciones varían entre 6 a 12 % para *DHA* y 12 a 19% para *EPA* dependiendo de su origen (Holub, 2002; Tvrzicka et al.,2011). En consecuencia a su variada composición, las investigaciones en este campo, no han podido determinar cuál de todos los ácidos grasos poliinsaturados es el responsable del efecto gastroprotector y por lo tanto determinar con certeza el mecanismo de acción; sin embargo algunos autores como Faust et al., en 1989 proponen como mecanismo la modulación de prostanoïdes y otras moléculas implicadas en el proceso de inflamación del tejido gástrico. Cabe resaltar que en estos estudios, la administración el aceite de pescado se lleva a cabo en esquemas crónicos de entre 6 y 15 días, por medio de alimento enriquecido en cierto porcentaje con el aceite; por lo que no aseguran que la totalidad de aceite de pescado sea consumido y más aún, que el porcentaje de *DHA* en él sea aprovechado en su totalidad (al-Harbi et al., 1995; Bhattacharya et al., 2006). Nuestra investigación, además de concordar con los estudios previos sobre el efecto gastroprotector que poseen los ácidos grasos poliinsaturados; demuestra que la administración de *DHA* como compuesto puro, ejerce efecto gastroprotector ante el daño generado por AINES como la indometacina. Destacando que dicho efecto, es generado en un esquema de una sola administración, ya que la vía de administración empleada en nuestra metodología (vía oral por medio de una cánula orogástrica) asegura que la totalidad del compuesto administrado llegue a estómago.

Al demostrar que la dosis máxima estudiada de *DHA*, genera un efecto gastroprotector equiparable con el cotratamiento más utilizado en la actualidad para la prevención del daño generado por AINES (omeprazol); y sabiendo que el omeprazol ejerce una actividad antsecretora del ácido clorhídrico, se evidencia la necesidad de indagar en el

posible mecanismo de acción del DHA. Además, en nuestro estudio el efecto gastroprotector del DHA, es tan importante como la ejercida por otros fármacos utilizados para el cotratamiento que buscan reducir el daño gástrico generado por AINES. Con este hecho se abre la posibilidad de convertir al DHA en una nueva alternativa terapéutica; especialmente si se toma en consideración que hasta la fecha, no se han reportado efectos tóxicos o adversos de algún tipo asociados a la administración de DHA. Mientras que, como se ha comentado anteriormente, se ha reportado que el uso prolongado de omeprazol está asociado a disbiosis intestinal (Wallace et al., 2011) y a la posibilidad de efectos adversos tales como fracturas de cadera, deficiencia de hierro y cobalamina entre otros (Thomson et al., 2010).

La disminución de los niveles de PGE_2 en el tejido gástrico después de la administración de AINES, es una de las principales causas por las cuales la indometacina y los AINES en general producen daño gástrico (Cryer, 2001); dicho efecto se debe al mecanismo de inhibición que ejercen los AINES sobre las ciclooxigenasas, ya que estos agentes incrementan la secreción de ácido en estómago y disminuyen la capa protectora de moco y bicarbonato (Wallace, 1996; Wallace et al., 2000). En nuestra investigación, se puede observar que el grupo dañado con indometacina a dosis de 30 mg/kg, presenta una disminución de los niveles de PGE_2 en comparación con el grupo en condiciones basales. Así mismo, la administración de DHA en cualquiera de las dosis administradas, no logra revertir la disminución de niveles de PGE_2 que causa la indometacina.

Nuestros resultados concuerdan con ciertos reportes que existen en la literatura, ya que, se ha documentado que la ingesta crónica de aceite de pescado disminuye la producción de eicosanoides como la PGE_2 , debido a la menor disponibilidad del ácido araquidónico como sustrato; también se ha descrito que el EPA, otro PUFA n-3 contenido en el aceite de pescado produce la disminución de PGE_2 de forma dosis dependiente, gracias a que actúa como un inhibidor competitivo de la ciclooxigenasa y permitiendo en algunos modelos la producción de eicosanoides menos potentes que la PGE_2 (Calder, 2009; Faust et al. 1989). Sin embargo, en la actualidad se conoce muy poco acerca de la relación

entre el consumo de DHA y el contenido de PGE₂ en mucosa gástrica, tanto en seres humanos como en modelos experimentales; también se desconoce si existe la interacción directa entre ellos, ya que todos los estudios realizados no utilizan al DHA como compuesto puro, si no como parte del aceite de pescado (Calder, 2007; Calder, 2009).

En nuestros resultados, las dosis de DHA pueden ejercer un efecto gastroprotector de manera dosis dependiente aun cuando los niveles PGE₂ se mantienen bajos; por lo que la supresión de las prostaglandinas en mucosa no necesariamente resulta en formación de úlceras, solo reduce la habilidad de la mucosa para defenderse contra los irritantes tal como lo proponen Wallace et al., en 2000 ; quienes también mencionan que los AINES aumentan la adherencia de leucocitos al endotelio al inhibir a la COX-2. Hasta el momento, los datos obtenidos sugieren que el DHA ejerce su efecto protector a través de la modulación de otros mecanismos o moléculas involucradas en el daño gástrico que no están relacionadas con la producción de prostaglandinas; pues mientras el DHA no es sustrato para la COX-1, los compuestos que son producidos a partir del DHA podrían mediar los eventos oxidativos catalizados por radicales libres, que también están involucrados en el daño a la mucosa gástrica (Serhan et al., 2002).

El daño gástrico generado por AINES involucra entre sus mecanismos, la adherencia de leucocitos al endotelio vascular y su reclutamiento al sitio de lesión, el cual estimulado por el LTB₄ ocasionando una disminución de la perfusión vascular (Wallace and Ma, 2001). Nuestros resultados, por lo tanto concuerdan con otros estudios donde se reporta un incremento del LTB₄ tras la administración de indometacina, y que una disminución en estos niveles correlaciona con el efecto gastroprotector de diversos agentes (Wallace, 2001); este hecho concuerda con nuestros resultados ya que el pre-tratamiento de DHA disminuye los niveles de LTB₄, aunque estos no sean de manera dosis dependiente, lo que implica que el DHA desencadena una serie de procesos que permiten esta gastroprotección. Además, se ha demostrado que otros derivados del ácido araquidónico como las lipoxinas A₄ (LXA₄) generadas en el neutrófilo, reducen la adherencia de

leucocitos al endotelio vascular, ejerciendo esta acción a través de sus receptores acoplados a proteína G entre los que se encuentra ALX (Chiang et al., 2005).

El análisis lipídico de los exudados en fase resolutive de algunos modelos de inflamación, han reportado la presencia de compuestos denominados resolvinas, entre los que se encuentran las resolvinas de la serie D (RvD) (Serhan, 2007 y 2006). El estudio realizado por Serhan et al., en 2007, describe que la biosíntesis de resolvinas se lleva a cabo a partir del DHA presente en la membrana fosfolipídica, que se oxigena en el carbono 17 por acción de LO-15, convirtiéndose en un compuesto denominado 17S-H(p)DHA después, por la acción de LO-5 presente en polimorfonucleares es convertido a 4 tipos diferentes de resolvinas (RvD1, RvD2, RvD3 y RvD4). Estas Resolvinas son mediadores de carácter lipídico que diversas investigaciones reportan como los responsables de la limitación de la infiltración de polimorfonucleares en modelos de inflamación, por lo que presentan acciones protectoras en contra del daño tisular mediado por leucocitos (Seki, et al., 2010). Diversas investigaciones como la efectuada en ratones con peritonitis inducida por ligadura y punción cecal, reportan que la resolvina D2 a dosis de 100 mM disminuye la interacción de leucocitos con el endotelio por la modulación directa de los receptores de moléculas de adhesión en los neutrófilos y en modelos in vitro, la resolvina D2 estimula a los macrófagos para efectuar la fagocitosis, con lo que contribuye a la remoción de restos celulares y polimorfonucleares apoptóticos (Spite et al., 2009). Por lo tanto, las resolvinas derivadas del DHA ejercen sus acciones en parte, por la modulación de la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos y la producción de mediadores que intervienen en la interacción del leucocito con el endotelio (Seki, et al., 2010).

Además, autores como Serhan et al., en 2010 y Weylandt et al., en 2012, mencionan que se ha identificado que las resolvinas interactúan con los receptores AXL y ChemR23 en la superficie del neutrófilo, por lo que este podría ser un posible mecanismo por el cual el DHA ejerce su efecto gastroprotector. Siendo, descritos dos receptores para resolvina D1, uno de ellos el GPR32 en seres humanos y el otro denominado ALX, un receptor para la Lipoxina A₄ que además de mediar la adherencia del leucocito al endotelio, se encuentra

involucrado en la actividad fagocítica del macrófago (Weylandt et al., en 2012). De esta forma, la resolvina D1 derivada del DHA sería parcialmente responsable del efecto gastroprotector del DHA, sin embargo consideramos que es necesaria una mayor comprensión de sus mecanismos de acción para poder asociarlo definitivamente a dicho efecto.

Entre las principales moléculas involucradas en el daño gástrico generado por AINES, el TNF- α ha figurado como uno de los participantes más activos identificados hasta el momento tal como lo indica Wallace en 1996, ya que el TNF- α está encargado del reclutamiento de leucocitos al endotelio vascular. Sin embargo, nuestros resultados muestran que los niveles basales de TNF- α y los niveles de TNF- α del grupo de daño no muestran una diferencia significativa; estos resultados difieren con lo reportado por Ko y Leung en 2010, en el cual no existe expresión de TNF- α en el grupo basal, pero si una sobreexpresión en el grupo dañado, por lo que se debe tener en cuenta que existen una diversa cantidad de células que pueden producir TNF- α , como lo son las células endoteliales vasculares (Korzekwa et al., 2011); aunque los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con estudios como el de Sunanliganon et al., en 2012 donde se reportan niveles basales de TNF- α que no presentan diferencia significativa con respecto a un grupo dañado, en el cual se esperaba un incremento de mediadores pro inflamatorios por infección con *H. pylori*, cabe mencionar que en dicho estudio miden los niveles séricos de TNF- α . Por lo que, nuestra investigación al estudiar directamente la expresión de TNF- α en el tejido gástrico, logra demostrar que el aumento sutil de dicha molécula tras el daño generado por indometacina, que aunque no es estadísticamente significativo, es suficiente para lograr un daño evidente a la mucosa; esto debido a que, el TNF- α es una de las proteínas que puede ejercer sus efectos en una amplia gama de tejidos y que sus efectos biológicos dependen de su concentración relativa en dichos tejidos, el tiempo de exposición al TNF- α del mismo e incluso la presencia de otros mediadores con los cuales actúe de forma sinérgica (Camussi et al., 1991). Dicho efecto se desencadena por la unión del TNF- α con su receptor TNFR (Nagata, 1997), e incluso se han identificado una serie de proteínas

que participan en forma de cascada para enviar los mensajes del TNF- α a nivel intracelular, en el proceso conocido como transducción; las proteínas que participan en esta cascada de señales no son específicas pudiendo actuar como potenciadores de la respuesta celular al TNF- α (Parameswaran y Patial, 2010; Sun, 2011) con lo que se evidencia aún más que una pequeña elevación de los niveles de TNF- α es capaz de desencadenar una respuesta compleja.

Es importante señalar que los resultados obtenidos, nos muestran que el pre-tratamiento con DHA disminuye dichos niveles de TNF- α , comparados con el grupo de daño (tratado con el vehículo de DHA, el aceite de oliva) e incluso con el grupo basal; este resultado concuerda con diversos estudios clínicos en los que se reporta que la administración de aceite de pescado disminuye los niveles de TNF- α en pacientes con patologías de carácter inflamatorio (Tayyebi-Khosroshahi et al., 2012) y en el que inclusive se les administraba algún tipo de AINE (Gheita et al., 2012); así también, ensayos *in vitro* como el de Zhao et al., en 2004 indican que el EPA y DHA logran una disminución del TNF- α en cultivos de monocitos humanos (THP-1), en donde también se reporta que EPA logra reducir la inducción mediada por LPS de TNF- α al prevenir la activación de NF- κ B; siendo este último, un posible mecanismo de acción a través del cual el DHA también disminuya los niveles de TNF- α . Con lo que nuestros resultados, permiten establecer un antecedente sobre el DHA y su relación con el TNF- α en un modelo animal de daño gástrico, y no solamente asociado a un esquema de administración crónico de aceite de pescado como en estudios previos. Así mismo, cabe destacar que la disminución de TNF- α , pudiera contribuir con la disminución de los niveles de LTB₄, aunque el mecanismo principal por el cual ocurre la disminución de LTB₄ se explica por medio de la acción de las resolvinas derivadas del DHA.

La IL-1 β es un participante importante en los procesos que regulan al sistema inmune de la mayoría de los tejidos, participando de forma activa en la defensa de la mucosa gástrica; autores como Martin y Wallace en 2006 y Watanabe et al., en 1997

mencionan que los niveles de IL-1 β se elevan en tejido gastrointestinal de modelos inflamatorios, además de permitir la activación de moléculas de adhesión y la inducción de otras citocinas. Los resultados de nuestro estudio muestran que la inducción de daño gástrico con indometacina, provoca un aumento los niveles de IL-1 β de manera significativa con respecto al grupo basal; esto es consistente con estudios como el de Zhang et al., en 2008 en el que la administración de indometacina provoca un aumento en los niveles de IL-1 β , debido a que IL-1 β es secretada en circunstancias donde la respuesta inflamatoria está involucrada (Lopez-Castejon y Brough, 2011); es decir, que este aumento está directamente relacionado con la expresión de moléculas de adhesión y la activación de otras células mediadoras del proceso inflamatorio (Beck and Wallace, 1997), resaltando que la disminución del flujo sanguíneo por la extravasación de leucocitos forma parte de los mecanismos por los cuales la indometacina daña la mucosa gástrica (Wallace, 2000) .

Por otra parte, nuestros resultados indican que la administración de DHA en cualquiera de las dosis administradas, no logra modificar el aumento de los niveles de IL-1 β que causa la indometacina; con respecto a estos resultados, estudios como el de Kremer et al., 1995 indican que la administración crónica de aceite de pescado disminuye los niveles de citocinas como la IL-1 β en pacientes con artritis reumatoide, sin embargo, también existe una variedad de estudios como el de Gogos et al., (1998) en el que los niveles de IL-1 β y otras citocinas en células mononucleares de pacientes sanos no se modifican tras la administración de EPA y DHA o el de Miles et al., en 2004 donde no se reporta una modificación de los niveles de citocinas tras la administración de EPA y DHA en pacientes sanos; por lo que los estudios realizados hasta ahora sobre los efectos de la administración crónica de ácidos grasos poliinsaturados omega -3 en la producción de citoquinas, no permiten generar conclusiones sobre el efecto del DHA en los niveles de IL-1 β , especialmente en daño gástrico por AINES, con lo que continúan siendo objeto de investigación (Sijben and Calder, 2007). Basados en los resultados que obtuvimos, podemos decir que el efecto gastroprotector que ejerce el DHA, no está directamente relacionado con la modulación de los niveles de IL-1 β , pero podría estar relacionado con

otras moléculas involucradas en la expresión de moléculas de adhesión e incluso estar relacionado en la modulación de otras citocinas.

Recientemente, Wallace et al., en 2011 mencionan que con respecto al tracto gastrointestinal superior, la IL-1 incrementa la resistencia al daño a través de estimular la expresión de COX-2 y la liberación de ON, hechos que resultan contradictorios a su acción sobre la adherencia de leucocitos; por lo que el mecanismo por el cual la IL-1 β ejerce esta resistencia al daño gástrico y su relación con la inducción de otras citocinas, se encuentra relacionado con su efecto sobre la disminución en la secreción de ácido clorhídrico, así como su capacidad para aumentar la producción de PGE₂ en un proceso de autorregulación tal como lo indican Perreti et al., en 1992; sin embargo los niveles a los cuales IL-1 β ejerce un efecto gastroprotector se desconocen hasta el momento.

11. CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que llegamos, con los resultados obtenidos son:

- El modelo de daño agudo generado por la administración de indometacina a dosis de 30 mg/kg es adecuado para valorar el efecto gastroprotector.
- El DHA (ácido docosahexaenoico) ejerce un efecto gastroprotector de manera dosis dependiente en el daño gástrico inducido por indometacina en la rata.
- Este efecto es equiparable con el efecto ejercido por fármacos como omeprazol, utilizado en el cotratamiento del daño gástrico generado por AINES, con lo que se abre la puerta para su utilización en coterapia.
- El DHA no es capaz de revertir la reducción de los niveles de PGE₂ en tejido gástrico de rata causada por la administración de indometacina, por lo que su mecanismo de acción no está directamente involucrado con la interacción con PGE₂.
- El DHA restablece los niveles basales de LTB₄ en tejido gástrico de rata después de la administración de indometacina, sugiriendo que su mecanismo de gastroprotección está relacionado con la interacción con moléculas involucradas en la inflamación.
- El DHA disminuye los niveles basales de TNF- α en tejido gástrico de rata después de la administración de indometacina, sugiriendo que su mecanismo de gastroprotección está relacionado con la reducción de TNF- α .
- El DHA no es capaz de revertir la reducción de los niveles de IL-1 β en tejido gástrico de rata causada por la administración de indometacina, por lo que se sugiere que su mecanismo de acción no involucra directamente la interacción con IL-1 β .

12. PERSPECTIVAS

- Evaluar la participación de otras moléculas implicadas en el daño gástrico generado por AINES, como las moléculas de adhesión celular ICAM-1 y VCAM, así su comportamiento en el pre-tratamiento con DHA; esto a través de técnicas de inmunohistoquímica y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.
- Realizar una valoración del efecto citoprotector del DHA en el daño generado por la indometacina a nivel intestinal, así como el efecto citoprotector que podría generar el DHA frente al daño generado por indometacina y la coadministración de omeprazol a nivel intestinal.

13. REFERENCIAS

- Abramson, S.B., Weaver, A.L., 2005. Current state of therapy for pain and inflammation. *Arthritis Research & Therapy*, 7(4), pp. S1-S6.
- Aihara, E., Hayashi, M., Sasaki, Y., Kobata, A., Takeuchi, K., 2005. Mechanisms underlying capsaicin-stimulated secretion in the stomach: comparison with mucosal acidification. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(1), pp.423-432.
- Allen, A., Flemström, G., 2005. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin; *The American Journal of Physiology*, 288, pp. C1–C19.
- Al-Harbi, M.M., Islam, M.W., al-Shabanah, O.A., al-Gharably, N.M., 1995. Effect of acute administration of fish oil (omega-3 marine triglyceride) on gastric ulceration and secretion induced by various ulcerogenic and necrotizing agents in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), pp. 553-558.
- Antoon, J.S., Perry, M.A., 1997. Role of neutrophils and mast cells in acute indomethacin-induced small bowel injury in the rat. *Journal of Gastroenterology*, 32(6), pp.747-757.
- Applegate, K.R., Glomset, J.A., 1986. Computer-based modeling of the conformation and packing properties of docosahexaenoic acid. *The Journal of Lipid Research*, 27(6), pp. 658-680.
- Appleyard, C.B., McCafferty, D.M., Tigley, A.W., Swain, M.G., Wallace, J.L., 1996. Tumor necrosis factor mediation of NSAID-induced gastric damage: role of leukocyte adherence. *American Journal of Physiology*, 270 (1 Pt 1), pp.G42-G48.
- Arnold, C., Konkel, A., Fischer, R., Schunck W.H., 2010. Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pharmacology Reports*, 62(3), pp. 536-547.
- Asako, H., Kubes, P., Wallace, J., Gaginella, T., Wolf, R.E., Granger, D.N., 1992. Indomethacin-induced leukocyte adhesion in mesenteric venules: role of lipoxygenase products. *American Journal of Physiology*, 262(5 Pt 1), pp.G903-G908.
- Atay, S., Tarnawski, A.S., Dubois, A., 2000. Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 61(3-4), pp.105-124.

Babb, R.R., 1992. Gastrointestinal complications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The Western Journal of Medicine*, 157 (4), pp.444-447.

Bastaki, SM., Wallace, JL., 1999. Pathogenesis of nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy: Clues to preventative therapy. *The Canadian Journal of Gastroenterology*, 13(2), pp. 123-127.

Bhattacharya, A., Ghosal, S., Bhattacharya, S.K., 2006. Effect of fish oil on offensive and defensive factors in gastric ulceration in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 74(2), pp. 109-116.

Beck, P.L., Wallace, J.L., 1997. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Mediators of inflammation*, 6(2), pp 95-103.

Becker, J.C., Domschke, W., Pohle, T., 2004. Current approaches to prevent NSAID – induced gastropathy – COX selectivity and beyond. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 58(6), pp. 587-600.

Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Chattopadhyay, I., Varadaraj, A., Ali, E., Banerjee, R.K., 2003 . A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), pp.10993-11001.

Blackler, R., Syer, S., Bolla, M., Ongini, E., Wallace, J.L., 2012. Gastrointestinal-sparing effects of novel NSAIDs in rats with compromised mucosal defence. *PLoS One*. 7(4), pp. e35196. doi: 10.1371/journal.pone.0035196.

Brunton B., Chabner, B., 2012. Goodman & Gilman. las bases farmacológicas de la terapéutica. 12ª Edición. México: McGraw-Hill. Edición 2012. Pag. 962.

Burdge, G.C., Jones, A.E., Wootton, S.A., 2002. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids are the principle products of alpha-linolenic acid metabolism in young men. *British Journal of Nutrition*, 88(4), pp. 355-363.

Burdge, G.C., 2004. Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 7(2), pp. 137-144.

Burke, M.D., Falzon, M., Milton, A.S., 1983. Decreased hepatic microsomal cytochrome P450 due to indomethacin: protective roles of 16,16-dimethylprostaglandin F2 alpha and inducing agents. *Pharmacotherapy*, 3(6), pp. 324-333.

Calder, P.C., 2007. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 77(5-6), pp. 327-335.

Calder, P.C., 2009. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*, 91 (6), pp 791- 795.

Camussi, G., Albano, E., Tetta, C., Bussolino, F., 1991. The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *European Journal of Biochemistry*, 202(1), pp. 13-14.

Cavallini, M.E., Andreollo, N.A., Metze, K., Araújo, M.R., 2006. Omeprazole and misoprostol for preventing gastric mucosa effects caused by indomethacin and celecoxib in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 21(3), pp. 168-176.

Chávez-Piña, A.E., Vong, L., McKnight, W., Dickey, M., Zanardo, R.C., Ortiz, M.I., Castañeda-Hernández, G., Wallace, J.L., 2008. Lack of effects of acetaminophen on signalling pathways for leukocyte adherence may explain its gastrointestinal safety. *British Journal of Pharmacology*, 155 (6), pp.857- 864.

Chen, K., Pittman, R.N., Popel, A.S., 2008. Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(7), pp. 1185-1198.

Chiang, N., Arita, M., Serhan, C.N., 2005. Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 73(3-4), PP. 163-177.

Christensen, M.S., Høy, C.E., Becker, C.C., Redgrave, T.G., 1995. Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), and decanoic acids: dependence on intramolecular triacylglycerol structure. *The American journal of clinical nutrition*, 61 (1), pp. 56-61.

Cruvinel, W., Mesquita, D., Araújo, J.A., Catelan, T.T., de Souza, A.W., da Silva, N.P., Andrade, L.E., 2010. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev Bras Reumatol*. 50(4), pp. 434-461.

Cryer, B., 2001. Mucosal defense and repair. Role of prostaglandins in the stomach and duodenum. *Gastroenterology Clinics of North America*, 30(4), pp. 877-894.

Davies, N.M., Wallace, J.L., 1997. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal toxicity: new insights into an old problem. *Journal of Gastroenterology*, 32(1), pp. 127-133.

Drake, R.I., Wayne, V., Mitchell, W.M., 2007. *Gray anatomía para estudiantes*. España: Elsevier. pp. 272-273.

Duffield, J.S., Hong, S., Vaidya, V.S., Lu, Y., Fredman, G., Serhan, C.N., Bonventre, J.V., 2006. Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury. *The Journal of Immunology*, 177(9), pp. 5902-5911.

Eder, C., 2009. Mechanisms of interleukin-1beta release. *Inmunobiology*. 214 (17), pp. 543-553.

Faust, T., Redfern, J.S., Lee, E., Feldman, M., 1989. Effects of fish oil on gastric mucosal 6-keto-PGF1 alpha synthesis and ethanol-induced injury. *American Journal of Physiology*, 257(1 Pt 1), pp. G9-G13.

Fiorucci, S., Santucci, L., Distrutti, E., 2007. NSAIDs, coxibs, CINOD and H2S-releasing NSAIDs: what lies beyond the horizon. *Digestive and Liver Disease*, 39 (12), pp. 1043-1051.

Fosbøl, E.L., Folke, F., Jacobsen, S., Rasmussen, J.N., Sørensen, R., Schramm, T.K., Andersen, S.S., Rasmussen, S., Poulsen, H.E., Køber, L., Torp-Pedersen, C., Gislason, G.H., 2010. Cause-specific cardiovascular risk associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs among healthy individuals. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*, 3(4), pp. 395-405.

Gheita, T., Kamel, S., Helmy, N., El-Laithy, N., Monir, A., 2012. Omega-3 fatty acids in juvenile idiopathic arthritis: effect on cytokines (IL-1 and TNF- α), disease activity and response criteria. *Clinical Rheumatology*, 31 (2), pp. 363-366.

Geneser, F., et al., 2005. *Histología*. 3ª edición. México: Editorial Panamericana. pp. 488-496).

Gogos, C.A., Ginopoulos, P., Salsa, B., Apostolidou, E., Zoumbos, N.C., Kalfarentzos, F., 1998. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids plus vitamin E restore immunodeficiency and prolong survival for severely ill patients with generalized malignancy: a randomized control trial. *Cancer*, 82(2), pp. 395-402.

Holub, B.J., 2002. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *Canadian Medical Association Journal*, 166(5), pp. 608-615.

Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad, 2009. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Disponible en: <<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/proyectos/continuas/vitales/BD/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>> [Accesado el 2 Septiembre 2011].

Iwata, F., Joh T., Ueda, F., Yokoyama Y., Itoh, M., 1998. Role of gap junctions in inhibiting ischemia reperfusion injury of rat gastric mucosa. *American Journal of Physiology*, 275 (5 Pt 1), pp. G883-G888.

Johansson, C., Bergström, S., 1982. Prostaglandin and protection of the gastroduodenal mucosa. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, (77), pp.21-46.

Ko, J.K., Leung, C.C., 2010. Ginger extract and polaprezinc exert gastroprotective actions by anti-oxidant and growth factor modulating effects in rats. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 25 (12): 1861-1868. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06347.x.

Kato, S., Aihara, E., Yoshii, K., Takeuchi, K., 2005. Dual action of prostaglandin E2 on gastric acid secretion through different EP-receptor subtypes in the rat. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiologi*, 289 (1), pp. G64-G69.

Kopic, S., Murek, M., Geibel, J.P., 2009. Revisiting the parietal cell. *The American Journal of Physiology*, 298(1), pp. C1-C10.

Korzekwa, A.J., Bodek, G., Bukowska, J., Blitek, A., Skarzynski, D.J., 2011. Characterization of bovine immortalized luteal endothelial cells: action of cytokines on production and content of arachidonic acid metabolites. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 24 (9), pp. 27.

Kremer, J.M., Lawrence, D.A., Petrillo, G.F., Litts, L.L., Mullaly, P.M., Rynes, R.I., Stocker, R.P., Parhami, N., Greenstein, N.S., Fuchs, B.R., 1995. Effects of high-dose fish oil on rheumatoid arthritis after stopping nonsteroidal antiinflammatory drugs. Clinical and immune correlates. *Arthritis & Rheumatism*, 38 (8), pp. 1107-1114.

Kunkel, S.L., Wiggins, R.C., Chensue, S.W., Larrick, J., 1986. Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 137(1), pp. 404-410.

Laine, L., Takeuchi, K., Tarnawski, A., 2008. Gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to Bedside. *Gastroenterology*, 135(1), pp. 41-60.

Lanas, A., 2008. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Arthritis Research & Therapy*, (10)2, pp. S4.

Latimer, N., Lord, J., Grant, R.L., O'Mahony, R., Dickson, J., Conaghan, P.G., 2009. National Institute for Health and Clinical Excellence Osteoarthritis Guideline Development Group. Cost effectiveness of COX 2 selective inhibitors and traditional NSAIDs alone or in combination with a proton pump inhibitor for people with osteoarthritis, *British Medical Journal*, 14(339), pp. b2538.

Li, Q., Zhang, Q., Wang, C., Tang, C., Zhang, Y., Li, N., Li, J., 2011. Fish oil enhances recovery of intestinal microbiota and epithelial integrity in chronic rejection of intestinal transplant. *PLoS One*, [online]. Disponible en: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0020460>> [Accesado el 8 Septiembre 2011].

Leite, A.Z., Sipahi, A.M., Damião, A.O., Coelho, A.M., Garcez, A.T., Machado, M.C., Buchpiguel, C.A., Lopasso, F.P., Lordello, M.L., Agostinho, C.L., Laudanna, A.A., 2001. Protective effect of metronidazole on uncoupling mitochondrial oxidative phosphorylation induced by NSAID: a new mechanism. *Gut*, 48(2), pp. 163-167.

Lopez-Castejon, G., Brough, D., 2011. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(4), pp.189-195.

Lukiw, W.J., Bazan, N.G., 2008. Docosahexaenoic Acid and the Aging Brain. *Journal of Nutrition*, 138(12), pp. 2510–2514.

Manjari, V., Das, U.N., 2000. Effect of polyunsaturated fatty acids on dexamethasone-induced gastric mucosal damage. *Prostaglandins Leukotriene Essential Fatty Acids*, 62(2), pp.85-96.

Martin, G.R., Wallace, J.L., 2006. Gastrointestinal Inflammation: A Central Component of Mucosal Defense and Repair. *Experimental Medicine and Biology*, 231(2), pp. 130-137.

Martin, G.R., Perretti, M., Flower, R.J., Wallace, J.L., 2008. Annexin-1 modulates repair of gastric mucosal injury. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294 (1) , pp. G764-G769.

Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J., 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell*, 10(2), pp.417-426.

Matsui, H., Shimokawa, O., Kaneko, T., Nagano, Y., Rai, K., Hyodo, I., 2011. The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries

in stomach and small intestine. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 48(2), pp. 107-111.

Mayurasakorn, K., Williams, J.J., Ten, V.S., Deckelbaum, R.J., 2011. Docosahexaenoic acid: brain accretion and roles in neuroprotection after brain hypoxia and ischemia. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 14(2), pp. 158-167.

Maity, P., Bindu, S., Dey, S., Goyal, M., Alam, A., Pal, C., Mitra, K., Bandyopadhyay, U., 2009. Indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, develops gastropathy by inducing reactiveoxygen species mediated mitochondrial pathology and associated apoptosis in gastric mucosa: a novel role of mitochondrial aconitase oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(5), pp. 3058-3068.

Medeiros, J.V., Gadelha, G.G., Lima, S.J., Garcia, J.A., Soares, P.M., Santos, A.A., Brito, G.A., Ribeiro R.A., Souza, M.H., 2008. Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. *British Journal of Pharmacology*, 153(4), pp.721-727.

Miles, E.A., Banerjee ,T., Calder, P.C., 2004. The influence of different combinations of gamma-linolenic, stearidonic and eicosapentaenoic acids on the fatty acid composition of blood lipids and mononuclear cells in human volunteers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 70(6), pp. 529-538.

Monteiro, A.P., Pinheiro, C.S., Luna-Gomes, T., Alves, L.R., Maya-Monteiro, C.M., Porto, B.N., Barja-Fidalgo, C., Benjamim, C.F., Peters-Golden, M., Bandeira-Melo, C., Bozza, M.T., Canetti, C., 2011. Leukotriene B4 mediates neutrophil migration induced by heme. 186(11), pp. 6562-6567.

Morbilidad de Gastropatías en México 2009. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE). Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/inicio_anuarios.html> [Accesado el 3 Septiembre 2011].

Morisseau, C., Inceoglu, B., Schmelzer, K., Tsai, H.J., Jinks, S.L., Hegedus, C.M., Hammock, B.D., 2011. Naturally occurring monoepoxides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are bioactive antihyperalgesic lipids. *The Journal of Lipid Research*, 51(12), pp. 3481-3490.

Nagata, S., 1997. Apoptosis by death factor. *Cell Press*, 88 (3), pp. 355-365.

Nauroth, J.M., Liu, Y.C., Van Elswyk, M., Bell, R., Hall, E.B., Chung, G., Arterburn, L.M., 2010. Docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA_n-6) algal oils reduce inflammatory mediators in human peripheral mononuclear cells in vitro and paw edema in vivo. *Lipids*, 45(5), pp. 375-384.

Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., 1999. Prostanoid receptors : structures, properties, and functions. *Physiological Reviews*, 79(4):1193-1226.

Navarrete, A., Oliva, I., Sánchez-Mendoza, M.E., Arrieta, J., Cruz-Antonio, L., Castañeda-Hernández, G., 2005. Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52 (12). pp. 1629-1636.

Newton, R.C., Decicco, C.P., 1999. Therapeutic potential and strategies for inhibiting tumor necrosis factor- α . *Journal of medicinal chemistry*, 42(13), pp. 2295-2314.

Ohno, T., Yamamoto, K., Takeuchi, K., Okabe, S., 1987. 16,16-Dimethyl prostaglandin E₂ protects gastric mucosal surface epithelial cells from indomethacin-induced damage in rats. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 43(2), pp. 213-220.

Ohnishi, H., Miyahara, N., Gelfand, E.W., 2008. The role of leukotriene B₄ in allergic diseases. *Allergology International*, 57(4), pp.291-298.

Parameswaran, N., Patial, S., 2010. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 20 (2), pp. 87-103.

Perretti, M., Mugridge, K.G., Wallace, J.L., Parente, L., 1992. Reduction of aspirin-induced gastric damage in rats by interleukin-1 beta: possible involvement of endogenous corticosteroids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 261(3), pp. 1238-1247.

Polat, B., Suleyman, H., Alp, H.H., 2010. Adaptation of rat gastric tissue against indomethacin toxicity. *Chemico Biological Interactions*, 186(1), pp. 82-89.

Polat, B., Albayrak, Y., Suleyman, B., Dursun, H., Odabasoglu, F., Yigiter, M., Halici, Z., Suleyman, H., 2011. Antiulcerative effect of dexmedetomidine on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Pharmacological reports*, 63 (2), pp. 183-196.

Rao, P., Knaus, E.E., 2008. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(2):81s-110s.

Sahoo, M., Ceballos-Olvera, I., del Barrio, L., Re, F., 2011. Role of the inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in bacterial infections. *The Scientific World Journal*, (2011) 11, pp. 2037-2050.

Sargent, J.R., 1997. Fish oils and human diet. *British Journal of Nutrition*, 78 (1), pp S5-S13.

Seki, H., Sasaki, T., Ueda, T., Arita, M., 2010. Resolvins as regulators of the immune system. *Scientific World Journal*. 10, pp. 818-831. doi: 10.1100/tsw.2010.72.

Seo, P.J., Kim, N., Kim, J.H., Lee, B.H., Nam, R.H., Lee, H.S., Park, J.H., Lee, M.K., Chang, H., Jung H.C., Song, I.S., 2012. Comparison of Indomethacin, Diclofenac and Aspirin-Induced Gastric Damage according to Age in Rats. *Gut and Liver*, 6(2), pp. 210-217.

Serhan, C.N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S.P., Devchand, P.R., Mirick, G., Moussignac, R.L., 2002. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *The Journal of Experimental Medicine*, 196 (8), pp. 1025-1037.

Serhan, C.N., 2006. Novel Chemical Mediators in the Resolution of Inflammation: Resolvins and Protectins. *Anesthesiology Clinics of North America*, 24(2), pp. 341-364.

Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O'Neill, L., Perretti, M., Rossi, A.G., Wallace, J.L., 2007. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms; *The FASEB Journal*, 21(2), pp.325-332.

Serhan, C.N., 2010. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not?. *The American Journal of Pathology*, 177(4), pp.1576-1591.

Sijben, J.W., Calder, P.C., 2007. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. *proceedings of the Nutrition Society*, 66 (2), PP. 237-259.

Schuchardt, J.P., Schneider, I., Meyer, H., Neubronner, J., von Schacky, C., Hahn, A., 2011. Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations--a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil. *Lipids in health and disease*, (10), pp. 145.

Spite, M., Norling, L.V., Summers, L., Yang, R., Cooper, D., Petasis, N.A., Flower, R.J., Perretti, M., Serhan, C.N., 2009. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature*, 461(7268), pp. 1287-91

Süleyman, H., Demircan, B., Karagöz, Y., 2007. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacological Reports Online*, 59(3), pp.247-258.

Sunanliganon, C., Thong-Ngam, D., Tumwasorn, S., Klaikeaw, N., 2012. *Lactobacillus plantarum* B7 inhibits *Helicobacter pylori* growth and attenuates gastric inflammation. *World Journal of Gastroenterology*, 18 (20), pp. 2472-2480.

Sun, S.C., 2011. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell research*, 21 (1), pp. 71-85. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(13), pp. 9323-9334.

Suwa, T., Urano, H., Kohno, Y., Suzuki, A., Amano, T., 1987. Comparative studies on the gastrointestinal lesions caused by several nonsteroidal anti-inflammatory agents in rats. *Agents and Actions*, 21 (1-2), pp. 167-172.

Tayyebi-Khosroshahi, H., Houshyar, J., Dehgan-Hesari, R., Alikhah, H., Vatankhah, A.M., Safaeian, A.R., Zonouz, N.R., 2012 Effect of treatment with omega-3 fatty acids on C-reactive protein and tumor necrosis factor- α in hemodialysis patients. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 23 (3), pp. 500-506.

Takeuchi, K., Kato, S., Amagase, K., 2010. Prostaglandin EP receptors involved in modulating gastrointestinal mucosal integrity. *Journal of Pharmacological Sciences*, 114(3), pp.248-261.

Takeuchi, K., 2012. Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. *World Journal of Gastroenterology*, 18 (18), pp. 2147-2160.

Tanaka, A., Hase, S., Miyazawa, T., Ohno, R., Takeuchi, K., 2002 .Role of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibition in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal damage in rats: relation to various pathogenic events. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(3), pp. 1248-1254.

Thomson, A.B., Sauve, M.D., Kassam, N., Kamitakahara, H., 2010. Safety of the long-term use of proton pump inhibitors. *World Journal of Gastroenterology*, 16 (19), pp. 2323-2330.

Tvrzicka,E., Kremmyda, L.S., Stankova, B., Zak, A.,2011. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 155 82), pp. 117-130.

Uchida, M., Matsueda, K., Shoda, R., Muraoka, A., Yamato, S., 2001. Nitric oxide donating compounds inhibit HCl-induced gastric mucosal lesions mainly via prostaglandin. *Japanese Journal of Physiology*, 85(2), pp. 133-138.

Wallace, J.L., Keenan, C.M., Granger, D.N., 1990. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *American Journal of Physiology*, 259 (3 Pt 1), pp.G462-G467.

Wallace, J.L., McKnight, G.W., Donigi-Gale, D., Shoupe, T.S., Granger, D.N., 1993. Protective effects of PF-10040 in experimental NSAID-gastritis: role of leukocytes, leukotrienes and PAF. *Journal of lipid mediator*, 7 (2), pp. 183-196.

Wallace, J.L., Granger, D.N., 1996. The cellular and molecular basis of gastric mucosal Defense; *The FASEB Journal*, 10(7), pp. 731-740.

Wallace, J.L., 2000. How do NSAIDs cause ulcer disease?. *Baillieres Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 14 (1), pp. 147-159.

Wallace, J.L., McKnight, W., Reuter, B.K., Vergnolle, N., 2000. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*, 119(3), pp. 706-714.

Wallace, J.L., 2001. Pathogenesis of NSAID induced gastroduodenal mucosal injury. *Best practice & research, Clinical gastroenterology*, 15 (5), pp. 691-703

Wallace, J.L., Ma, L., 2001. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Experimental Biology and Medicine*, 226 (11), pp. 1003-1015.

Wallace, J.L., Del Soldato, P., 2003. The therapeutic potential of NO-NSAIDs. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 17 (81), pp. 11-20.

Wallace, J.L., Zamuner, S., McKnight, W., Dicay, M., Mencarelli, A., del Soldato, P., Fiorucci, S., 2004. Aspirin, but not NO-releasing aspirin (NCX-4016), interacts with selective COX-2 inhibitors to aggravate gastric damage and inflammation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(1), pp. G76-G81.

Wallace, J.L., 2006. COX-2: a pivotal enzyme in mucosal protection and resolution of inflammation. *Scientific World Journal*, 25(6), pp. 577-588.

Wallace, J.L., 2008. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? . *Physiological Reviews*, 88(4), pp. 1547-1565.

Wallace J.L., Syer S., Denou E., de Palma G., Vong L., McKnight W., Jury J., Bolla M., Bercik P., Collins S.M., Verdu E., Ongini E., 2011. Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis. *Gastroenterology*, 141 (4), pp. 1314-1322.

Watson, D.J., Harper, S.E., Zhao, P.L., Quan, H., Bolognese, J.A., Simon, T.J., 2000. Gastrointestinal tolerability of the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor rofecoxib compared with nonselective COX-1 and COX-2 inhibitors in osteoarthritis. *Archives of Internal Medicine*, 160(19), pp.2998-3003.

Watanabe,T., Arakawa, T., Fukuda, T., Higuchi, K., and Kobayashi K. 1997. Role of neutrophils in a rat model of gastric ulcer recurrence caused by interleukin-1 beta. *The American Journal of Phatology*, 150 (3), pp. 971-979.

Waller, E.S., 1983.Evaluation of new indomethacin dosage forms. *Biochemical Pharmacology*, 32(3), pp. 389-397.

Weylandt, K.H., Chiu, C.Y., Gomolka, B., Waechter, S.F., Wiedenmann, B., 2012. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvins and protectins. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 97(3-4), pp. 73-82

Whelton, A., Lefkowitz, J.L., West, C.R., Verburg, K.M., 2006. Cardiorenal effects of celecoxib as compared with the nonsteroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and ibuprofen. *Kidney International*, 70(8), pp. 1495-1502.

Zhang, Q., Yu, J.C., Kang, W.M., Zhu, G.J., 2001. Effect of ω -3 fatty acid on gastrointestinal motility after abdominal operation in rats. *Mediators of Inflammation*, [online]. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3086275/?tool=pubmed>> [Accesado el 9 septiembre 2011].

Zhang, X., Tajima, K., Kageyama, K., Kyoj, T., 2008. Irsogladine maleate suppresses indomethacin-induced elevation of proinflammatory cytokines and gastric injury in rats. *World journal of gastroenterology*, 14 (830), pp. 4784-4780.

Zhao, Y., Joshi-Barve, S., Barve, S., Chen, L.H., 2004. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF- α expression by preventing NF- κ B activation. *Journal of the American College of Nutrition*, 23 (1), pp. 71-78.

Zhang, Q., Yu, J.C., Kang, W.M., Zhu, G.J., 2001. Effect of ω -3 fatty acid on gastrointestinal motility after abdominal operation in rats. *Mediators of Inflammation*, [online]. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3086275/?tool=pubmed>> [Accesado el 9 septiembre 2011].

13. ANEXOS

ANEXO I. Diagramas de metodología

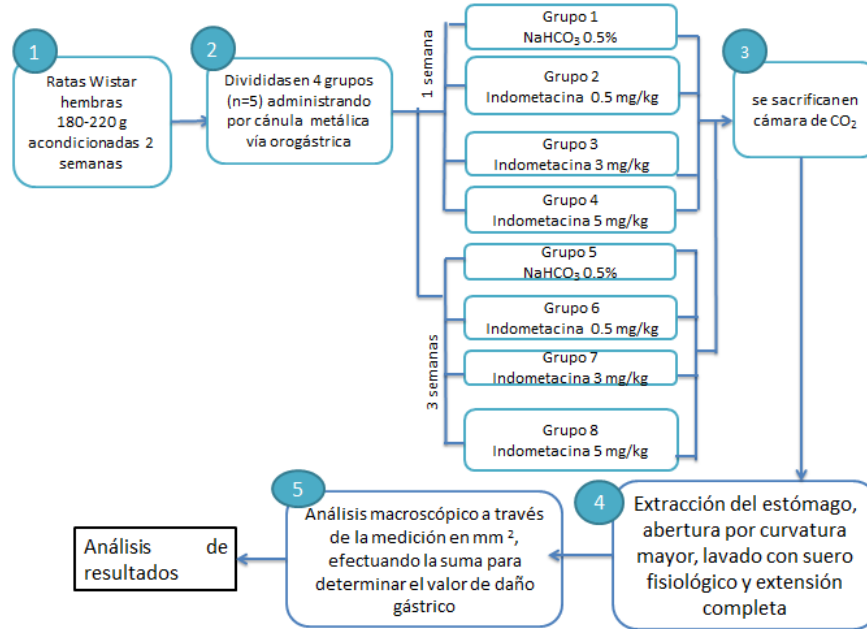


Diagrama 2. Evaluación del daño gástrico generado por la administración crónica de indometacina a diferentes dosis en un modelo murino.

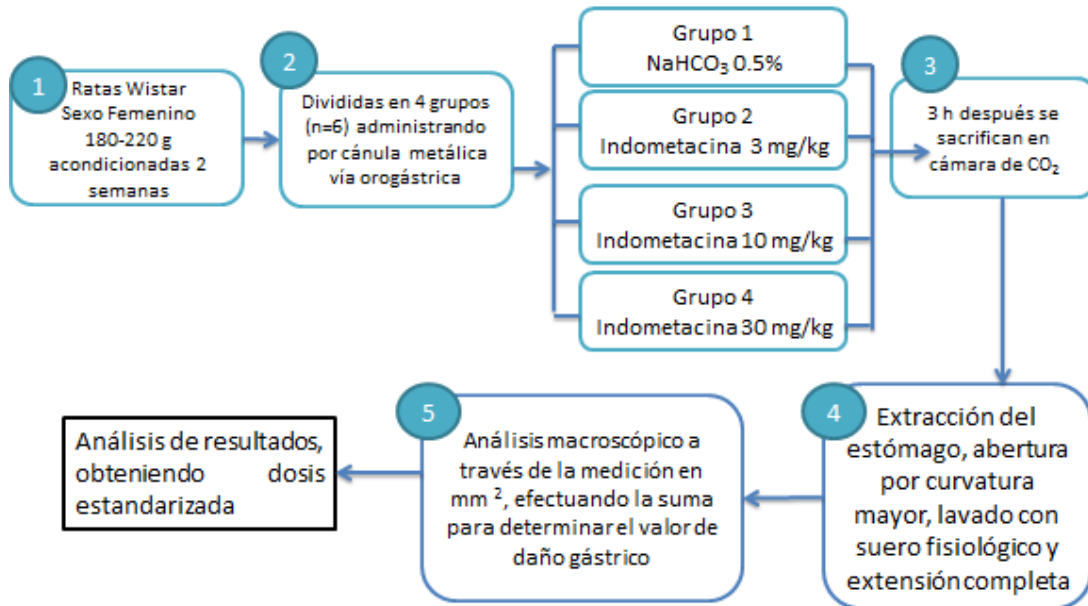


Diagrama 3. Evaluación del daño gástrico generado por la administración aguda de indometacina a diferentes dosis en un modelo murino.

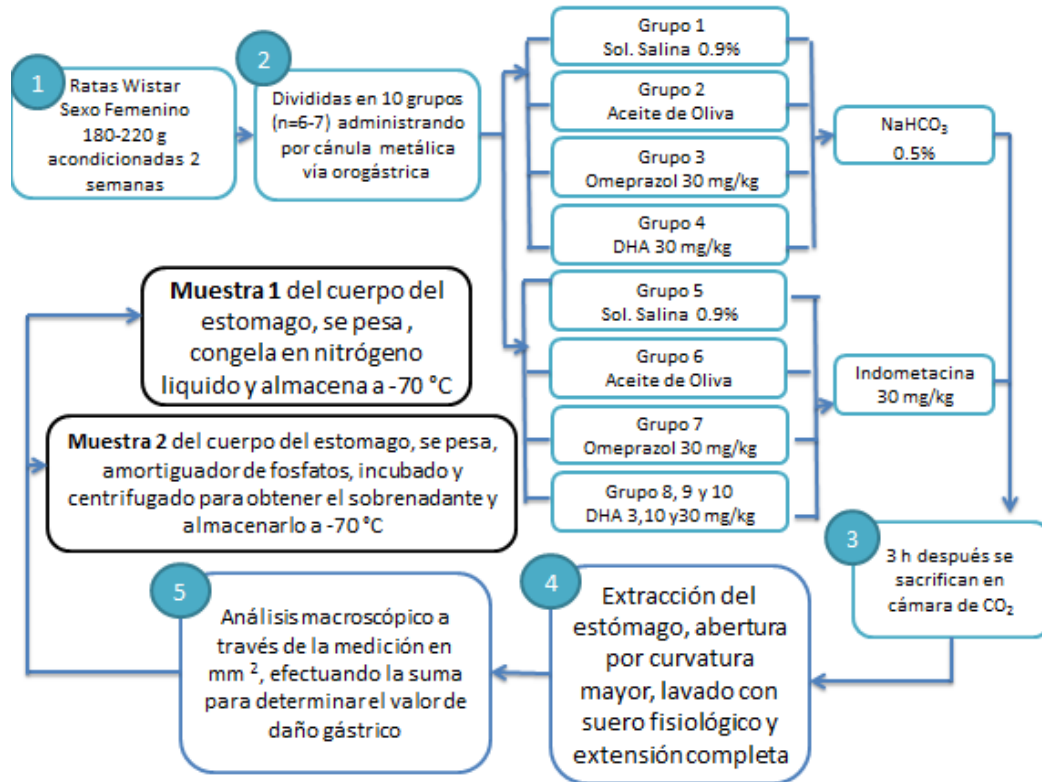


Diagrama 3. Evaluación del daño gástrico inducido por administración aguda de indometacina en la rata con un pre-tratamiento de DHA.

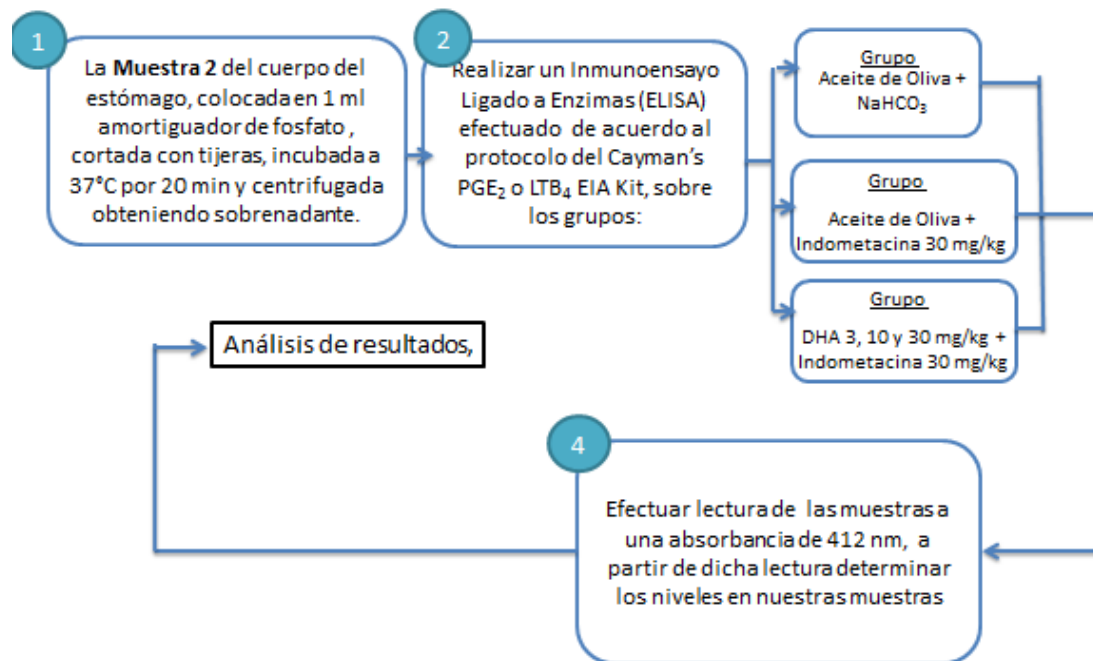


Diagrama 5. Cuantificación de los niveles de PGE₂ y LTB₄ en tejido gástrico de rata después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina.

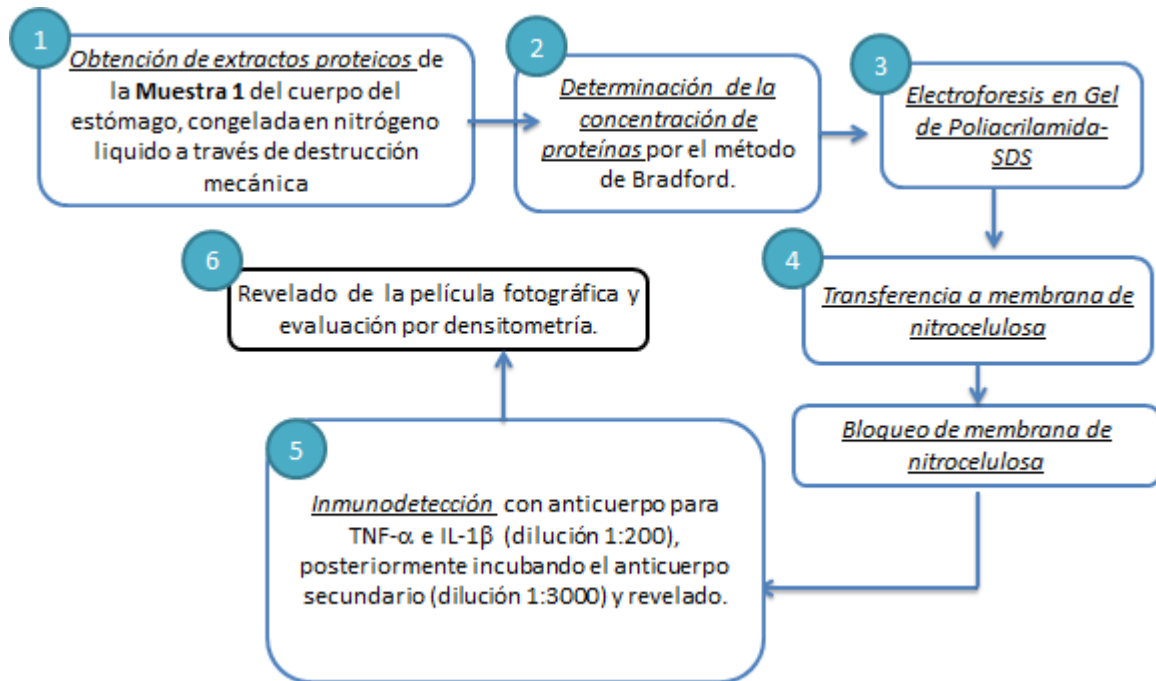


Diagrama 6. Determinación de la expresión de TNF- α e IL-1 β en tejido gástrico de rata después de la administración de DHA por la técnica de Western blot.

ANEXO II. Soluciones y reactivos para técnica de Western blot

- a) Amortiguador de lisis de tejido gástrico: 1.21 g de Tris disueltos en 400 ml de H₂O bidestilada, ajustando el pH a 7.5 con HCl y finalmente se afora a 500 ml con H₂O bidestilada.
- b) Gel separador: Para dos geles separadores al 12% se emplean 4.3 ml de H₂O bidestilada, 2.5 ml de Tris 1.5 M pH 6.8, 100 µl de SDS 10%, 3 ml de Acrilamida 40 % /Bis acrilamida, 100 µl de PSA 10%, 10 µl de TEMED. Para dos geles separadores al 15% se emplean 3.5 ml de H₂O bidestilada, 2.5 ml de Tris 1.5 M pH 6.8, 100 µl de SDS 10%, 3.75 ml de Acrilamida 40 % /Bis acrilamida, 100 µl de PSA 10% y 10 µl de TEMED.
- c) Gel concentrador: Para un gel concentrador al 5% se emplean 3.2 ml de H₂O bidestilada, 1.25 ml de Tris 1.5 M pH 6.8, 50 µl de SDS 10%, 0.5ml de Acrilamida 40 % /Bis acrilamida, 50 µl de PSA 10% y 5 µl de TEMED.
- d) Amortiguador de corrida: 14.4 g de glicina, 3 g de Tris y 1g de SDS disueltas en 800 ml de H₂O bidestilada, rectificando el pH a 8.6 y posteriormente aforando a 1 l con H₂O bidestilada.
- e) Amortiguador de transferencia: 14.4 g de glicina, 3 g de Tris disueltos en 500 ml de H₂O bidestilada en el que se disuelven 200 ml de metanol y finalmente aforado a 1 l con H₂O bidestilada.
- f) Reactivo de Comassie: 0.25 g de azul de comassie R, 45 ml de etanol, 45 ml de H₂O bidestilada y 10 ml de ácido acético glacial.
- g) Solución desteñidora constó de 45 ml de etanol, 45 ml de H₂O bidestilada y 10 ml de ácido acético glacial al 10%.
- h) Amortiguador de fosfato salino (PBS): 8 g de NaCl, 0.201 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄ y 0.24g de KH₂PO disueltos en 800 ml de H₂O ajustando el pH a 7.4 con HCl y finalmente se afora a 1 l con H₂O bidestilada.
- i) Amortiguador de tris salino (TBS): 8.76 g de NaCl y 6.05 g de tris disueltos en 800 ml de H₂O ajustando el pH a 7.6 con HCl y finalmente se afora a 1 l con H₂O bidestilada.
- j) Solución de bloqueo: 7.5 g de leche libre de grasa (Svelty) disuelta en 50 ml de PBS – Tween 0.05 % para TNF- α ó 2.5 g de leche libre de grasa en 50 ml de TBS – Tween 0.05 % para IL-1 β .