CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

"CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DE CURCUMINA EN EL DAÑO GÁSTRICO PRODUCIDO POR INDOMETACINA"

Tesis que presenta

L.F. Nadia Estela Díaz Triste

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Farmacología

Directores de tesis:

Dr. Gilberto Castañeda Hernández

Dra. Aracely Evangelina Chávez Piña

México, Distrito Federal **Diciembre 2012.**

El presente trabajo de investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Gilberto Castañeda Hernández del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y la co-dirección de la Dra. Aracely Evangelina Chávez Piña de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca (253874) para realizar mis estudios de posgrado, así como al proyecto SIP 20121164 financiado por el Instituto Politécnico Nacional para realización de este proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres, Epigmenio y Estela, por darme la vida, porque gracias a ellos soy lo que soy, por su ejemplo de disciplina, constancia y por el apoyo incondicional que siempre me han brindado, por esto y mucho, mucho más, este logro es para ustedes. ¡LOS AMO!

A Mi hermano, "Kaiser" por compartir tantos momentos de alegría y travesuras durante la infancia, por el fuerte lazo que nos une y porque siempre aprendo de ti hermano.

A mis abuelos, Simona e Hilario por el ejemplo de vida que representan para mí, por sus enseñanzas y por todo lo que he recibido de ustedes.

A toda mi familia (tíos, primos y sobrinos) porque sé que siempre podré contar con ustedes y porque este logro es de todos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gilberto Castañeda Hernández por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por su apoyo y paciencia en la realización de este proyecto, sobre todo por los consejos a nivel personal y profesional, gracias infinitas doctor.

A la Dra. Aracely Evangelina Chávez Piña, por sus enseñanzas, dedicación y todo el apoyo incondicional que me ha brindado.

Al centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por ser mí casa en estos dos últimos años.

Al personal del laboratorio 34:
Q.F.B. Martha Patricia González García por su amistad y ayuda técnica brindada para la realización de este proyecto. Gracias Paty
Q.F.B. Lourdes González Flores por la ayuda administrativa brindada.

Al comité tutorial por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a enriquecer este proyecto: Dra. Liliana Favari Perozzi y Dra. Ma. del Carmen García García.

A mis amigas que conocí en esta bella ciudad, Alma, Clarissa, Elizabeth, Ivette y Leah, por su amistad y apoyo en momentos difíciles.

A mis amigos que se han quedado en cada lugar donde he vivido, pero a pesar de la distancia siempre puedo contar con ellos, especialmente a Yazza, “hermanina” gracias por ser mi cómplice y sobre todo por apoyarme y alentarme en las situaciones difíciles.

Finalmente, gracias a todas aquellas personas que han compartido parte de su vida conmigo, por ayudarme y enseñarme que la vida no es más que una fiesta en la que habrá momentos de alegría, de tristeza, de reflexiones y sobre todo de mucho aprendizaje……¡Gracias a todos!

Y sobre todo……**¡GRACIAS VIDA!**

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS I
RESUMEN III
ABSTRACT IV
1. INTRODUCCIÓN 1
1.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) 1
1.1.1 Clasificación química 1
1.2 Indometacina 2
1.3 Farmacología de los AINEs 3
1.3.1 Actividad analgésica, antiinflamatoria y antipirética 3
1.3.2 Otros efectos 4
1.3.2.1 Efecto antitrombótico 4
1.3.2.2 Quimiopreventivo 5
1.3.2.3 Enfermedad de Alzheimer 5
1.4 Metabolismo del ácido araquidónico 6
1.4.1 Vía ciclooxigenasa (COX) 6
1.4.2 Vía lipooxigenasa (LOs) 8
1.5 Mecanismo de acción de los AINEs 8
1.5.1 Enzima ciclooxigenasa 8
1.6 Efectos adversos de los AINEs 11
1.6.1 Efectos gastrointestinales inducidos por los AINEs 12
1.7 Patogénesis del daño gastrointestinal inducido por los AINEs 12
1.7.1 Mecanismo local: efecto irritante tópico 12
1.7.2 Mecanismo dependiente de prostaglandinas 13
1.7.3 Participación de los neutrófilos 14
1.7.4 Participación del óxido nítrico (NO) 15
1.8 Prevención y tratamiento del daño gástrico generado por los AINEs 16
1.8.1 Inhibidores selectivos de COX-2 (COXIBS) 16
1.8.2 Inhibidores de la ATPasa H^+/K^+ (bomba de protones) 17
1.8.3 Antagonistas de los receptores de histamina H_2 17
1.8.4 Misoprostol 17
1.8.5 AINEs modificados químicamente 18
1.8.5.1 AINEs liberadores de óxido nítrico (Nitro-AINEs) 18
1.8.5.2 AINEs liberadores de sulfuro de hidrógeno 18
1.9 Canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) 19
1.9.1 Estructura molecular de los canales de K_{ATP} 20
1.9.2 Farmacología de los canales de K_{ATP} 21
1.10 Curcumina 25
1.10.1 Generalidades 25
1.10.2 Estructura química de la curcumina 26
1.10.3 Seguridad de la curcumina 26
1.10.4 Propiedades terapéuticas de la curcumina 27
1.10.5 Efecto gastroprotector de la curcumina 27

2. ANTECEDENTES 29
3. JUSTIFICACIÓN 31
4. OBJETIVO GENERAL 32
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES 32
5. MATERIAL Y MÉTODOS 33

5.1 Manejo de animales 33
5.2 Fármacos y reactivos 33
5.3 Modelo de daño gástrico 34
5.4 Lesiones gástricas inducidas por la indometacina en un modelo de daño crónico 34
5.5 Lesiones gástricas inducidas por la indometacina en un modelo de daño agudo 34
5.6 Evaluación del efecto gastroprotector de la curcumina en el modelo de daño agudo generado por la indometacina 35
5.7 Cuantificación de los niveles de PGE_2 en el tejido gástrico de rata en el efecto gastroprotector de la curcumina 35
5.8 Determinación de prostaglandina E_2 (PGE_2) 36
5.9 Efecto gastroprotector del omeprazol en el modelo de daño gástrico inducido por la indmetacina 36
5.10 Participación de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) en el efecto gastroprotector de la curcumina 36
5.11 Participación del óxido nítrico (NO) en el efecto gastroprotector de la curcumina 37
5.12 Cuantificación de los niveles de nitritos en el tejido gástrico de rata en el efecto gastroprotector de la curcumina 37
5.13 Determinación de los niveles de nitritos y nitratos 38
5 .14 Análisis estadístico 38

6. RESULTADOS 45
6.1 Efecto de la indometacina en tejido gástrico de rata durante la administración crónica 45
6.2 Efecto de la indometacina en tejido gástrico de rata durante la administración aguda 45
6.3 Evaluación del efecto gastroprotector de la curcumina en el modelo de daño agudo generado por la indometacina en la rata 47
6.4 Niveles de PGE_2 en el tejido gástrico de rata en el efecto gastroprotector de la curcumina 49
6.5 Comparación del efecto gastroprotector de la curcumina con respecto al efecto gastroprotector del omeprazol, un inhibidor de la bomba de protones 49
6.6 Participación de los canales de K_{ATP} en el efecto gastroprotector de la curcumina 51
6.7 Participación del óxido nítrico (NO) en el efecto gastroprotector de la curcumina 52
6.8 Cuantificación de los niveles de nitritos en efecto gastroprotector de la curcumina 53

7. DISCUSIÓN 54
8. CONCLUSIONES 61
9. PERSPECTIVAS 62
10. BIBLIOGRAFÍA 63

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1: Lesiones gástricas inducidas por la indometacina en un modelo de daño crónico 39

Diagrama 2: Lesiones gástricas inducidas por la indometacina en un modelo de daño agudo 40

Diagrama 3: Evaluación del efecto gastroprotector de la curcumina en el modelo de daño agudo generado por la indometacina 41

Diagrama 4: Evaluación del efecto gastroprotector del omeprazol en el modelo de daño gástrico inducido por la indometacina 42

Diagrama 5: Participación de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) en el efecto gastroprotector de la curcumina 43

Diagrama 6: Participación del óxido nítrico (NO) en el efecto gastroprotector de la curcumina 44

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AChE	Acetilcolinesterasa
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
CMC	Carboximetilcelulosa
COX	Ciclooxigenasa
Coxibs	Inhibidores selectivos de COX2
$cPLA_2$	Fosfolipasa A2 citosólica
CBS	Sintasa de cistationona β
CSE	Cistationina γ liasa
GI	Gastrointestinal
GMPc	Guanosin monofostato cíclico
h	Hora
H_2S	Sulfuro de hidrógeno
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenoico
i.p	Intraperitoneal
5-LO	5- lipo-oxigenasa
L-NAME	N^G- nitro-L arginina metil ester
LO	Lipooxigenasa
LTs	Leucotrienos

LTA_4	Leucotrieno A_4
NO	Óxido nítrico
ONS	Óxido nítrico sintasa
PGs	Prostaglandinas
PGA_1	Prostaglandina A1
PGE_1	Prostaglandina E1
p.o	Por vía oral
TXs	Tromboxanos
TXA_2	Tromboxano A2

RESUMEN

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen uno de los grupos farmacológicos más utilizados alrededor del mundo debido a sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas. La indometacina pertenece a este grupo de fármacos, se utiliza en el tratamiento de la artritis reumatoide y los problemas inflamatorios relacionados; sin embargo, una de las principales limitaciones del uso de estos fármacos es la toxicidad gastrointestinal que producen, por lo tanto, se han desarrollado diversas estrategias farmacológicas que pretenden disminuir tales efectos adversos. Una de las estrategias planteadas es la utilización de la medicina tradicional, la curcumina, el principal principio activo de la planta *Curcuma longa* o turmérica, ha demostrado poseer un efecto protector en la gastropatía inducida por la indometacina, sin embargo, el mecanismo involucrado en dicho efecto no se ha elucidado completamente. Por lo tanto, el objetivo de este estudio consistió en caracterizar el mecanismo gastroprotector de la curcumina en el daño gástrico producido por la indometacina. Para tal efecto, se utilizaron ratas Wistar hembras a las cuales se les administró un pre-tratamiento de curcumina por vía oral y posteriormente se indujo el daño gástrico con indometacina; debido a que el principal mecanismo a través del cual este AINE produce daño gástrico involucra la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, se decidió evaluar la participación de éstas en el efecto gastroprotector de la curcumina. Asimismo, se administró un pre-tratamiento de glibenclamida y L-NAME para determinar la participación de los canales de K_{ATP} y el óxido nítrico (NO), respectivamente. Los resultados indicaron que las prostaglandinas no participan en el efecto gastroprotector de la curcumina debido a que esta no es capaz de restaurar los niveles de prostaglandinas que suprime la indometacina. Por otra parte, se observó que los canales de K_{ATP} y el óxido nítrico participan en dicho efecto, ya que tanto glibenclamida como L-NAME disminuyeron de manera significativa el efecto gastoprotector de la curcumina. Además de ello, se midieron los niveles de nitritos en tejido gástrico, donde el grupo pre-tratado con curcumina indujo un incremento significativo con respecto al grupo dañado con indometacina.

Por lo tanto, en este estudio concluimos que en el mecanismo gastroprotector de curcumina participa la vía NO-K_{ATP}.

ABSTRACT

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are one of the most widely used treatments around the world due to its analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effect. Indomethacin is an NSAID used in the treatment of rheumatoid arthritis and related inflammatory problems; however, a major limitation for the use of these kind of drugs is their gastrointestinal toxicity. Therefore, it has been developed various pharmacological strategies to decrease their adverse effects. One strategy is the use of raised traditional medicine; curcumin, the principal active ingredient of the plant *Curcuma longa* or turmeric has shown to have a protective effect against indomethacin-induced gastropathy, however the mechanism involved in this effect has not been fully elucidated. For that reason, the aim of this study was to characterize the gastroprotective mechanism of curcumin against indomethacin-induced gastric damage. Female Wistar rats were given a pre-treatment of curcumin orally and subsequently gastric damage was induced with indomethacin, because the main mechanism through which this involves NSAIDs produce gastric damage inhibition of prostaglandin synthesis, we decided to evaluate the participation of PGs in the gastroprotective effect of curcumin. Furthermore, the rats received intraperitoneal administration of glibenclamide and L-NAME to evaluate the participation of K_{ATP} channels and nitric oxide (NO) respectively. The results demonstrated that prostaglandins did not participate in the gastroprotective effect of curcumin. Curcumin did not repair gastric prostaglandins levels compared to indomethacin. However, our results have shown that K_{ATP} channels and nitric oxide are involved in the gastroprotective effect of curcumin, as both L-NAME and glibenclamide pretreatment significantly decreased the gastoprotective effect of curcumin. Moreover, we measured nitrite levels in gastric tissue, where the group pre-treated with curcumin induced a significant increase compared with indomethacin group. Therefore, in this study we conclude that the gastroprotective mechanism of curcumin involve the participation of NO- K_{ATP} pathway.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos se definen como un grupo heterogéneo de fármacos con efecto analgésico, antiinflamatorio y antipirético principalmente, siendo uno de los fármacos más utilizados alrededor del mundo (Hawkins y Hanks, 2000).

En la segunda mitad del siglo XX, se acuñó el término de "antinflamatorios no esteroideos" por dos motivos: designar a un nuevo grupo de medicamentos con propiedades farmacológicas similares y diferente estructura química (tales como la fenacetina, fenilbutazona, indometacina y naproxeno), y para diferenciarlos de otro grupo de antinflamatorios descubiertos en 1949, los corticoesteroides.

1.1.2 Clasificación química de los AINEs

En función a la estructura química, este grupo de fármacos se clasifica de la siguiente manera (tabla 1):

Grupo	Prototipo
Salicilatos	Ácido acetilsalicílico
Derivado del ácido salicílico	Diflunisal
Ácidos propiónicos	Ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno
Ácidos acéticos	
Derivado piranoindolacético	Etodoloc
Derivado pirrolacético	**Indometacina,** sulindaco, ketorolaco
Ácidos antranílicos (Fenamatos)	Meclofenamato, ácido mefenámico
Derivados no ácidos	
Oxicanes	Piroxicam, meloxicam, tenoxicam
Inhibidores selectivos de COX-2	Celecoxib, etoricoxib, valdecoxib, lumiracoxib

Tabla 1: Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos de acuerdo a su estructura química. Tomado de Lacy C, Armstrong L, Goldman M y Lance L. Drug information Handbook 2000-2001. 8° edición. Editorial Internacional American Pharmaceutical Association.

1.2 Indometacina

La indometacina es un AINE no selectivo derivado del ácido indolacético, se introdujo en la clínica en 1963 (Blower, 1993) para el tratamiento de la artritis reumatoide y procesos inflamatorios relacionados (Suleyman *et al.*, 2007). Aunque su eficacia es muy notable, su asociación con una incidencia elevada de efectos adversos intolerables, a veces irreversibles y potencialmente fatales, han limitado su uso.

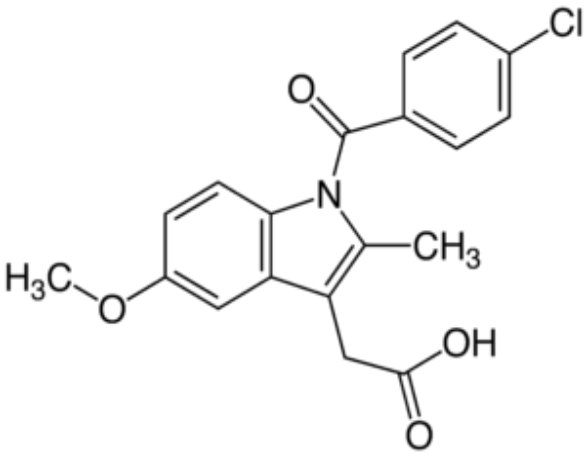


Figura 1: Estructura química de indometacina. La indometacina es un derivado del ácido indol acético cuyo nombre IUPAC es: 2-[1-(4-clorobenzoil)- 5-metoxi-2-metilindol-3-il] ácido acético.Tomado de Brunton y Chabner, 2012.

Por vía oral, la indometacina se absorbe de forma rápida (tmáx < 2 h) y casi completa, aunque su Cmáx presenta una gran variabilidad interindividual. Se une en un 90% a las proteínas plasmáticas. La vida media plasmática es de 3-6 h. Una vez administrada se distribuye por todo el organismo, incluso al líquido sinovial. Es metabolizada por O-desmetilación (50%), N-desacilación y glucuronoconjugación (10%). El 10-20% del fármaco se elimina sin metabolizar por secreción tubular activa (Brunton y Chabner, 2012).

La dosis por vía oral en la patología reumática va de 20 a 50 mg/día, y se recomienda no exceder los 200 mg/día, debido a que en esta dosis existe una prevalencia mayor de efectos adversos.

El efecto tóxico más común que causa este fármaco es el daño GI, que puede ir desde la formación de una úlcera, sangrado y perforación (Wallace, 1997). Las lesiones gástricas inducidas por la indometacina se caracterizan por un daño oxidativo significante, en el que hay reducción del flujo sanguíneo de la mucosa así como de la secreción de moco y bicarbonato debido a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Robert *et al.*, 1979).

Dado que la indometacina es una sustancia ulcerogénica, es usada con frecuencia en el modelo experimental de daño gástrico (Abadi *et al*., 2006; Sharma y Ray, 2008); en dichos modelos se opta por utilizar esta, puesto que, existe evidencia que el daño gástrico en la rata es más severo en comparación con otros AINEs (Suleyman *et al.*, 2002). Estos estudios revelan que el daño gástrico está correlacionado con una disminución marcada del contenido de PGE_2 en la mucosa gástrica (Whittle, 1981).

1.3 Farmacología de los AINEs

Las diferencias en los efectos biológicos producidos por estos fármacos resultan del grado de selectividad para inhibir a la enzima ciclooxigenasa (COX), como consecuencia de ello, existe un bloqueo de la producción de prostanoides como, prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TX), cuya inhibición es principalmente el mecanismo de acción de estos fármacos, el cual se describe más adelante en detalle.

1.3.1 Actividad analgésica, antiinflamatoria y antipirética

En la clínica, los AINEs son prescritos de acuerdo a sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas, lo cual motiva su amplio espectro de utilización.

La principal indicación terapéutica de estos fármacos es como antiinflamatorio para el tratamiento de trastornos musculoesqueléticos. El proceso inflamatorio es una respuesta a un estímulo perjudicial originada por una variedad de estímulos nocivos (infecciones, anticuerpos o lesiones físicas), varios son los mecanismos que participan en el inicio y la resolución de la inflamación, los trabajos recientes se han dirigido a estudiar la adherencia de leucocitos y plaquetas al endotelio en los sitios de inflamación, cuyo mecanismo es dependiente de la expresión de moléculas que

participan en dicha interacción como: selectinas E, P y L, la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), la molécula de adherencia celular vascular 1 (VCAM-1) e integrinas leucocitarias. Algunos de los AINEs interfieren con este proceso inhibiendo la expresión o actividad de algunas de estas moléculas de adhesión celular vía inhibición de PGs (Brunton y Chabner, 2012).

Es probable que el dolor que acompaña a la inflamación y a una lesión tisular resulte de la estimulación local de fibras del dolor y el incremento de la sensibilidad (hiperalgesia), que en parte es consecuencia del aumento de la excitabilidad de neuronas centrales en la médula espinal; la producción de bradicinina y citocinas, como TNFα, IL-1 y IL-8, que son importantes en la producción del dolor e inflamación debido a que estos elementos inducen la liberación de PGs y otros mediadores que promueven la hiperalgesia. La capacidad de las PGs para sensibilizar receptores del dolor a estímulos mecánicos y químicos resulta de una disminución del umbral de los nociceptores. Por lo tanto, los AINEs al inhibir la síntesis de PGs están generando analgesia (Brunton y Chabner, 2012).

Al mismo tiempo, estos fármacos reducen la temperatura corporal en procesos febriles. El hipotálamo regula la temperatura corporal que se encuentra elevada en la fiebre (por infección, daño tisular, inflamación, rechazo de injertos), debido a la formación de citocinas como IL-1β, IL-6, interferones y TNFα. Las citocinas aumentan la síntesis de prostaglandina E_2 (PGE_2) en órganos circunventriculares en el área hipotalámica, este aumento de PGE_2 incrementa el adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y estimula al hipotálamo para que este eleve la temperatura corporal (Brunton y Chabner, 2012).

1.3.2 Otros efectos

1.3.2.1 Efecto antitrombótico

La mayoría de los AINEs inhiben la agregación plaquetaria, sin embargo su efecto antiplaquetario es reversible a excepción del ácido acetilsalicílico (Aspirina ®). Este

mecanismo se debe a la acetilación irreversible de la COX plaquetaria, produciendo menor formación de tromboxano A_2 (TXA_2) (Hardman *et al*., 1996).

1.3.2.2 Quimiopreventivo

Otro mecanismo de acción recientemente descrito es el quimiopreventivo, dicho mecanismo fue planteado debido a que diversos estudios han demostrado que la COX-2 y PGE_2 se expresan en la angiogénesis tumoral y en células neoplásicas (Chan, 2002). Así también, se ha reportado una sobreexpresión de COX-2 en el cáncer de colon, por ende se han desarrollado estudios con AINEs no selectivos como el sulindac, e inhibidores selectivos de COX-2, tal es el caso de celecoxib, los cuales han demostrado que previenen la formación y causan una regresión de adenomas en pacientes con poliposis familiar (Steinbach *et al.*, 2000).

1.3.2.3 Enfermedad de Alzheimer

Algunos estudios parecen justificar la utilización de los AINEs en la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por depósitos cerebrales del péptido beta-amiloide y ovillos neurofibrilares (NFT) (Gasparini *et al.*, 2004); esto parece estar mediado por mecanismos de estrés oxidativo y mediadores proinflamatorios en los que participan células inflamatorias como los astrocitos y la microglia (Eikelenboom *et al.*, 2002). En dichos mecanismos inflamatorios, se ha reportado que las PGs liberadas durante la reacción inflamatoria, causan rápidos cambios degenerativos, fundamentalmente la prostaglandina A_1 (PGA_1). Se ha sugerido que las prostaglandinas inducen elevación del péptido beta-amiloide que conduce a la acumulación de proteínas anormales, las cuales contribuyen a la degeneración y muerte neuronal. Además, algunos estudios indican que COX-2 se expresa en altas concentraciones en las células degenerativas del cerebro, y se ha sugerido que los AINEs selectivos de la COX-2 pueden disminuir su excesiva expresión a este nivel, dando como resultado un tratamiento profiláctico más apropiado, en especial en los años que preceden la aparición del cuadro clínico de la enfermedad (Schatzberg, 2006).

1.4 Metabolismo del ácido araquidónico (AA)

Para conocer el mecanismo de acción de estos fármacos es necesario hacer referencia al metabolismo del ácido araquidónico (AA), ya que de la interacción proveniente entre ésta y los AINEs resultan los efectos tanto terapéuticos como adversos. El AA es un ácido graso poliinsaturado del tipo omega 6, constituido por 20 átomos de carbono y cuya oxidación origina pequeños mediadores lipídicos que reciben el nombre de eicosanoides (Smith, 1992). Cuando la célula recibe un estímulo se activa la enzima fosfolipasa A_2, la cual actúa sobre los fosfolípidos de membrana, específicamente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol para romper el enlace ester uniendo covalentemente araquinodato al glicerol saliente del fosfolípido. El AA es metabolizado por dos vías: 1) por la acción de la enzima ciclo-oxigenasa (COX), produciendo PGs y TXs; y, 2) a través de la vía de las lipooxigenasas (LO), dando como resultados lipoxinas y leucotrienos (figura 1). (Kumar *et al.,* 2004).

1.4.1. Vía de las ciclooxigenasas (COX)

De las rutas metabólicas de los eicosanoides, la vía de la COX se considera la más importante, debido al papel principal que desempeñan las PGs en los procesos inflamatorios y su participación en determinadas funciones fisiológicas. Por todas estas acciones tan diversas que protagonizan las PGs, la vía de la COX ha sido una de las rutas bioquímicas que más proyectos de investigación ha protagonizado.

La ciclooxigenasa también conocida como prostaglandina H sintasa, es una enzima bifuncional que unida a la membrana, cataliza el paso limitante en la producción de PGs y TXs (Ohki *et al.*, 1979). Esta enzima adiciona dos moléculas de oxígeno al AA para formar prostaglandina G_2 (PGG_2) y después reduce a este hidroperóxido cíclico en un endoperóxido altamente reactivo, la prostaglandina H_2 (PGH_2) (figura 2) que actúa como sustrato intermediario para la síntesis de PGs de las series E_2, F_2, D_2 e I_2 (esta última también llamada prostaciclina) y TXA_2 (Ohki *et al.*, 1979).

Las células endoteliales vasculares producen PGI_2 a partir de PGH_2 mediante la PGI sintasa, y las plaquetas liberan TXA_2 a partir de la PGH_2 por la acción de la tromboxano sintasa. Estos productos tienen funciones vasculares totalmente diferentes, mientras que PGI_2 es un vasodilatador y potente inhibidor de la agregación plaquetaria, TXA_2 funciona como agregante plaquetario y vasoconstrictor (Serhan *et al.,* 2001). Finalmente, PGE_2 se produce en muchos tejidos celulares, mediante la PGE sintasa (Jakobsson *et al.*, 1999); esta prostaglandina interviene en la respuesta inflamatoria produciendo vasodilatación y participa en procesos dolorosos debido a su propiedades hiperalgésicas (Serhan *et al.,* 2001).

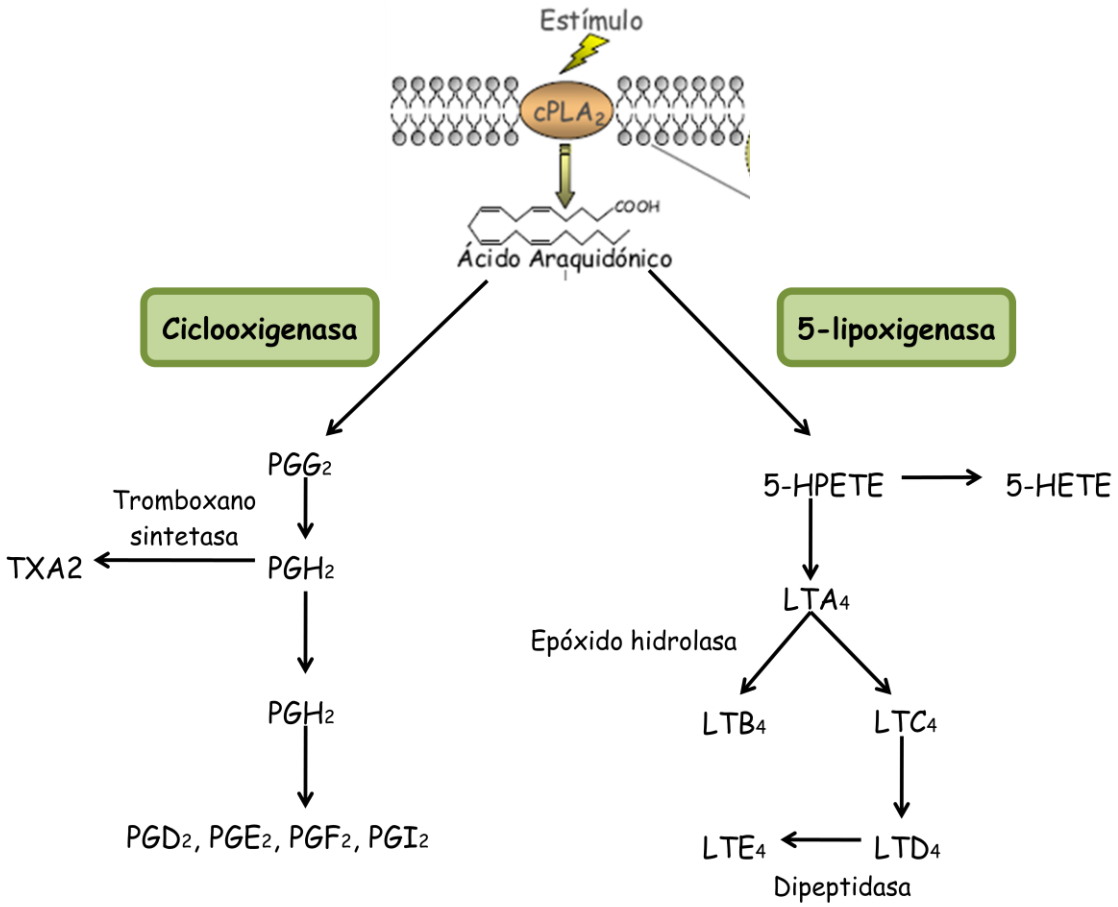


Figura 2: Metabolismo del ácido araquidónico. $cPLA_2$, fosfolipasa A_2 citosólica; HETEs, ácidos hidroxieicosatetraenoicos; LTs, leucotrienos; PGs, prostaglandinas; TXA_2, tromboxano A_2. Modificado de Brunton y Chabner, 2012.

1.4.2 Vía de las lipooxigenasas (LOs)

Las lipooxigenasas (LOs) son una familia de enzimas citosólicas que catalizan la oxigenación esteroespecífica de los carbonos 5-, 12-, ó 15- del AA.

La vía de la enzima 5-lipo-oxigenasa (5-LO) es la vía más importante, esta enzima (localizada principalmente en neutrófilos) cicla al ácido araquidónico a una sustancia intermedia llamada 5-hidroxi-peroxi-eicosatetraenoico (5-HPETE), el cual es un hidroxiácido inestable, que rápidamente se transforma en 5-hidroxieicosatetraenoico (5-HETE), en donde esta enzima transforma este sustrato a un epóxido denominado leucotrieno A_4 (LTA_4), debido a su inestabilidad rápidamente da origen al leucotrieno B_4 (LTB_4) o puede conjugarse con glutatión y formar el leucotrieno C_4 (LTC_4) y sus productos LTD_4, LTE_4 y LTF_4. El LTB_4 es un potente mediador de la inflamación debido a que por sus acciones quimiotácticas, produce migración de neutrófilos y actúa sinérgicamente con los vasodilatadores y los productos de exudación (Serhan *et al.,* 2001).

1.5 Mecanismo de acción de los AINEs

El mecanismo de acción correlacionado con las propiedades terapéuticas anteriormente mencionadas, se basa en la inhibición de la enzima COX, como consecuencia se inhibe la síntesis de prostaglandinas (PGs) y TXs a partir del AA de distintos tipos celulares (Figura 3).

En 1971, Vane demostró que la aspirina, los salicilatos y la indometacina, producían una inhibición dependiente de la dosis de la producción de prostaglandinas en una preparación cruda de prostaglandina-sintasa (actualmente conocida como enzima COX. En ese mismo año, Ferreira *y colaboradores,* 1971 confirmaban que los fármacos tipo aspirina bloqueaban la liberación de prostaglandinas.

1.5.1 Enzima ciclo-oxigenasa (COX)

En 1991 se evidenció la existencia de dos isoformas de la enzima COX, las cuales se han identificado con un número: COX-1 y COX-2 (Wallace, 2001). La diferencia más importante entre ambas enzimas desde el punto de vista farmacológico estriba en que

COX-1 se expresa constitutivamente en varios tejidos: mucosa gástrica, riñón, células endoteliales y plaquetas (Feng *et al*., 1993; Vane y Botting, 1995); por otra parte, COX-2, es una isoforma inducible que puede ser expresada prácticamente por cualquier célula o tejido como respuesta a citocinas pro-inflamatorias, promotores tumorales o factores de crecimiento (O´Neill y Ford-Hutchinson, 1993); sin embargo, es constitutiva en el sistema nervioso central (SNC) y riñón (Kam y See, 2000).

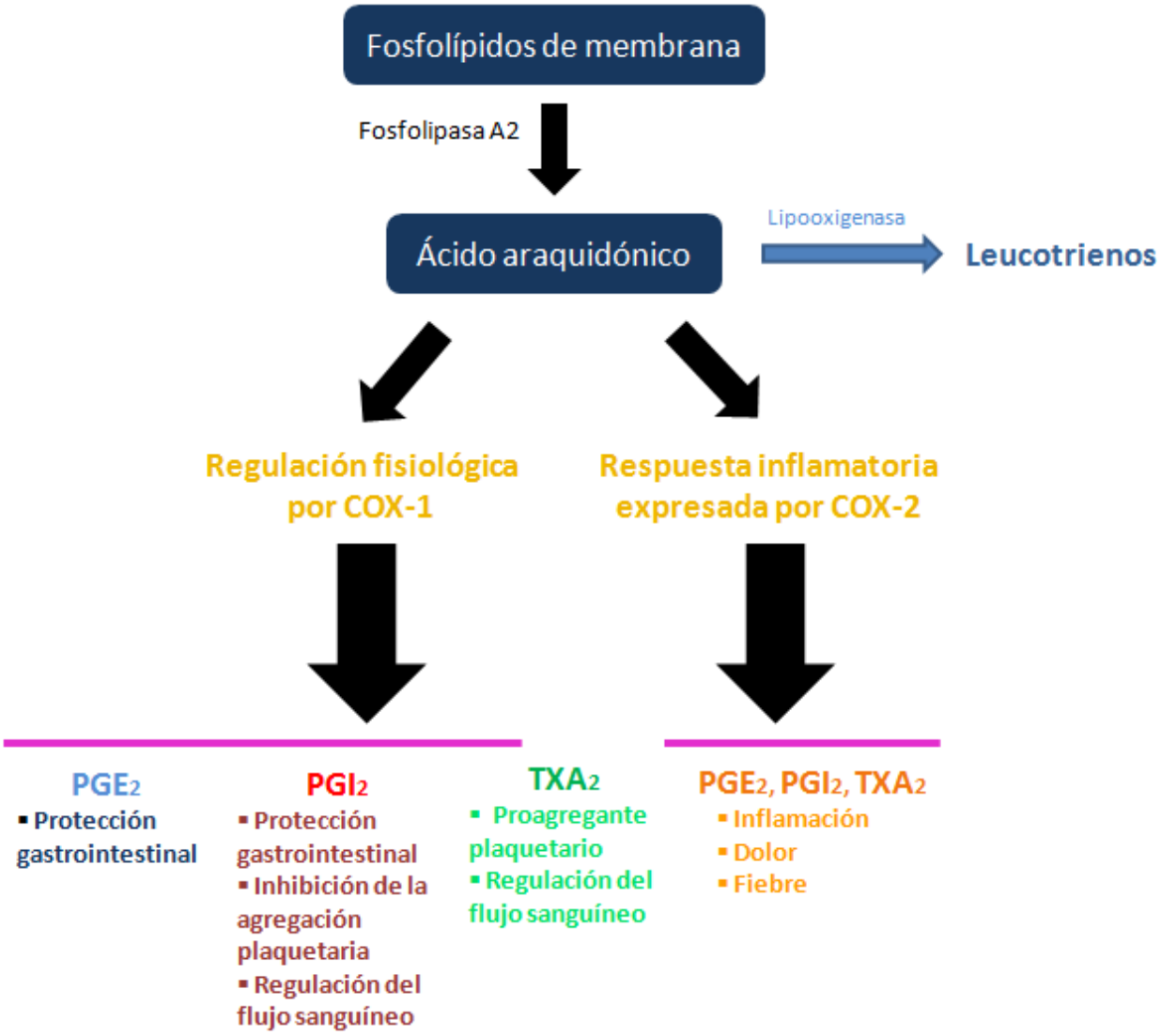


Figura 3: Mecanismo de acción de antiinflamatorios no esteroideos. Modificado de Vane, 1996.

Ha sido ampliamente reportado que la síntesis de PGs mediada por COX-1 interviene en el mantenimiento del estado fisiológico normal de muchos tejidos, incluidos la protección de la mucosa gastrointestinal, el control del flujo sanguíneo renal, la homeostasis, las respuestas autoinmunes y la activación plaquetaria (Vane y Botting, 1998). Es importante mencionar que la activación de COX-1, genera la formación de PGE_2 y PGI_2, las cuales al ser liberadas de la mucosa gástrica poseen acción citoprotectora (Moncada *et al.*, 1976) debido a que previenen la formación de erosiones y úlceras gástricas al tener un efecto vasodilatador directo sobre los vasos sanguíneos de dicha mucosa, además, estos prostanoides estimulan la secreción de moco, el cual forma una barrera protectora en el estómago (Atay *et al.*, 2000).

Por otro lado, la COX-2 regula la producción de prostaglandinas que controlan tanto las funciones patológicas como las fisiológicas: el aumento de la sensibilidad al dolor, el aumento de la temperatura corporal y la vasodilatación en las zonas donde se produce el proceso inflamatorio (Figura 2) (O´Neill y Ford-Hutchinson, 1993). Sin embargo, estudios recientes han sugerido que la enzima COX-2 puede contribuir en la defensa de la mucosa gástrica bajo algunas circunstancias (Gretzer *et al.*, 1998); entre ellas, se ha reportado que las PGs derivadas de dicha enzima protegen al estómago del daño asociado por la infección de *Helicobacter pylori,* debido a que se ha evidenciado que COX-2 es expresada en el estómago humano colonizado por dicha bacteria (Fu *et al.*, 1999). Por otra parte, Smith y colaboradores, 1998 han reportado que utilizando un inhibidor selectivo de COX-1 (SC-560) en un modelo de inflamación y dolor en la rata, este compuesto reduce significativamente el contenido de PGs, pero sorprendentemente no produce daño gástrico. Estos hallazgos causaron curiosidad en Wallace y colaboradores, llevándolo a investigar la participación de COX-1 y COX-2 en el daño gástrico utilizando AINEs no selectivos y selectivos de COX-2; demostrando que ambas enzimas juegan un papel importante en la síntesis de PGs y que es necesaria la inhibición de las dos isoformas de COX en el daño gástrico inducido por los AINEs (Wallace *et al.*, 2000).

1.6 Efectos adversos generados por los AINEs

Los AINES se encuentran entre las causas más frecuentes de reacciones adversas medicamentosas. Según un estudio realizado por la Food and Drug Administration (FDA), en el año 1984 estos fármacos causaron el 21% del total de reacciones adversas medicamentosas registradas en Estados Unidos (Faich, 1986).

Dentro de los efectos adversos de mayor importancia clínica reportados por estos fármacos, encontramos los siguientes:

Efecto cardiovascular: El TXA_2 plaquetario (pro-trombótico) es sintetizado vía COX-1, mientras que la síntesis de PGI_2 con efecto antitrombótico es mediada por COX-2. Los inhibidores selectivos de COX-2, a diferencia de los AINEs no selectivos producen riesgo cardiovascular al promover la trombogénesis, este hecho se debe a la prevalencia del efecto pro-trombótico generado por TXA_2 (Krotz *et al.*, 2005).

Efecto renal: La funcionalidad complementaria de ambas isoenzimas (COX-1 y COX-2), son de suma importancia para el mantenimiento funcional del riñón. Por una parte, las prostaglandinas homeostáticas como: PGI_2 PGE_2 y PGD_2 generadas por acción de la COX-1 en distintas regiones de los riñones, dilatan la vasculatura, disminuyen la resistencia vascular renal y aumentan la perfusión del órgano. Esto lleva a la redistribución del flujo sanguíneo de la corteza renal por las nefronas en la región intramedular (Whelton, 1999). Por otro lado, la COX-2 posee un papel importante en la función de la regulación renal, predominantemente en dos sitios, en el asa de Henle y en la mácula densa, la función de la COX-2, está relacionada con el mantenimiento de la homeostasis salina, acuosa y de la filtración glomerular (Simon *et al.*, 2002). Por ello, la inhibición de estos mecanismos generada por la administración de AINEs no selectivos, tiende a disminuir la perfusión renal total y redistribuir el flujo sanguíneo para la corteza, proceso que culmina en la vasoconstricción renal aguda, la isquemia medular y, en ciertas condiciones, la insuficiencia renal aguda (Whelton, 1999).

1.6.1 Efectos gastrointestinales inducidos por los AINEs

Una limitante del uso de AINEs es la toxicidad gástrica que generan (Allison *et al*., 1992; Cryer y Kimmey, 1998). Estos fármacos producen irritación de la mucosa GI, ardor de estómago, nausea, vómito, erosiones y ulceración de la mucosa; situaciones que eventualmente evolucionan a condiciones severas, muchas de ellas mortales, como, hemorragia, perforación u obstrucción y que auténticamente, hoy en día han alcanzado dimensiones alarmantes (Rampton, 1987; Wolfe *et al.*, 1999).

La primera evidencia de los eventos adversos en el TGI fue presentada por Douthwaite y Linttot en 1938, quienes informaron del daño producido por la aspirina en el estómago. El descubrimiento del efecto antiinflamatorio de los AINEs a través de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, llevó directamente a proponer que estas juegan un papel importante en la defensa de la mucosa gástrica (Vane, 1971), además de la correlación entre tiempo y dosis del daño gástrico inducido por estos fármacos y su capacidad para suprimir la síntesis de prostaglandinas (Whittle, 1981; Rainsford y Willis, 1982; Lanza, 1989; Wallace *et al.,* 1993a).

1.7 Patogénesis del daño gastrointestinal inducido por los AINEs

Se han descrito varios mecanismos a través de los cuales este grupo de fármacos causan daño en el estómago (figura 4), aquí una breve descripción de dichos mecanismos sugeridos.

1.7.1 Mecanismo local: Efecto irritante tópico

El efecto tópico de los AINEs en el epitelio gástrico involucra varios mecanismos. La mayoría de los AINEs son ácidos débiles que a pH bajo, son solubles en lípidos y atraviesan las membranas plasmáticas de las células de la superficie gastrointestinal. Al pH intracelular se ionizan, pierden liposolubilidad y son parcialmente atrapados dentro de dichas células (Fromm, 1987). En esta situación, los AINEs lesionan las células de la mucosa por diversos mecanismos que incluyen: lisis osmótica posterior a la captura de iones de estos fármacos en las células epiteliales (Schoen y Vender, 1989) y la muerte

subsecuente de estas células por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Somasundaram *et al.*, 1995). Sin embargo, estas propiedades irritantes parecen no ser la principal contribución en el desarrollo de úlceras gástricas debido a que varios de los efectos adversos son observados después de la administración parenteral y rectal de dichos fármacos (Estes *et al.*, 1993).

1.7.2 Mecanismo dependiente de prostaglandinas

El efecto sistémico más importante que producen estos fármacos para inducir ulceración gástrica, es su capacidad para suprimir la síntesis de PGs (Vane, 1971). La evidencia experimental ha mostrado que las PGs mantienen la integridad de la mucosa ya que inhiben la secreción de ácido, estimulan la secreción de moco y bicarbonato e incrementan y mantienen el flujo sanguíneo (Atay *et al.*, 2000). Se sabe que la PGE_2 es quien regula estas funciones, ya que modula la secreción de ácido en el estómago mediante la reducción de las concentraciones de adenosin monofosfato cíclico (AMPc). En la célula parietal, PGE_2 interactúa con el receptor EP_3 el cual se encuentra acoplado a una proteína Gi, provocando la inhibición de la enzima adenilatociclasa, lo que trae como consecuencia una inhibición de la concentración de AMPc, el cual es requerido por la bomba intercambiadora de protón/potasio para la secreción de ácido (Atay *et al.*, 2000). La PGE_2 también regula la secreción de moco y bicarbonato, debido a que en la célula epitelial superficial interactúa tanto con el receptor EP_4 como con el receptor EP_1, los cuales se encuentran acoplados a proteínas Gs que al ser estimuladas activan a la adenilatociclasa y por consiguiente se produce AMPc, el cual activa a una proteína dependiente de AMPc, que es la encargada de fosforilar a otras proteínas que son las que regulan la secreción de moco y bicarbonato (Garner *et al.*, 1984; Chu *et al.*, 1999).

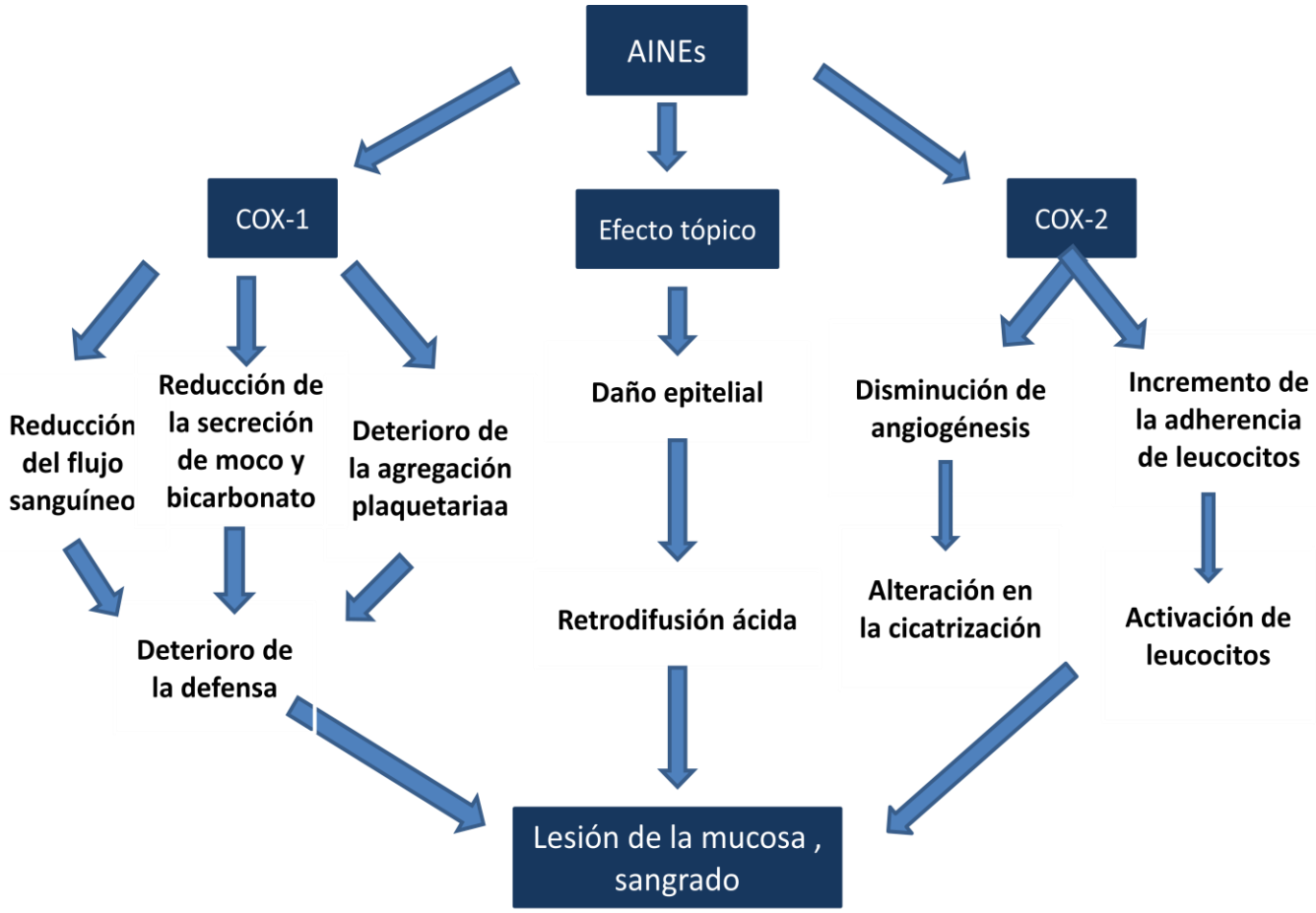


Figura 4: Patogénesis de la lesión gástrica inducida por los AINEs. El daño/sangrado que producen estos fármacos ocurre a través de tres vías fundamentales: inhibición de la actividad de COX-1, inhibición de la actividad de COX-2 y efecto citotóxico directo al epitelio. Modificado de Wallace y Vong, 1998.

1.7.3 Participación de los neutrófilos

La evidencia experimental ha demostrado que los neutrófilos participan en la patogénesis de la gastropatía inducida por AINEs. Como un evento temprano después de la administración de dichos fármacos, ocurre una significante adherencia de leucocitos al endotelio vascular en la microcirculación gástrica y mesentérica (Kitahora y Guth, 1987; Asako *et al., 1992*). Se ha demostrado que este grupo de fármacos, en particular, la indometacina y aspirina regulan a la alta la expresión de moléculas de

adhesión en el endotelio vascular de los vasos sanguíneos gástricos después de su administración (Andrews *et al.*, 1994). Una manera para comprobar la participación de neutrófilos en la generación de daño gástrico, fue realizar estudios con ratas neutropénicas, las cuales mostraron una resistencia al daño gástrico generado por AINEs (Wallace *et al.*, 1993b).

1.7.4 Papel del óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico fue descubierto como un factor liberado de las células endoteliales produciendo relajación del músculo liso vascular (Robbins *et al.*, 2004). Este gas, es sintetizado por la enzima sintasa de óxido nítrico (Por sus siglas en inglés, nitric oxide synthase: NOS) en la conversión de L-arginina a L-citrulina. Existe evidencia que indica que el NO es un mediador crucial que participa en la defensa de la mucosa GI, pero, paradójicamente también contribuye a la lesión de la mucosa en varias situaciones. Se ha reportado que una producción excesiva de NO en un proceso inflamatorio en la mucosa gástrica, contribuye a exacerbar la lesión del tejido (Miller y Grisham, 1995), debido a que se ha descrito que el NO regula de manera endógena la adhesión de leucocitos al endotelio (Wallace *et al.,* 2007).

El efecto gastroprotector del NO ha sido ampliamente documentado, este gas media múltiples funciones fisiológicas en el tracto gastrointestinal (TGI) que comparte con las prostaglandinas, ambos estimulan la secreción de moco y bicarbonato, elevan el flujo sanguíneo de la mucosa y aceleran la regeneración de úlceras (Wallace y Granger, 1996).

Los resultados a nivel experimental y estudios epidemiológicos en humanos sugieren que el NO exógeno tiene un efecto protector en el tracto gastrointestinal, específicamente contra el daño gástrico inducido por los AINEs (Wallace, 2006). Modelos experimentales han revelado que los AINEs generan daño gastrointestinal a través de la inhibición de las prostaglandinas, generando la disminución del flujo sanguíneo y la adherencia de leucocitos al endotelio en la microcirculación gástrica duodenal y mesentérica (Wallace y Tigley, 1995; Wallace, 1997); cuando las ratas son

pre-tratadas con sildenafil, un potente inhibidor de la fosfodiesterasa de guanosin monofostato cíclico (GMPc), este reduce significativamente el daño gástrico inducido por la indometacina comparada con los animales no tratados, y esta reducción es bloqueada por L-NAME, un inhibidor de la NOS (Santos *et al.*, 2005). Estos ejemplos ayudan a definir el efecto gastroprotector del NO, sugiriendo que este gas podría representar una diana terapéutica en desórdenes GI, además del hecho que donadores de NO podrían ayudar a proteger contra el daño gástrico inducido por AINEs.

1.8 Prevención y tratamiento del daño gástrico inducido por los AINES

Como se ha descrito en los párrafos anteriores, el uso crónico de los AINEs está asociado con un incremento significante de daño a la mucosa gastroduodenal y ulceración (Wilson, 1991). Dichos efectos representan un serio problema de salud pública, por ello se ha recurrido a la síntesis de antiinflamatorios no esteroideos que produzcan al mínimo dichos efectos, así también, se ha optado por desarrollar terapias profilácticas que reduzcan sustancialmente dicha toxicidad.

1.8.1 Inhibidores selectivos de COX-2 (COXIBS)

En 1990, se identificó a la COX-2 como una ciclooxigenasa inducible por estímulos proinflamatorios y responsable de la síntesis de prostaglandinas durante el daño tisular (Seibert *et al.*, 1994). Este acontecimiento llevó a la producción de antiinflamatorios no esteroideos, donde la inhibición selectiva de la COX-2 podría reducir la inflamación osteoarticular sin provocar daño a la mucosa gastrointestinal (Masferrer *et al.*, 1994). Estos inhibidores selectivos de COX-2 llamados también “coxibs” como el rofecoxib y celecoxib, fueron lanzados al mercado para reducir la morbilidad y la mortalidad gastrointestinal asociada con AINEs no selectivos (Zhao y Chen, 2007). En efecto, estudios endoscópicos aleatorizados revelaron que estos inhibidores selectivos disminuyen significativamente úlceras gastroduodenales comparadas con los AINEs no selectivos (Rostom *et al.*, 2007); sin embargo, estos fármacos aumentan el riesgo de infartos al miocardio durante el tratamiento, por lo cual algunos de ellos han sido retirados del mercado (Cairns, 2007; Spalding *et al.*, 2007).

1.8.2 Inhibidores de la ATPasa H^+/K^+ (bomba de protones)

Son medicamentos de uso relativamente reciente, derivados del bencimidazol; entre ellos tenemos al omeprazol, pantoprazol y lanzoprazol. El omeprazol es un profármaco, ya que el mismo no interacciona con la bomba de protones, sino que requiere de la conversión a un compuesto tetracíclico activo por el medio ácido existente en el canalículo secretor de la célula parietal. Este compuesto reacciona rápidamente formando uniones disulfuro con los residuos de cisteína de la cadena α del sector luminal de la ATPasa H^+/K^+ y origina el denominado complejo inhibitorio (Floréz y Espulgues, 2003), bloqueando de esta manera la secreción de iones H^+ y evitando la producción de ácido clorhídrico.

1.8.3 Antagonistas del receptor H_2 de histamina

Este grupo de medicamentos fue introducido al mercado en la década de 1970 con el antecedente de que la histamina endógena participa en el control fisiológico de la secreción gástrica. Los primeros representantes conservando el anillo imidazólico de la histamina fueron: burimamida y cimetidina; posteriormente, dicho anillo quedó sustituido por un furano (ranitidina) o un tiazol (famotidina) (Brunton y Chabner, 2012).

Farmacológicamente, estos antagonistas inhiben de manera competitiva la interacción de histamina con los receptores H_2, suprimiendo de esta manera la secreción de ácido gástrico, mecanismo por el cual resultan útiles en la profilaxis de la úlcera péptica ocasionada por dicho ácido. Sin embargo, estudios en pacientes han revelado que estos medicamentos resultan inefectivos en la prevención del daño gastroduodenal ocasionado por AINEs, ya que al comparar cimetidina vs placebo en la prevención de daño gástrico ocasionado por estos antiinflamatorios, la cimetidina no ofreció un beneficio comparado con el grupo tratado con placebo (Roth *et al.*, 1987).

1.8.4 Misoprostol

Un enfoque diferente para la protección de la mucosa pero centrándose en la preservación del efecto gastroprotector de las PGs, es la administración concomitante de un AINE con misoprostol, una PGE_1 análoga sintética. Aunque este fármaco ha

demostrado eficacia, su utilidad se encuentra limitada debido a la presencia de efectos colaterales, principalmente diarreas (Sacco *et al.*, 2007). Aunado a esto, en pacientes con antecedentes de úlcera péptica, el misoprostol no tiene ningún efecto protector significativo contra el riesgo de sangrado (Wallace y Ma, 2001).

1.8.5 AINEs modificados químicamente

Otra estrategia para limitar el daño GI producido por los AINEs convencionales, es la incorporación de una molécula química con actividad gastroprotectora a la estructura química de dichos fármacos. Este enfoque ha conducido al desarrollo de AINEs liberadores de óxido nítrico y AINEs liberadores de sulfuro de hidrógeno.

1.8.5.1 AINEs liberadores de óxido nítrico (Nitro-AINEs)

El óxido nítrico tiene la capacidad de compensar la reducción del flujo sanguíneo de la mucosa y bloquear la adherencia de neutrófilos al endotelio vascular asociado con AINEs en el tracto gastrointestinal. Basados en estas propiedades, se han propuesto agentes farmacológicos donadores de NO que ayuden a reducir la toxicidad gastrointestinal de estos fármacos (Wallace *et al.*, 1994a; Wallace *et al.*, 1994b; Wallace, 1997).

Durante los últimos 10 años, una serie de AINEs no selectivos incluyendo la aspirina, diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno e indometacina han sido acoplados a una estructura donadora de NO y sus acciones han sido ampliamente exploradas en modelos de inflamación y ulceración GI (Kleebe y Moore, 2002; Cirino, 2003). Un ejemplo de ello es la nitro aspirina (NCX-4215); estudios pre-clínicos han revelado que esta no causa daño gástrico en la rata y un hecho muy interesante es que exhibe actividad antiplaquetaria relativa a la aspirina, este efecto ha sido atribuido al efecto inhibitorio del NO en la adhesión y agregación plaquetaria (Wallace *et al.*, 1995).

1.8.5.2 AINEs liberadores de sulfuro de hidrógeno

Como se ha mencionado en párrafos anteriores, los AINEs, incluyendo los inhibidores selectivos de COX-2, estimulan la adherencia de leucocitos al endotelio vascular en la circulación mesentérica (Asako *et al.*, 1992; Wallace *et al.*, 1993b). Se ha demostrado

que este proceso contribuye significativamente a la patogénesis del daño gástrico inducido por AINEs debido a la exacerbación de la respuesta inflamatoria (Wallace *et al.*, 1991; Wallace *et al.*, 1993b; Wallace *et al.*, 2000). En el tracto gastrointestinal (TGI), estudios recientes sugieren que el H_2S participa en la defensa de la mucosa contra el daño causado por los antiinflamatorios no esteroideos (Fiorucci *et al.*, 2005) jugando un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo en la mucosa gástrica, se ha propuesto que el mecanismo por el cual el H_2S ejerce esta propiedad antiinflamatoria podría deberse a la participación de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) (Fiorucci *et al.*, 2006), debido a que se ha demostrado que el H_2S reduce la infiltración de leucocitos y formación de edema a través de la activación de estos canales (Zanardo *et al.*, 2006).

Recientemente, en un modelo experimental, el diclofenaco liberador de H_2S ha demostrado una reducción del daño GI comparado con el AINE convencional, además de poseer actividad antiinflamatoria similar y supresión de la síntesis de PGs (Wallace *et al.*, 2007). Por lo tanto, estos fármacos tendrían un potencial en la prevención del daño gástrico ocasionado por AINEs.

1.9 Canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP})

El descubrimiento de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) fue hecho en 1983 por Noma en células cardiacas, estos canales representan una familia de canales de K^+, que posteriormente, fueron descubiertos en la membrana plasmática de las células β del páncreas, del músculo esquelético, del músculo liso y del sistema nervioso central (Noma, 1983; Standen *et al.,*1989; Ashcroft y Ashcroft, 1990). Poco después, se encontraron también a nivel de la membrana interna mitocondrial (Inoue *et al.*, 1991). Ambos tipos de canales tienen la habilidad única de acoplar el potencial de membrana plasmático (y/o el potencial redox mitocondrial, y/o la liberación de radicales libres) al estado metabólico de la célula (O'Rourke, 2000; Pain *et al.*, 2000). Existen evidencias de que estos canales son modulados intracelularmente por la relación ATP/ADP y que

son blanco terapéutico de un tipo de fármacos denominados sulfonilureas (Ashcroft, 1996).

1.9.1 Estructura molecular de los canales de K_{ATP}

El canal de K_{ATP} es un complejo proteico octomérico compuesto por dos tipos de subunidades, una subunidad receptora de sulfonilureas (SUR1, SUR2A, SUR2B) y un canal de potasio rectificador entrante perteneciente a la familia $K_{ir}6_x$ (Kir6.1 o Kir 6.2) que forma el poro del canal (Inagaki *et al.*, 1995; Ammala *et al.*, 1996; Isomoto *et al.,* 1996; Shyng y Nichols, 1997). La conformación de estos canales varía en los diferentes tejidos que los expresan, por ejemplo: el músculo liso vascular expresa canales de K_{ATP} conformados por $Kir_{6.2}/SUR_1$ y en músculo cardiaco y esquelético se expresa el canal compuesto por $Kir_{6.2}/SUR_{2A}$ (figura 5) (Isomoto *et al.*, 1996).

Los receptores SUR son sensores intracelulares de la relación ATP/ADP que regulan la actividad de los canales Kir, pertenecen a la familia de las proteínas cassette de unión a ATP (siglas en inglés ATP-binding cassette:ABC) (Tusnady *et al.*, 1997), más específicamente de la subfamlia ABC (ABC8 para SUR_1 y ABC9 para SUR_2), y poseen 2 dominios de unión a ATP, conocidos como NBF1 para ATP y NBF2 para MgATP (Tusnady *et al.*, 2006) (Figura 5).

Es importante mencionar que el comportamiento del canal es dependiente del órgano donde se localiza, por lo que su activación y mecanismo de acción varía en cada tipo celular. En el corazón, por ejemplo, los canales de K_{ATP} de los cardiomiocitos están usualmente cerrados, se abren bajo condiciones de hipoxia o isquemia, lo que provoca un acortamiento del potencial de acción y a consecuencia de esto hay una disminución de la fuerza de contracción debido a la falta de disponibilidad de energía. Se cree que éste es el mecanismo de protección mediante el cual la célula se adapta a la falta de energía y protege sus reservas durante los periodos de flujo sanguíneo interrumpido (Suzuki *et al.*, 2001).

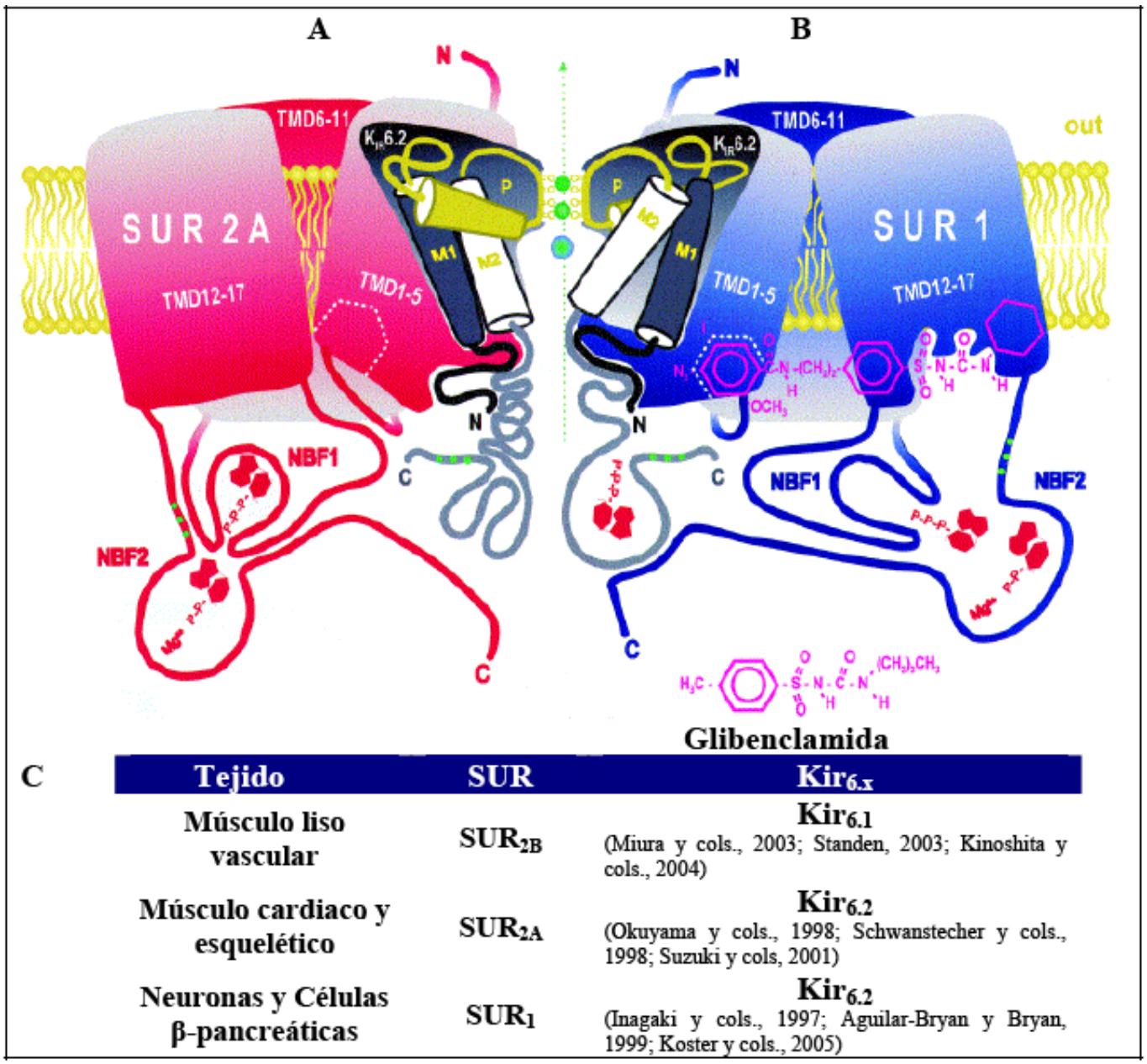
En el páncreas, en contraste, la apertura de los canales de K_{ATP} está regulada por la concentración de glucosa en sangre (lo que modula el metabolismo energético de estas células). Durante la hipoglucemia, la concentración de ATP intracelular decrece

aumentando la concentración de ADP lo que ocasiona el cierre de los canales, esto a su vez despolariza la membrana y se incrementa la secreción de insulina, por lo que los canales de K_{ATP} juegan un papel importante en la homeostasis de la glucosa (Gopel *et al.*, 2000; Aguilar-Bryan *et al.*, 2001).

1.9.2 Farmacología de los canales de K_{ATP}

Los canales de K_{ATP} tienen características farmacológicas particulares. Su probabilidad de apertura se reduce por la acción de sulfonilureas (glibenclamida) y esta probabilidad aumenta por la acción de abridores de los canales de K^+ como el pinacidil y cromakalim, (Gross *et al.*, 1999; Uhde *et al.*, 1999) mecanismo dependiente de la selectividad de estos compuestos por los diferentes tipos de canales (figura 5). Además, los canales de K_{ATP} pueden ser modulados por una variedad de compuestos, en el caso de los nucleótidos citosólicos, estos canales son inhibidos por concentraciones de ATP intracelular (10-100 µM) en presencia o ausencia de Mg^{2+}. Asimismo, el ADP, el GTP y el GDP reducen la actividad de los canales de K_{ATP} (Tammaro *et al.*, 2006). Un incremento en el cociente de las concentraciones citosólicas de ATP/ADP o la adición de sulfonilureas conduce a una inhibición de la actividad de los canales de K_{ATP} y por lo tanto, a una despolarización de la membrana plasmática, lo cual produce la apertura del canal de calcio dependiente de voltaje Ca_v y un aumento de la afluencia de Ca^{2+}. Lo que resulta en un incremento del calcio intracelular que induce o facilita la contracción en el caso del MLV (Jackson, 2005; Koster *et al.*, 2005) o la exocitosis de insulina en el caso de las células β del páncreas (Koster *et al.*, 2005).

Los abridores de los canales de K^+ (KCOs; cromacalima y pinacidil) pueden activar los canales de K_{ATP} en una variedad de tejidos vasculares y no vasculares aumentando el flujo de K^+ al espacio extracelular produciendo hiperpolarización, y una disminución del Ca^{2+} intracelular lo que dará como resultado la relajación del MLV (Kinoshita *et al.*, 2004). Schwanstecher y colaboradores demostraron en 1998 que el sitio de unión de los KCOs está localizado en el receptor SUR, y que un cambio conformacional inducido por la hidrólisis del ATP en ambos NBFs, probablemente da lugar a un fuerte incremento en la afinidad de KCOs.



C

Tejido	SUR	$Kir_{6.x}$
Músculo liso vascular	SUR_{2B}	$Kir_{6.1}$ (Miura y cols., 2003; Standen, 2003; Kinoshita y cols., 2004)
Músculo cardiaco y esquelético	SUR_{2A}	$Kir_{6.2}$ (Okuyama y cols., 1998; Schwanstecher y cols., 1998; Suzuki y cols, 2001)
Neuronas y Células β-pancreáticas	SUR_1	$Kir_{6.2}$ (Inagaki y cols., 1997; Aguilar-Bryan y Bryan, 1999; Koster y cols., 2005)

Figura 5: Conformación de los canales de K_{ATP}. A) Representación del estado abierto del canal $Kir_{6.2}/SUR_{2A}$. Se muestra como el sitio de unión a ATP del canal $Kir_{6.2}$ está libre lo cual provoca el estado abierto. **B)** Representación del canal $Kir_{6.2}/SUR_1$ en estado cerrado, donde se puede apreciar como el ATP está unido al $Kir_{6.2}$, lo cual provoca la inactivación del canal. Así mismo, se muestra el sitio de unión de la glibenclamida en el receptor SUR, que de igual forma provoca el cierre del canal. C) Conformación de los canales de K_{ATP} en los diferentes tejidos que se expresan. A y B Modificado de Babenko *et al.*, 1999.

Cinvestav

Efecto diferencial de los abridores y bloqueadores de los canales de K_{ATP} sobre los canales de la mitocondria ($mitK_{ATP}$) y los del sarcolema (K_{ATP})		
Abridores de canales de K^+	**$mitK_{ATP}$**	**K_{ATP}**
Diazóxido	√	**a**
Nicoradil	√	**b**
Cromacalima	√	√
Pinacidil	√	√
Sulfato de minoxidil	√	√
isoflurano	√	√
Apricalima	√	√
MCC-134	x	√
Bloqueadores de canales de K^+		
5-Hidroxidecanoato (5-HD)	√	c
Glibenclamida, glipizida	√	√
Glimepirida	**d**	√
HMR1098 (1883)	**e**	√

Tabla 2: Los abridores de canales de K^+, diazóxido, nicorandil y el bloqueador 5-HD, han mostrado selectividad sobre la forma mitocondrial, mientras que la glimepirida y el HMR1098 (1883) son más selectivos para los canales de membrana plasmática. **(√)** significa que el abridor o bloqueador muestra actividad sobre la proteína; **(x)** que el compuesto no mostró ningún efecto. En algunos casos la selectividad depende del tipo de célula y de las condiciones experimentales. **a.** El diazóxido puede activar los canales K_{ATP} a altas concentraciones o cuando la concentración de ADP es alta; **b.** El nicoradil activa los canales K_{ATP} a altas concentraciones; **c.** El 5-HD inhibe los canales K_{ATP} a bajo pH; **d.** La glimepirida inhibe los canales K_{ATP}, pero no inhibe la cardioprotección; **e**. HMR-1883 bloquea los canales K_{ATP}, pero no inhibe el precondicionamiento isquémico. Modificado de O'Rourke, 2004.

Recientemente, se ha demostrado que la activación de los canales de K_{ATP}, están involucrados en la defensa de la mucosa gástrica (Peskar *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2006). Peskar y colaboradores, 2002 demostraron que el mecanismo gastroprotector de PGE_2, en parte está siendo regulado por la activación de dichos canales. En este estudio, en un modelo de daño gástrico con etanol (70%), la administración de 10 mg/kg p.o de glibenclamida disminuyó de manera significativa el efecto gastroprotector de la administración de 75 ng/kg p.o de 16,16-dimetil-PGE_2, por su parte, la cromacalima (agonista de los canales de K_{ATP}) en dosis de 0.3mg/kg p.o restaura el efecto gastroprotector ejercido por 16,16-dimetil-PGE_2 en el daño gástrico producido por etanol en la rata, este antagonismo en el efecto entre el bloqueador y activador de los canales de K_{ATP} es una evidencia de la participación de dichos canales. Los autores concluyen que las PGs endógenas activan canales de K_{ATP}, proceso que requiere la participación de los receptores de PGs, explicándose este proceso de gastroprotección.

Por otro lado, Akar y colaboradores en 1999 demostraron que la cromacalima y el diazóxido (abridores de canales de K^+) reducen el daño gástrico inducido por la indometacina en un modelo murino, ejerciendo un efecto gastroprotector, mientras que la glibenclamida (bloqueador de los canales de K_{ATP}) disminuye de manera significativa el efecto gastroprotector producido por los abridores de los canales de K^+ anteriormente mencionados. Con esos resultados, los autores sugieren que los canales de K_{ATP} juegan un papel crítico en el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica, probablemente a través de la regulación de la función de neutrófilos, debido a que, en dicho trabajo la administración de cromacalima y de diazóxido disminuyen la adherencia de neutrófilos en la mucosa gástrica inducida por la indometacina, tomando en cuenta que este es uno de los mecanismos principales a través del cual la indometacina genera daño gástrico.

1.10 Curcumina

1.10.1 Generalidades

La *Curcuma longa L. o* turmérica es un miembro perenne de la familia de la Zingiberaceae, cultivada en India y en otras partes del sureste de Asia (Ammon y Wahl, 1991). A lo largo de la historia, esta planta ha sido utilizada en la medicina Adyurvérica como un tratamiento de las condiciones inflamatorias (Allen *et al.*, 1991). La turmérica contiene turmerina (un péptido soluble en agua), aceites esenciales (turmerones, atlantones, zingiberone) y curcuminoides: curcumina (diferuloilmetano), demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina (Daube, 1870). La curcumina es la sustancia causante del color amarillo característico de los rizomas de esta planta y es uno de los principales ingredientes activos responsables de su actividad biológica (figura 6).

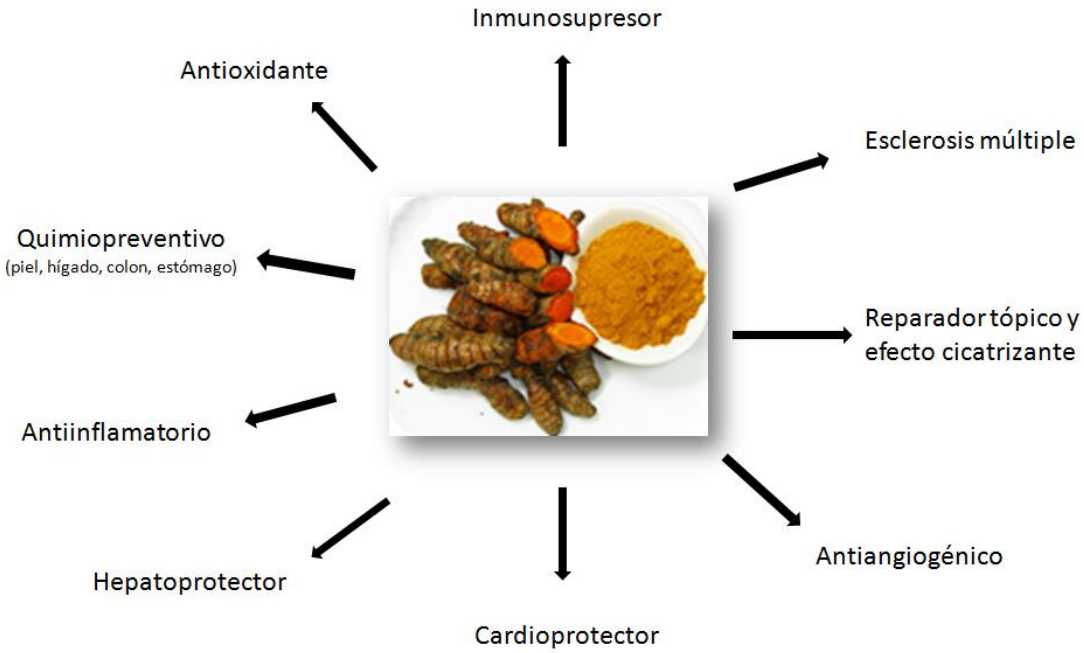


Figura 6: Propiedades medicinales de la curcumina. Modificado de Aggarwal *et al.,* 2006.

1.10.2 Estructura química de la curcumina

La curcumina es un polifenol lipofílico cuya estructura química es 1,7 bis (4-hidroxi-3-metoxifenol)-1,6 heptadieno-3,5-diona) (figura 7), la síntesis de este compuesto es bien conocida y su estructura fue determinada en 1910 (Ammon y Wahl, 1991).

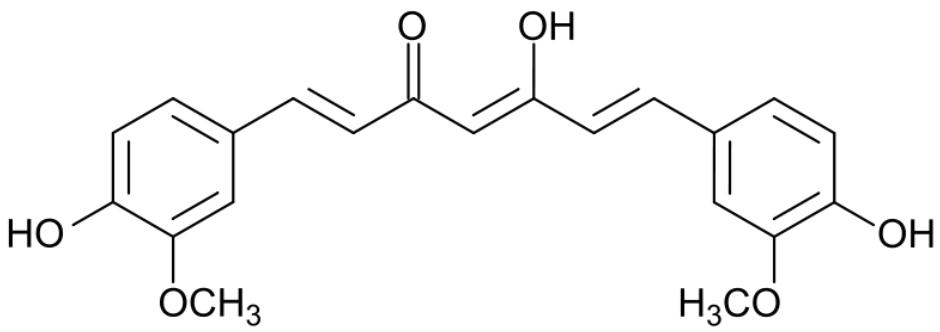


Figura 7: Estructura química de curcumina. Tomado de Aggarwal *et al.,* 2006.

La curcumina es estable a pH ácido (1-2), sin embargo, esta estabilidad disminuye conforme al aumento del pH (Tonnesen y Karlsen, 1985). Su elevada lipofilia le permite una rápida absorción gastrointestinal por difusión pasiva (Holder *et al.*, 1978). Tras la administración de curcumina, esta se biotransforma primero a dihidrocurcumina y tetrahidrocurcumina, y estos compuestos posteriormente son convertidos a conjugados monoglucurónidos (Pan *et al.*, 1999), de forma que los principales metabolitos de la curcumina son los glucorónidos dihidrocurcumina y tetrahidrocurcumina.

1.10.3 Seguridad de la curcumina

Desde la antigüedad, en Asia, los extractos de *Curcuma longa* y curcumina han sido empleados para tratar diferentes condiciones, en las que no se han reportado efectos adversos; lo cual ha despertado la inquietud de varios investigadores. Se estima que en la India se consume diariamente 80 a 200 mg de curcumina (Grant y Schneide, 2000). Informes anecdóticos sugieren que el consumo en la dieta de 150 mg de curcumina/día no produce efectos adversos (Eigner y Scholz, 1999). También, es importante

mencionar que no se reportaron efectos adversos en el tratamiento durante 3 meses con 8,000 mg de curcumina al día, en humanos (Chainani-Wu, 2003).

1.10.4 Propiedades terapéuticas de la curcumina

En las últimas tres décadas, la curcumina ha sido sujeto de cientos de publicaciones estudiando sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y quimiopreventivas principalmente (Shehzad *et al.*, 2010). Se ha demostrado que este polifenol ejerce un amplio espectro de actividades biológicas a través de la activación de factores de transcripción y vías de señalización (Aggarwal *et al.*, 2007; Goel y Aggarwal, 2010). Aquí, una breve descripción de algunos de los mecanismos biológicos que se han descrito:

Uno de los primeros mecanismos biológicos reportados fue el efecto bacteriostático y bactericida contra microorganismos involucrados en la colecistitis (Lutomski *et al.*, 1974). Años más tarde, se reportó la actividad antiinflamatoria, la cual ejerce a través de la activación del metabolismo de eicosanoides y a su capacidad para disminuir la síntesis de citocinas como TNF-α; así como de algunos factores de transcripción NF-kβ (Jobin *et al.*, 1999). Varios autores reportan el amplio efecto hepatoprotector, tanto *in vitro* como *in vivo,* en distintos modelos animales (Luper, 1999). Park y colaboradores, 2000 muestran el efecto hepatoprotector de la curcumina en el daño agudo y subcrónico inducido por CCl_4, después de observar que esta disminuye los marcadores de daño hepático.

1.10.5 Efecto gastroprotector de la curcumina

Otra propiedad reportada por la curcumina y de importancia clínica, es el efecto gastroprotector que posee. Existe evidencia que los extractos de *Curcuma longa* disminuyen la producción de ácido gástrico al bloquear los receptores H_2 (Kim *et al.*, 2005). Munzenmaier y colaboradores, 1997 comprobaron que la curcumina inhibe la producción de interleucina 8 (IL-8) inducida por *Helicobacter pylori*, la cual juega un importante papel en el desarrollo de gastritis, úlcera y adenocarcinoma gástrico.

Recientemente, ha sido publicado que la curcumina ejerce un efecto gastroprotector en la gastropatía inducida por la indometacina, mejorando la microcirculación gástrica a través de la modulación de TNF-α e ICAM-1 (Thong-Ngam *et al.*, 2012).

2. ANTECEDENTES

Ha sido mencionado en párrafos anteriores el efecto protector de la curcumina en el daño gástrico inducido por la indometacina en la rata (Thong-Ngam *et al.*, 2012), sin embargo, la investigación sobre dicho mecanismo ha sido escasa y debido al grave problema de salud pública que representa la toxicidad generada por los AINEs, hemos optado por indagar este mecanismo gastroprotector en el daño gástrico producido por este fármaco.

Como antecedente directo a este proyecto, De Paz Campos y colaboradores, 2012 demostraron que en el efecto antinociceptivo de la curcumina participan los canales de $K_{ATP.}$ En un modelo de dolor inducido por formalina (1%) mediante la inyección plantar, se cuantificó el comportamiento nociceptivo con el número de sacudidas de la pata de la rata, el pre-tratamiento de 100 mg/kg p.o de la curcumina disminuye de manera significativa el comportamiento nociceptivo inducido por la formalina, mientras que, la administración de 100 µg/kg intraplantar de la glibenclamina disminuye de manera significativa el efecto antinociceptivo de la curcumina, evidenciando con ello la participación de estos canales. Sin embargo, en dicho trabajo los canales de K_{ATP} no son activados por la vía NO/GMPc ya que la administración de L-NAME u ODQ, inhibidores de la sintasa de NO y la guanilato ciclasa soluble, respectivamente, no fueron capaces de revertir el efecto antinociceptivo de la curcumina. Los autores concluyen que probablemente los canales de K_{ATP} estén siendo activados por otra vía de señalización independiente, como por ejemplo, la activación de los receptores opiodes.

Recientemente, la activación de los canales de K_{ATP} ha sido descrita en gastroprotección, Medeiros y colaboradores, 2008 reportaron que sildenafil protege del daño gástrico inducido por etanol en un mecanismo que involucra la vía NO/GMPc/ K_{ATP}. La administración de L-NAME (3 mg/kg i.p), un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, ODQ (10 mg/kg i.p), inhibidor de la enzima guanilato ciclasa y glibenclamida (0.1, 0.3, 3 mg/kg i.p), bloqueador de los canales de $K_{ATP,}$ revierten de manera significativa el efecto protector inducido por 1 mg/kg p.o de sildenafil. De la misma manera, esta vía de gastroprotección fue descrita en el efecto protector de

carbenoxolona en el daño gástrico inducido por etanol, la administración de L-NAME (70 mg/kg i.p), ODQ (10 mg/kg i.p) y glibenclamida (1 mg/kg i.p), disminuyeron el efecto gastroprotector de 30 mg/kg p.o de carbenoxolona. En este estudio, carbenoxolona restableció los niveles de NO en el tejido gástrico que disminuyen con la administración de etanol (Chávez Piña *et al*., 2011). En ambos trabajos se discute que tanto sildenafil como carbenoxolona protegen del daño gástrico inducido por etanol en un proceso dependiente del NO, este gas estimula a la enzima guanilato ciclasa soluble en las células del músculo liso produciéndose GMPc, y este aumento de GMPc promueve la activación de canales de K_{ATP} en la microcirculación gástrica, lo que favorece el aumento del flujo sanguíneo y la secreción de moco y bicarbonato contribuyendo a la gastroprotección.

De acuerdo a estos antecedentes proponemos que el mecanismo gastroprotector de curcumina sea dependiente de la producción de NO en tejido gástrico y que este gas regule la apertura de los canales de K_{ATP}, facilitando de esa manera la relajación del músculo liso en el tracto gastrointestinal llevando a la citoprotección local.

3. JUSTIFICACIÓN

- Han sido diversas las estrategias utilizadas para disminuir los efectos adversos de los AINEs; sin embargo, dichos efectos a la fecha siguen siendo un problema de salud pública, por lo cual, se ha recurrido a la investigación de la medicina tradicional para adyuvar a los tratamientos ya existentes en el mercado.

- Por otro lado, se ha identificado el efecto gastroprotector de la curcumina en el daño gástrico producido por la indometacina, sin embargo, es necesario determinar los mediadores que están participando en el mecanismo gastroprotector para un mayor entendimiento de éste.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el mecanismo por el cual la curcumina está ejerciendo su efecto gastroprotector en el daño gástrico inducido por indometacina en la rata.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto gastroprotector de la curcumina en el daño gástrico generado por la administración oral de la indometacina en la rata.

2. Cuantificar los niveles de PGE_2 en tejido gástrico de rata en el efecto gastroprotector de la curcumina.

3. Caracterizar la participación de los canales de K_{ATP} en el efecto gastroprotector de la curcumina.

4. Identificar la participación del óxido nítrico en el efecto gastroprotector de la curcumina.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Manejo de animales

Los experimentos se realizaron con ratas hembra de la cepa Wistar de 8 semanas de edad y con un peso de 180-230 g, adquiridos en el bioterio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). Los animales fueron acondicionados en un ciclo de luz-oscuridad de 12 x 12 horas a temperatura ambiente, proveyéndoles de agua y alimento *ad libitum* durante dicho acondicionamiento. Se sometieron al ayuno de 18-20 h antes de la realización del experimento correspondiente. Los roedores fueron tratados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado de los animales (NOM-062-ZOO-1999). Después de la administración de los fármacos, los animales fueron sacrificados en una cámara de CO_2.

5.2 Fármacos y reactivos

Los fármacos fueron preparados minutos antes de realizar los experimentos y fueron administrados por vía oral e intraperitonial cuando así se requería. La indometacina (99% de pureza), el omeprazol (98% de pureza), la curcumina (80% de pureza), la glibenclamida (99% de pureza), la N^G-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME 98% de pureza), la carboximetilcelulosa (CMC), el cloruro de sodio (NaCl), el hidróxido de sodio (NaOH), la sulfanilamida, la N-(1-naftil)-etilendiamina dihidrocloruro, fueron adquiridos de Sigma Aldrich S.A de C.V.

El kit de ELISA utilizado para medir el nivel de PGE_2 en el tejido gástrico (No. 514010) y el kit colorimétrico de nitritos y nitratos (No. 78001) fueron obtenidos de Cayman Chemical.

5.3 Modelo de daño gástrico

Las lesiones producidas por la indometacina fueron determinadas siguiendo el método descrito por Wallace et al., (2000). Los animales de experimentación recibieron agua *ad libitum* y fueron sometidas a ayuno de 18-20 h, posterior a este tiempo recibieron la indometacina por vía oral (p.o.); tres horas después, los animales fueron sacrificados en una cámara de CO_2, debido a que en este periodo de tiempo se genera el máximo de lesión (Souza et al., 2008). El estómago es removido y se abrió por la curvatura mayor. Con una regla se midió el área de lesión y se determinó la suma de las lesiones del corpus de cada animal, esta suma representa el grado de daño gástrico reportado en mm^2. El porcentaje de gastroprotección (% GP) fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación: % de Gastroprotección = (IUC-IUT) x 100/IUC, donde IUC es el índice de úlcera del grupo testigo y IUT es el índice de úlcera de los animales tratados (Navarrete *et al.*, 2005).

5.4 Lesiones gástricas inducidas por indometacina en un modelo de daño crónico

Las ratas se dividieron en 4 grupos (n=5), las cuales recibieron diariamente el vehículo ($NaHCO_3$), o bien, las dosis de indometacina (0.5, 3 y 5 mg/kg p.o, 0.1ml/100g) durante una y tres semanas; los animales se mantuvieron en ayuno de 20 h antes de la ultima administración del fármaco (Diagrama 1); después del último día de tratamiento, fueron sacrificadas en una cámara de CO_2. La evaluación del daño gástrico fue determinado de acuerdo al método descrito en el punto 5.3

5.5 Lesiones gástricas inducidas por indometacina en un modelo de daño agudo

Las ratas fueron sometidas a un ayuno previo de 20 h y distribuidas de forma aleatoria (n=6). Recibieron la administración oral de indometacina a dosis de 3, 10 y 30 mg/kg p.o en un volumen de 0.1ml/100g. Tres horas después de la administración fueron sacrificadas en una cámara de CO_2 (Diagrama 2). Se determinó el daño gástrico de acuerdo al método descrito en el punto 5.3

5.6 Evaluación del efecto gastroprotector de la curcumina en el modelo de daño agudo generado por indometacina

Para evaluar el papel gastroprotector de la curcumina, las ratas sometidas a un ayuno previo de 20 h y distribuidas aleatoriamente (n=5-9), recibieron un pre-tratamiento de 30 mg/kg p.o de curcumina disuelta en carboximetilcelulosa (CMC) 30 minutos antes de la administración de 30 mg/kg p.o de indometacina. Tres h posterior a ello, las ratas se sacrificaron en una cámara de CO_2. El daño gástrico fue determinado como se describe en el punto 5.3. El % de gastroprotección se determinó de acuerdo a lo descrito por Navarrete (2005). El grupo testigo recibió los vehículos de los fármacos (CMC al 0.5% y $NaHCO_3$ al 0.5%) en el mismo volumen (0.1 ml/100g) y vía de administración; el grupo testigo de curcumina recibió CMC al 0.5% (0.4ml/100g) e indometacina a la dosis anteriormente mencionada (Diagrama 3).

La dosis de curcumina fue seleccionada de estudios previos realizados por De Paz Campos, cuyo trabajo está en proceso de publicación.

5.7 Cuantificación de los niveles de PGE_2 en tejido gástrico de rata en el efecto gastroprotector de curcumina

El tejido gástrico de las ratas tratadas con la curcumina y la indometacina se depositaron en un tubo eppendorf conteniendo 1 ml de buffer de fosfatos (10 mmol/L, pH: 7.4). El tejido fue cortado con unas tijeras durante 30 segundos dentro del mismo tubo, a continuación se colocó en un baño de agua a 37 C° durante 20 minutos; posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm durante 1 minuto, se separó el sobrenadante y se colocó en un tubo eppendorf de la misma capacidad y se guardó a -70 ºC. La determinación de PGE_2 se realizó a través de un kit de ELISA (Prostaglandin E_2 EIA Kit-Monoclonal Cayman Chemical).

5.8 Determinación de prostaglandina E_2 (PGE_2)

La cuantificación de PGE_2 se realizó por medio de un kit de ELISA (Cayman Chemical). El kit se basa en la competencia de PGE_2 que se va a cuantificar con el trazador (AchE) por la unión al anticuerpo monoclonal para PGE_2. Debido a que la concentración del trazador para PGE_2 es constante y la de PGE_2 varía, la cantidad de PGE_2 que se une al anticuerpo monoclonal será inversamente proporcional a la concentración de PGE_2 en el pozo. El complejo anticuerpo-PGE_2 (libre o al trazador) se une al anticuerpo policlonal de cabra que ha sido previamente unido al pozo. El plato del kit se lava para eliminar algún reactivo no unido y después se adiciona el reactivo de Ellman´s, el cual contiene el sustrato para la acetilcolinesterasa (AChE). El producto de la reacción enzimática da como resultado una coloración amarilla la cual se absorbe fuertemente a 412 nm. La intensidad del color es determinada espectofotométricamente y es proporcional a la cantidad de trazador-PGE_2 unido al pozo, el cual es inversamente proporcional a la cantidad de PGE_2 libre presente en el pozo durante la incubación y por lo tanto, a la cantidad de PGE_2 en cada muestra estudiada.

5.9 Efecto gastroprotector de omeprazol en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina

Las ratas distribuidas de forma aleatoria (n=5-9) fueron sometidas a un ayuno previo de 20 h, al término de este tiempo recibieron un pre-tratamiento de omeprazol a la dosis de 30 mg/kg p.o disuelto en solución salina al 0.9%. La inducción y determinación del daño gástrico fue realizado 30 minutos más tarde como se describió en el punto 5.3. El grupo testigo recibió únicamente los vehículos de ambos fármacos (solución salina al 0.9% y $NaHCO_3$ al 0.5%) en el mismo volumen (0.1ml/100g) y vía de administración (Diagrama 4).

5.10 Participación de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) en el efecto gastroprotector de la curcumina

Para determinar la participación de los canales de K_{ATP} en el efecto gastroprotector de la curcumina, se administró la glibenclamida a la dosis de 1 mg/kg disuelta en NaOH 0.05 M i.p, 30 minutos antes de la administración de la curcumina (30 mg/kg p.o.). La

inducción y determinación del daño gástrico fue realizado 30 minutos más tarde como se describió en el punto 5.3. El grupo testigo fue tratado de la siguiente manera: NaOH O.O5 M i.p, CMC al 0.5% e indometacina p.o (Diagrama 5).

La dosis de glibenclamida fue seleccionada de estudios previos realizados por Medeiros y colaboradores en 2008.

5.11 Participación del óxido nítrico (NO) en el efecto gastroprotector de la curcumina

Para identificar la participación de NO en el efecto gastroprotector de la curcumina, las ratas (n=4-7) recibieron un pre-tratamiento de L-NAME, a la dosis de 70 mg/kg i.p disuelta en solución salina al 0.9%, 30 minutos después se administró la curcumina p.o a la dosis mencionada en el punto 5.6 y 30 minutos más tarde se administró 30 mg/kg p.o de la indometacina. Las lesiones gástricas fueron determinadas como se describe en el punto 5.3 (Diagrama 6). El grupo testigo recibió: solución salina al 0.9% i.p, CMC al 0.5% e indometacina p.o (Diagrama 6).

La dosis de L-NAME fue seleccionada de estudios realizados por Chávez Piña y colaboradores en 2011.

5.12 Cuantificación de los niveles de óxido nítrico en el tejido gástrico de rata en el efecto gastroprotector de la curcumina

Se corta la región del corpus del estómago de cada animal que recibió tratamiento de acuerdo al punto 2.11, dicho tejido se pesó y se colocó en un tubo eppendorf conteniendo 1 ml de buffer de fosfatos (10 mmol/L, pH 7.4). El tejido se cortó durante 30 segundos dentro del mismo tubo y después se colocó en un baño de agua a 37°C durante 20 min. Las muestras se centrifugaron durante 1 min a 9,000 rpm obteniendo de esta manera el sobrenadante, el cual se colocó en un segundo tubo eppendorf de la misma capacidad, el cual se guardó a -70 °C para su posterior análisis.

5.13 Determinación de los niveles de nitritos y nitratos

Los niveles de óxido nítrico se midieron por la reacción de Griess. Debido a que el NO tiene una vida media corta ($t_{1/2}$=4 s), su determinación se realizó con la medición de nitritos (NO_2), un producto final de su metabolismo, el cual proporciona una correlación directa de la cantidad de NO en cierto tejido.

El método se basa en un proceso de dos pasos simples. En el primer paso el nitrato es convertido a nitrito por la enzima nitrato reductasa, en el segundo paso, el nitrito reacciona con el reactivo de Griess (reactivo 1: 1% de sulfanilamida en ácido fosfórico al 5%; reactivo 2: N-naftil etilendiamino al 2%) y al final de la reacción se produce un compuesto “azo” color púrpura, la absorbancia de este compuesto se midió a una longitud de onda de 540 nm mediante un método espectrofotométrico. Este cromóforo “azo” determina con precisión la concentración de nitrito como marcador de óxido nítrico.

5.14 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio de un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de Student-Newman-Keuls mediante el programa computacional GraphPad Prisma, versión 4.0. Se consideraron valores estadísticamente significativos aquellos que presentaron una $p \leq 0.05$.

DIAGRAMAS

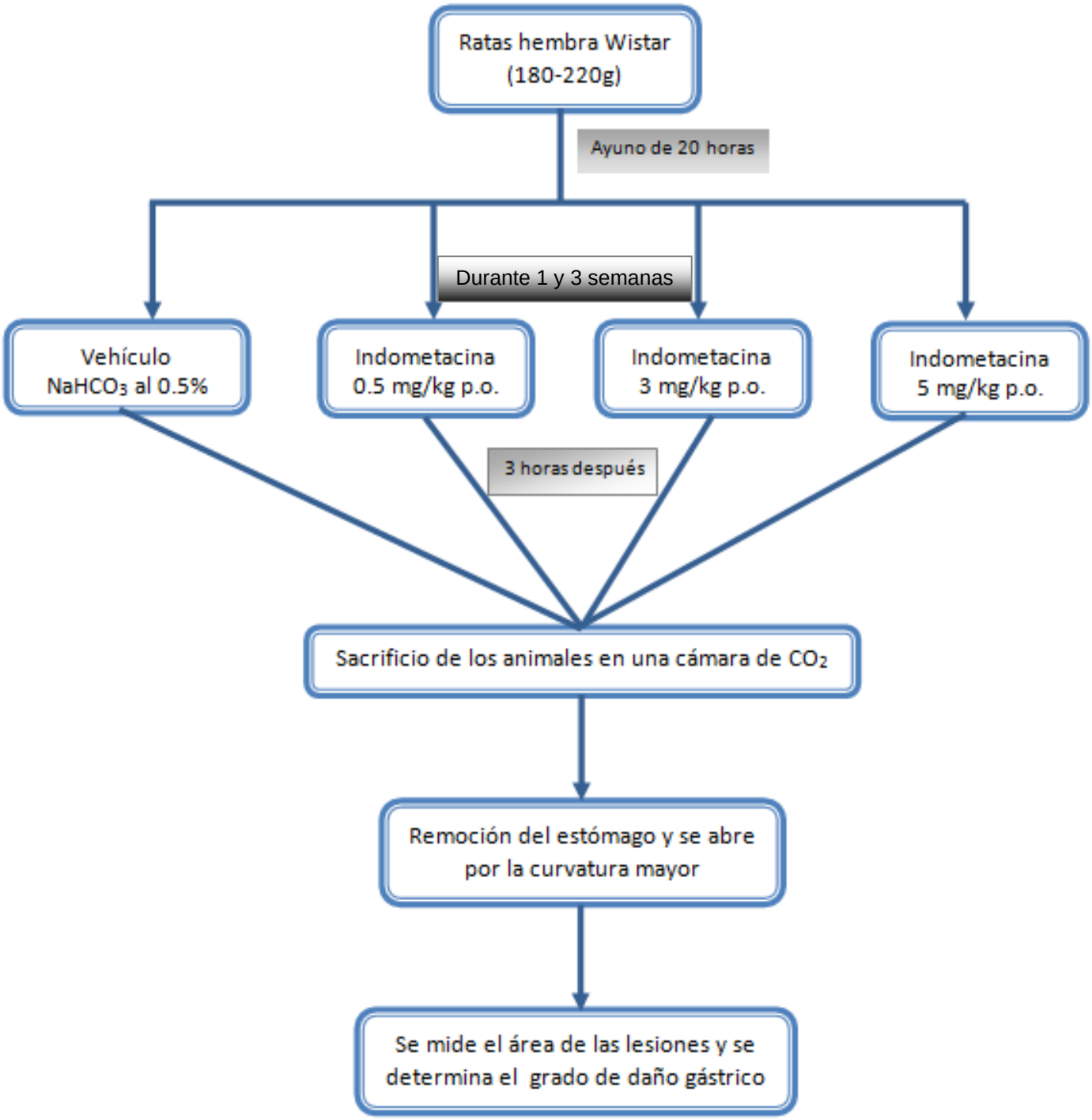


Diagrama 1: Lesiones gástricas inducidas por la indometacina durante una y tres semanas en un modelo de daño crónico.

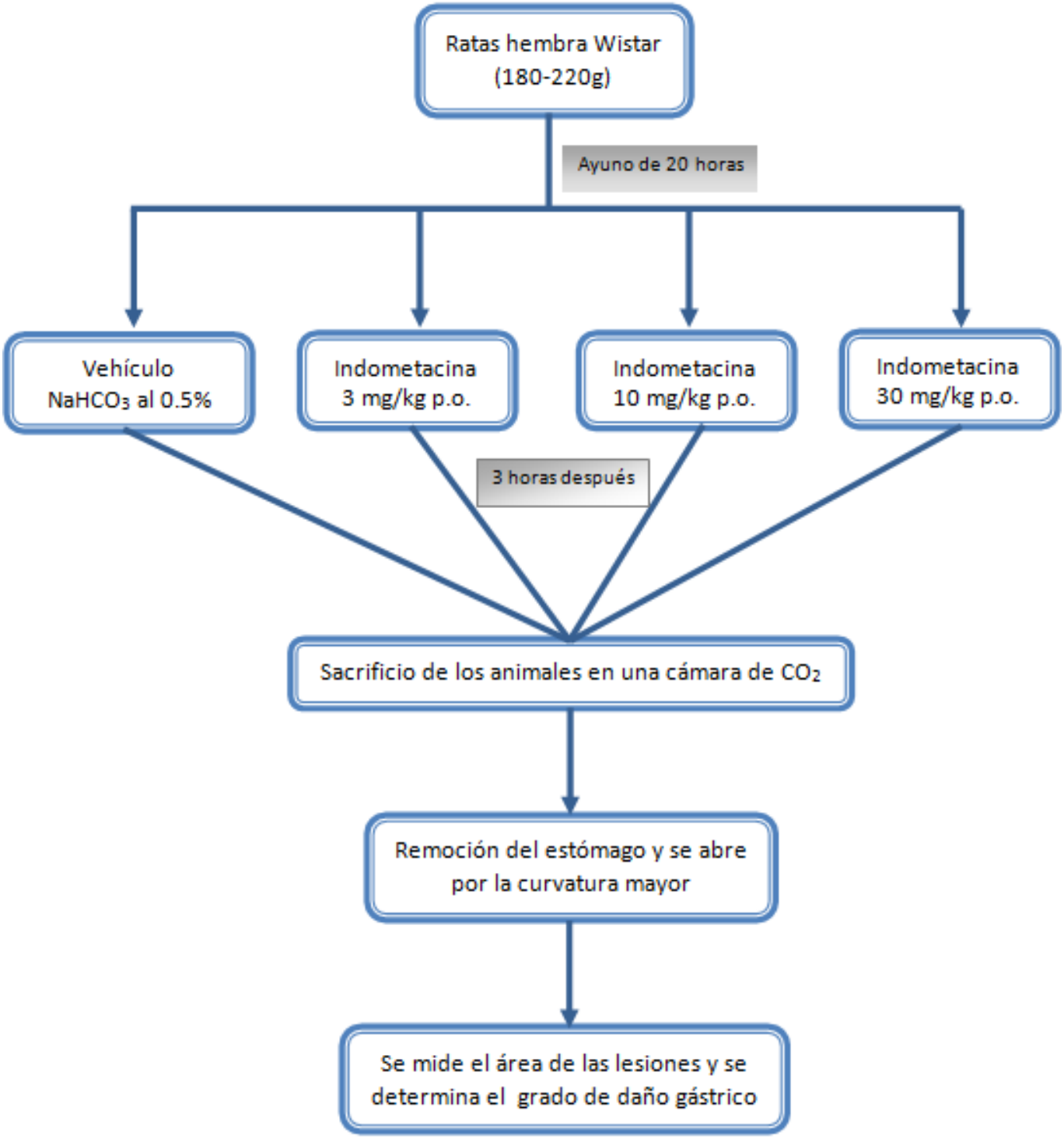


Diagrama 2: Lesiones gástricas inducidas por la indometacina en un modelo de daño agudo.

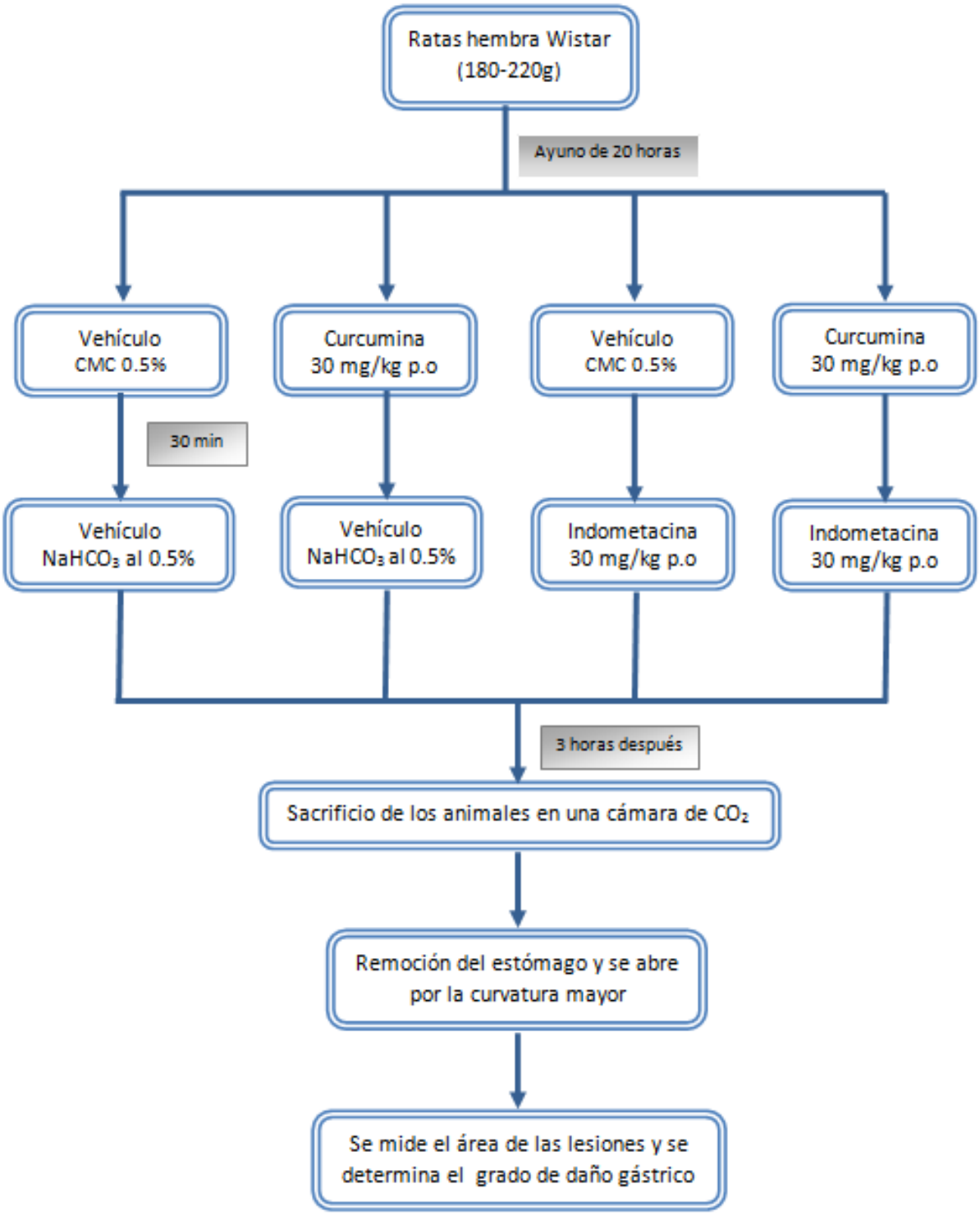


Diagrama 3: Evaluación del efecto gastroprotector de la curcumina en el daño gástrico generado por la administración oral de la indometacina.

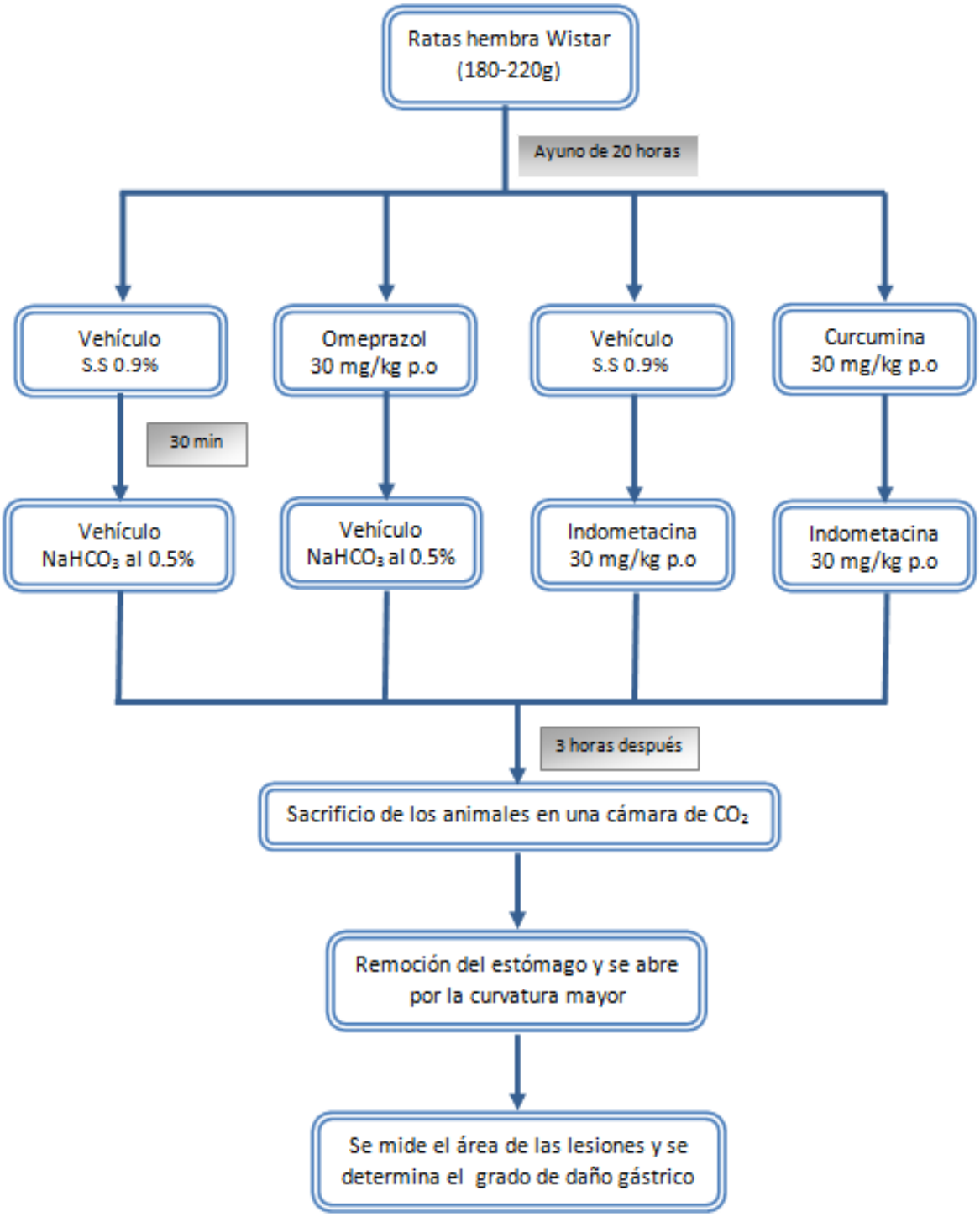


Diagrama 4: Evaluación del efecto gastroprotector del omeprazol en el daño gástrico producido por la administración oral de la indometacina.

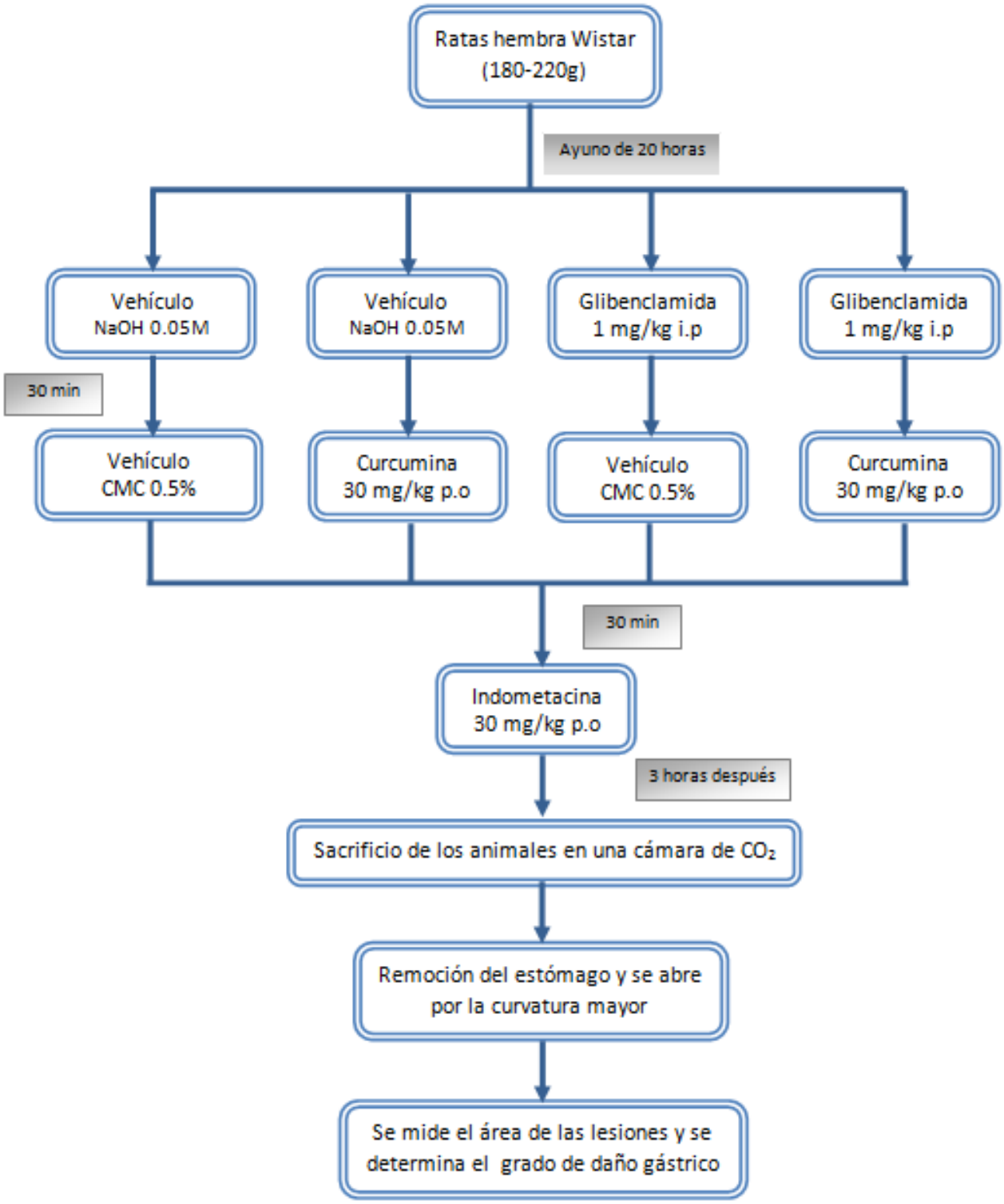


Diagrama 5: Participación de los canales de K_{ATP} en el efecto gastroprotector de la curcumina.

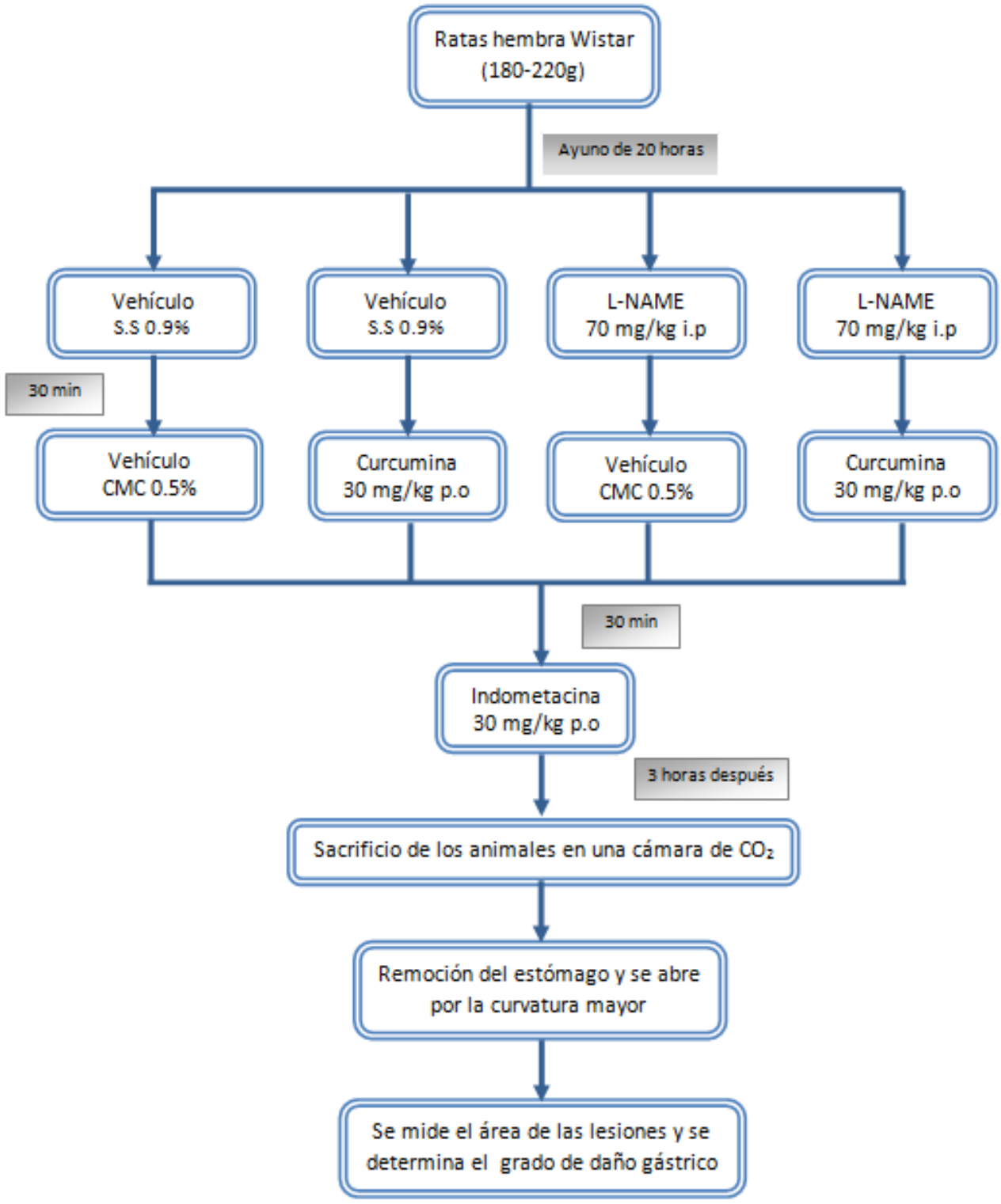


Diagrama 6: Participación del óxido nítrico en el efecto gastroprotector de la curcumina.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto de la indometacina en el tejido gástrico de la rata durante la administración crónica

Para poder justificar el modelo agudo de daño gástrico con la indometacina contra el modelo crónico producido por dicho fármaco en un modelo animal de acuerdo a la correlación de daño a nivel clínico, primeramente determinamos el daño crónico administrando un intervalo de dosis de 0.5 a 5 mg/kg p.o del fármaco durante una y tres semanas. La indometacina produce lesiones hemorrágicas en el cuerpo del estómago dependiente de la dosis, dichas lesiones son generadas de manera lineal sobre los pliegues de la mucosa. La dosis de 5 mg/kg produce lesiones estadísticamente significativas con respecto al vehículo durante una semana (3.50 ± 0.28 vs. 0.00 ± 0.00 mm^2) como se observa en la figura 8a y esta diferencia significativa se produce durante la administración de 3 y 5 mg/kg de peso durante 3 semanas (figura 8b). En los estómagos lesionados se observó una mucosa congestiva de aspecto hiperémico, así como una disminución en el número de pliegues en el tejido gástrico.

6.2 Efecto de la indometacina en el tejido gástrico de la rata durante la administración aguda

Para inducir el daño agudo con la indometacina se utilizaron dosis de 3,10 y 30 mg/kg administrados p.o. En el modelo agudo, la indometacina produce lesiones hemorrágicas en el cuerpo del estómago de manera dependiente de la dosis; el estómago presenta una mucosa hiperémica sin congestión y los pliegues en el tejido gástrico son más pronunciados. La dosis de 30 mg/kg produce mayor área de lesión comparada con el vehículo (figura 9), de acuerdo con este resultado se decidió utilizar la dosis de 30 mg/kg para evaluar el efecto gastroprotector de la curcumina. Es importante indicar que la dosis anteriormente mencionada ya ha sido reportada en la literatura para inducir daño gástrico (Al Moutaery, 2003).

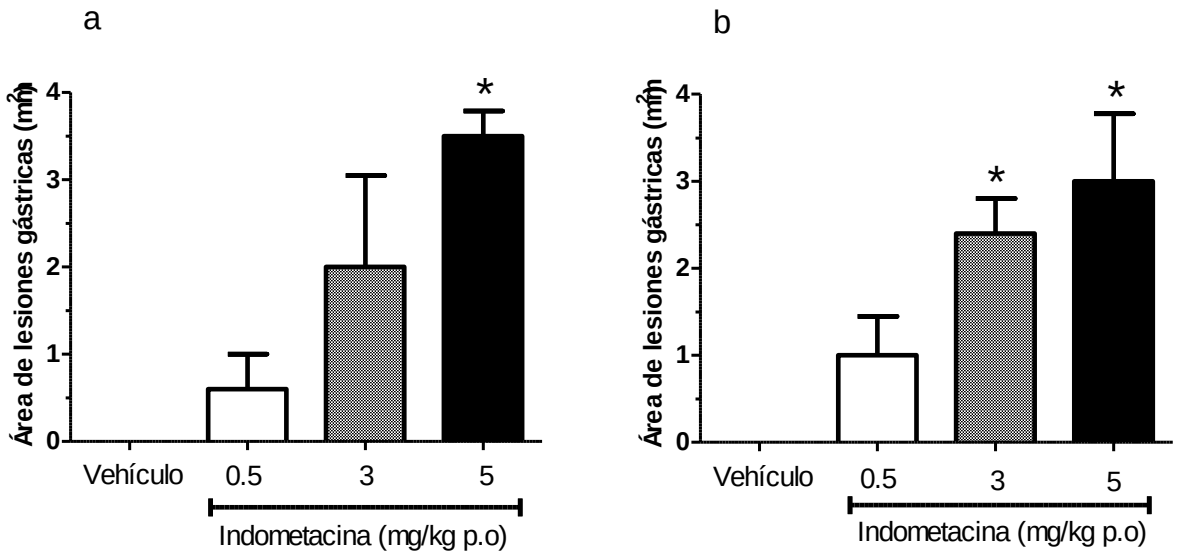


Figura 8: Cuantificación del daño gástrico. **a)** administración crónica de la indometacina (p.o) durante 1 semana. **b)** administración crónica de la indometacina (p.o) durante 3 semanas. Los datos son expresados como la media de cada grupo ± error estándar. *P<0.05 vs. vehículo. n= 5 ratas por grupo.

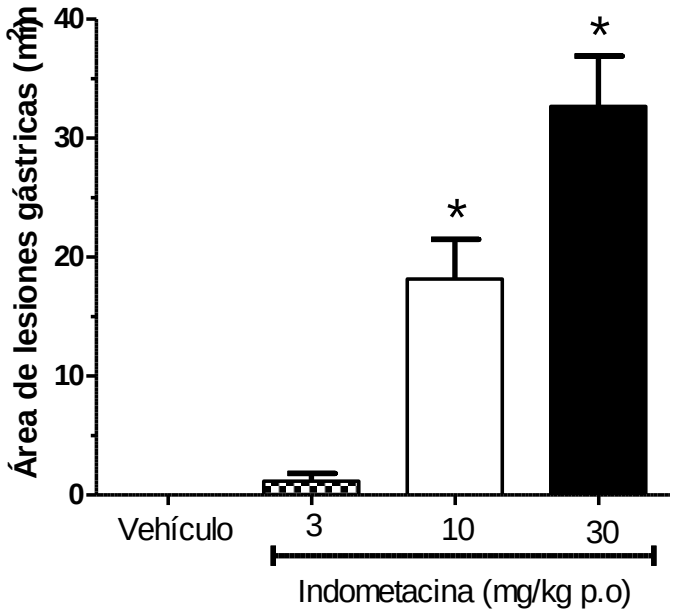


Figura 9: Cuantificación del daño gástrico en la administración aguda de 3, 10 y 30 mg/kg (p.o) de indometacina. Los datos son expresados como la media de cada grupo ± el error estándar. *P<0.05 vs. vehículo. n= 6 ratas por grupo.

6.3 Evaluación del efecto gastroprotector de la curcumina en el modelo de daño agudo generado por la indometacina en la rata

Se ha reportado recientemente que la curcumina tiene un efecto gastroprotector en la gastropatía inducida por la indometacina en la rata (Thong-Ngam *et al.*, 2012). En este trabajo demostramos dicho efecto gastroprotector administrando un pre-tratamiento de 30 mg/kg (p.o) de curcumina en el daño gástrico producido por una dosis de 30 mg/kg (p.o) de indometacina (figura 10), la indometacina produjo lesiones extensas y puntuales en los pliegues del estómago como podemos observar en la figura 11c, estas lesiones son estadísticamente significativas con respecto al testigo (28.22 ± 4.11 vs. 0.00 ± 0.00 mm^2); sin embargo el pre-tratamiento con curcumina disminuye de manera significativa el área de lesiones gástricas (8.42 ± 2.68 mm^2) (figura 11 d). Los vehículos de los fármacos así como la curcumina sola no producen daño gástrico (figura 11a-b). Adicionalmente a estos resultados, en la tabla 3 podemos observar que la curcumina reduce el daño a nivel macroscópico generado por la indometacina, produciendo un 70.13% de gastroprotección comparado con el grupo de daño con el AINE. Las fotografías mostradas en la figura 11 fueron tomadas con una cámara digital.

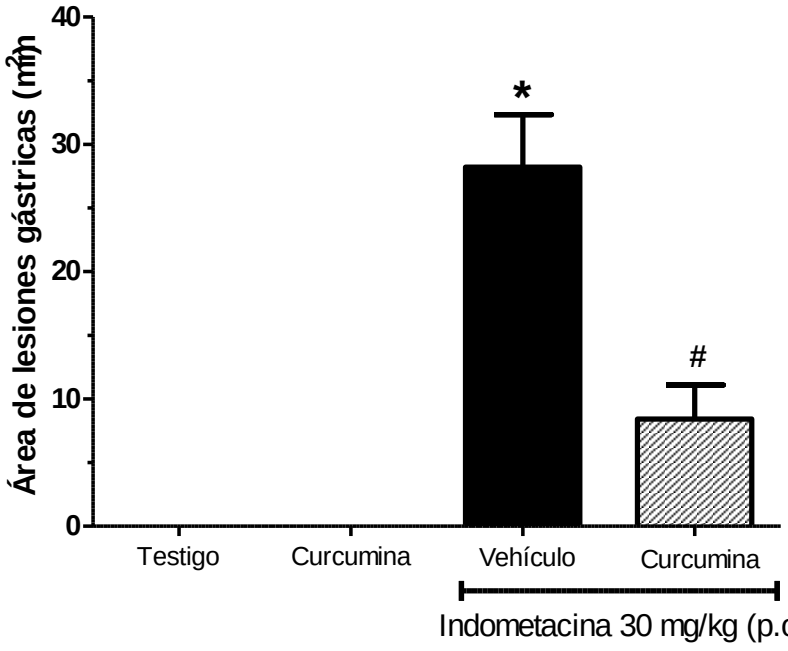


Figura 10: Efecto gastroprotector de 30 mg/kg (p.o) de curcumina en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina. Los datos son expresados como la media de cada grupo ± el error estándar. *P<0.05 vs. el grupo testigo #P<0.05 vs. vehículo+indometacina. n=5-9 ratas por grupo.

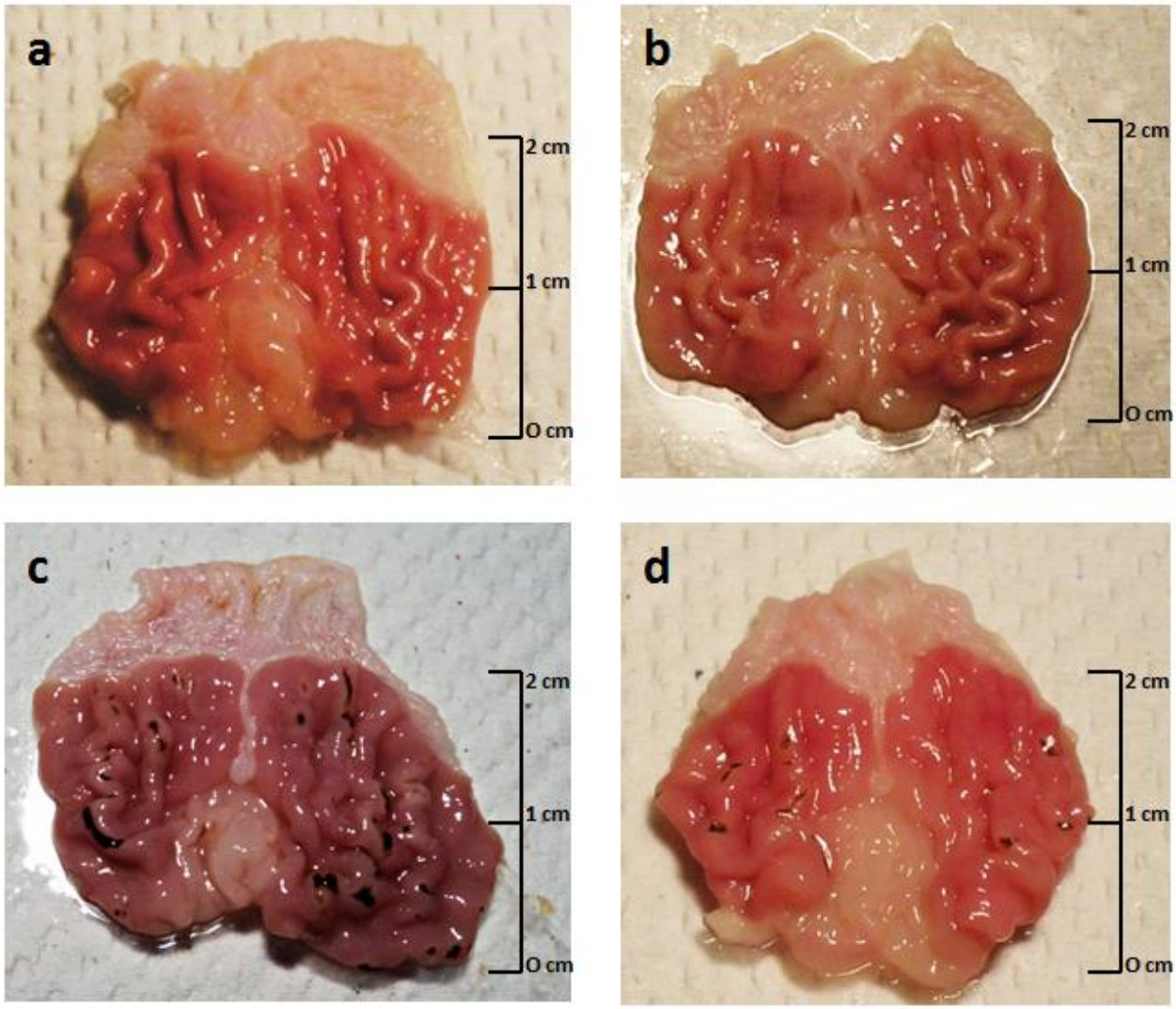


Figura 11: Análisis macroscópico de la mucosa gástrica de ratas que recibieron un tratamiento con indometacina y en ratas que recibieron o no un pre-tratamiento con curcumina. **a)** los animales tratados con vehículo ($NaHCO_3$ al 0.5% y CMC al 0.5%) mostraron una morfología normal, **b)** animales tratados con curcumina (30 mg/kg, p.o) muestran una morfología gástrica similar a la administración de vehículos, **c)** la administración de indometacina (30 mg/kg, p.o) produce lesiones hemorrágicas, **d)** el pre-tratamiento de curcumina (30 mg/kg, p.o) muestra disminución de las lesiones gástricas producidas por la indometacina. n=5-9 ratas por grupo.

6.4 Niveles de PGE_2 en el tejido gástrico de rata en el efecto gastroprotector de la curcumina.

Ha sido ampliamente reportado que el daño gástrico que producen los AINEs se correlaciona con la inhibición de la síntesis de PGs. Con el objetivo de identificar si el efecto gastroprotector de la curcumina podría deberse a la participación de PGs, cuantificamos bioquímicamente los niveles de PGE_2 en el tejido gástrico de rata. Los resultados mostrados en la tabla 3 indican que la indometacina (inhibidor no selectivo de COX) disminuye de manera significativa los niveles basales de PGs de 44.85 ± 7.11 a 9.40 ± 1.41 ng/g de tejido, esta disminución se mantiene cuando se da el pre-tratamiento con la curcumina (6.32 ± 0.86 ng/g), es decir, la curcumina no logra restaurar los niveles de PGs que genera la inhibición con indometacina.

Grupos tratados	Nivel de PGE_2 en tejido gástrico (ng/g)
Testigo	44.84 ± 7.11
Curcumina + vehículo	26.42 ± 5.45*
Vehículo + indometacina	9.40 ± 1.13*#
Curcumina + indometacina	6.32 ± 0.86*#

Tabla 3: Cuantificación bioquímica de los niveles de PGE_2 en el tejido gástrico de rata. Los datos son expresados como la media de cada grupo ± el error estándar. *P<0.05 vs. el grupo testigo. #P<0.05 vs. curcumina + vehículo. n= 5-9 muestras por grupo.

6.5 Comparación del efecto gastroprotector de la curcumina con respecto al efecto gastroprotector de omeprazol, un inhibidor de la bomba de protones

Se comparó el efecto gastroprotector generado por la curcumina contra el omeprazol, un fármaco inhibidor de la bomba de protones más utilizado en la prevención del daño gástrico generado por AINEs, los resultados revelan que ambos efectos son

equiparables. En la figura 12 se muestra que estos fármacos disminuyen de manera significativa el área de lesiones gástricas producida por la indometacina, mientras que en la tabla 4 se indica el porcentaje de gastroprotección generado por la curcumina y el omeprazol, (70.13% vs. 73.42%, respectivamente).

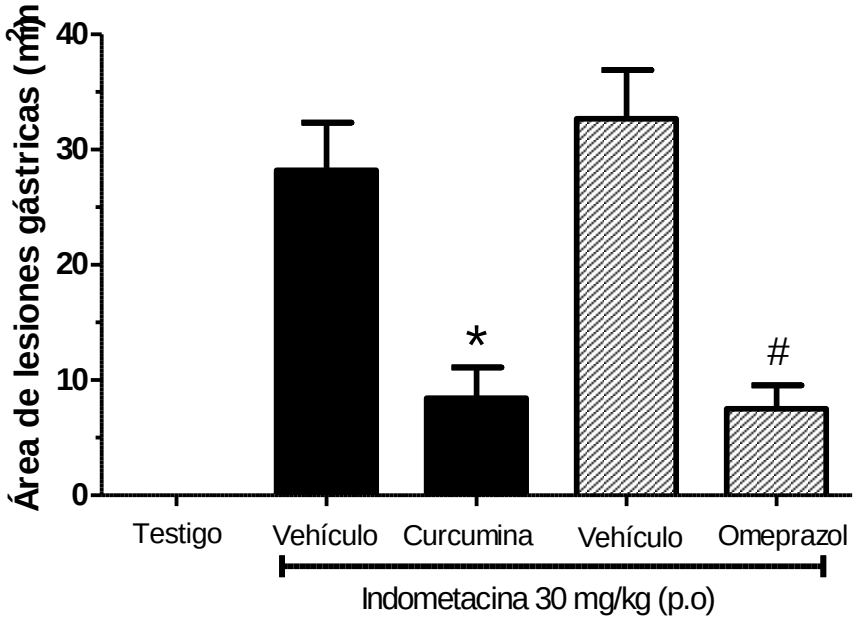


Figura 12: Evaluación del efecto gastroprotector de la curcumina (30 mg/kg, p.o) comparado con el efecto gastroprotector del omeprazol (30 mg/kg, p.o) en el modelo de daño gástrico inducido por la indometacina. Los datos son expresados como la media de cada grupo ± el error estándar. *#P<0.05 vs. su respectivo vehículo+indometacina. n= 5-9 ratas por grupo.

Tratamiento	% Gastroprotección
Testigo	100
Vehículo+indometacina	0
Curcumina+indometacina	70.13*
Omeprazol+indometacina	73.42*

Tabla 4: Efecto gastroprotector producido por 30 mg/kg p.o de curcumina y 30 mg/kg p.o de omeprazol en el daño gástrico producido por la indometacina. *P<0.05 vs. vehículo+indometacina. n= 5-9 ratas por grupo.
% de gastroprotección = (IUC-IUT) x 100/IUC, donde IUC es el índice de úlcera del grupo testigo (mm^2) y IUT es el índice de úlcera (mm^2) de los animales tratados.

6.6 Participación de los canales de K_{ATP} en el efecto gastroprotector de la curcumina

Recientemente, se ha descrito que los canales de K_{ATP} participan en la gastroprotección, mecanismo mediado por la acción de óxido nítrico (Medeiros *et al.*, 2008; Chávez-Piña *et al.*, 2011). En el presente estudio, con la finalidad de identificar si estos canales participan en el efecto gastroprotector de la curcumina, se administró un pre-tratamiento con glibenclamida (GBC), un bloqueador farmacológico de estos canales antes de la administración de la curcumina. Los resultados mostrados en la figura 13 indican que la curcumina tiene un efecto gastroprotector en el daño gástrico producido por la indometacina (9.85 ± 2.89 vs. 32.20 ± 5.59 mm^2) y que la GBC disminuye significativamente el efecto gastroprotector de la curcumina (25.45 ± 4.74 vs. 9.85 ± 2.89 mm^2).

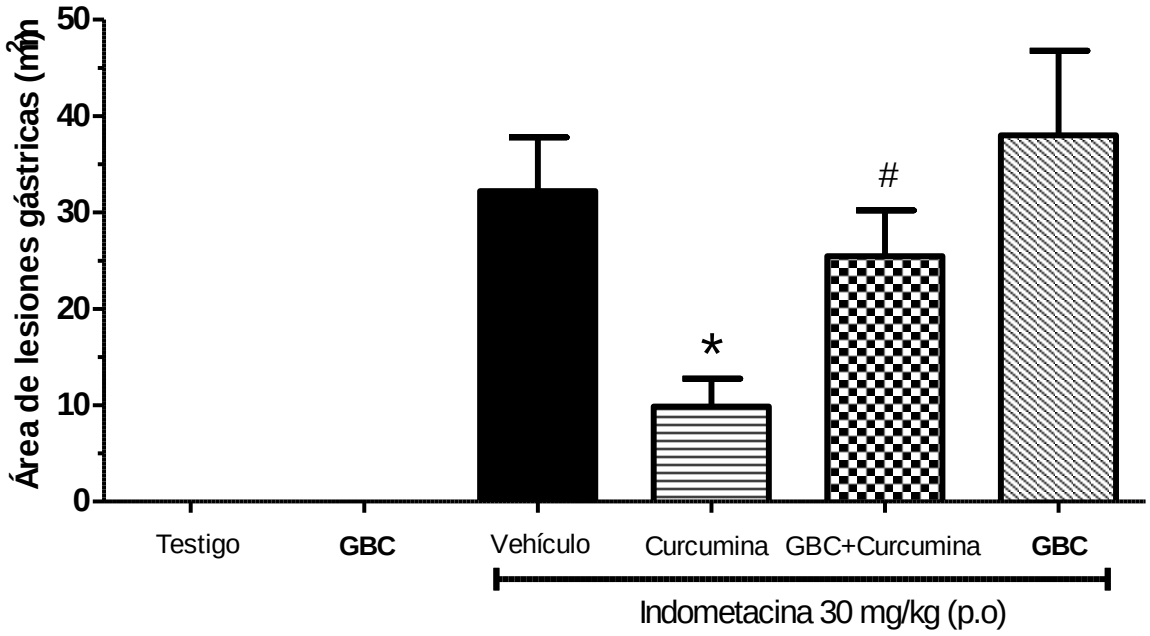


Figura 13: La glibenclamida (bloqueador de los canales de K_{ATP}) disminuye el efecto gastroprotector de la curcumina, indicando la participación de los canales de K_{ATP} en dicho efecto gastroprotector. Los datos son expresados como la media de cada grupo ± el error estándar. *P<0.05 vs. vehículo+indometacina. $^{\#}$P<0.05 vs. curcumina+indometacina. n= 5-10 ratas por grupo.

6.7 Participación del óxido nítrico (NO) en el efecto gastroprotector de la curcumina

Se ha descrito que el óxido nítrico es un mediador de la defensa de la mucosa gástrica al participar en la regulación del flujo sanguíneo, así como la secreción de moco y bicarbonato, factores que mantienen la integridad de la mucosa (Wallace y Granger, 1996).

En este trabajo, con el propósito de identificar si el óxido nítrico participa en el efecto gastroprotector de la curcumina, decidimos inhibir la síntesis de este mediador gaseoso con L-NAME (N^G-nitro-L-arginina metil éster), un inhibidor competitivo de la sintasa de óxido nítrico. En la figura 14 se muestra que la curcumina disminuye de manera significativa el área de lesiones gástricas producidas por la indometacina (12.4 ± 0.9 vs. 30.17 ± 3.80 mm^2), sin embargo, L-NAME reduce la gastroprotección inducida por la curcumina (22.0 ± 3.8 mm^2).

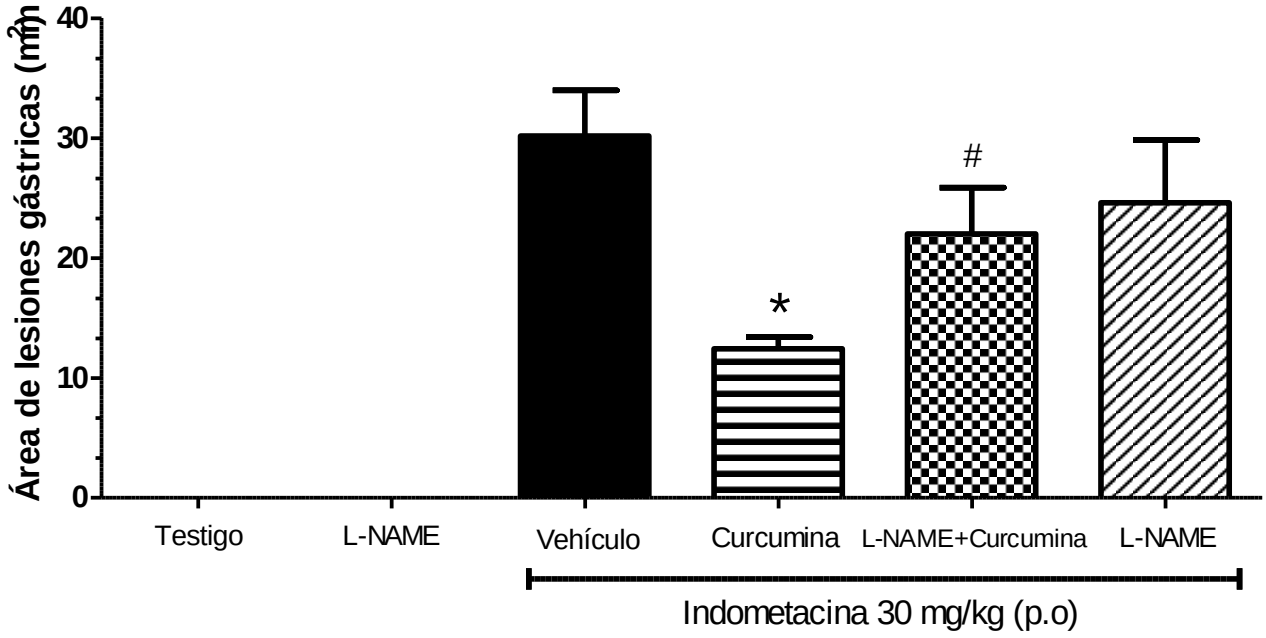


Figura 14: L-NAME (inhibidor de la sintasa de óxido nítrico) disminuye de manera significativa el efecto gastroprotector de la curcumina. Los datos son expresados como la media de cada grupo ± el error estándar. *P<0.05 vs. vehículo+indometacina. #P<0.05 vs. curcumina+indometacina. n= 4-7 ratas por grupo.

6.8 Cuantificación de los niveles de nitritos en el efecto gastroprotector de la curcumina

Con el objetivo de correlacionar la inhibición del óxido nítrico con la disminución del efecto gastroprotector de la curcumina, decidimos medir los niveles de nitritos endógenos (indicador de NO) en el tejido gástrico de rata por medio de una reacción de Griess. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: la indometacina redujo de manera significativa los niveles basales de nitritos (57.41 ± 3.07 vs. 86.46 ± 6.99 µM/g), mientras que la curcumina aumentó los niveles de nitritos disminuidos por la indometacina. (74.88 ± 6.26 vs. 57.41 ± 3.07 µM/g).

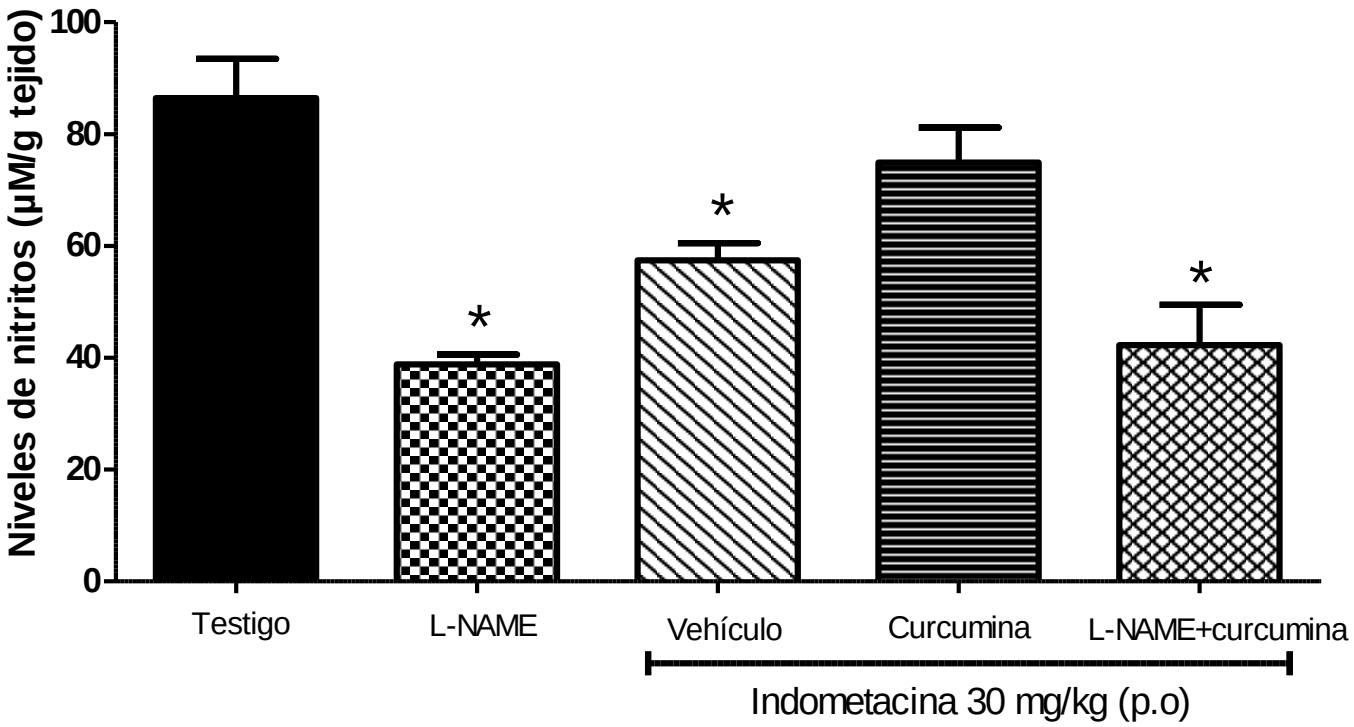


Figura 15: Niveles de nitritos en el tejido gástrico de rata (µM/g de tejido) en ratas tratadas con indometacina, L-NAME y curcumina. Los datos son expresados como la media de cada grupo ± el error estándar. *P<0.05 vs. vehículo+indometacina. $^{\#}$P<0.05 vs. curcumina+indometacina. n= 4-7 ratas por grupo.

7. DISCUSIÓN

Actualmente, existe el reconocimiento del empleo de fuentes naturales de medicamentos que ofrecen beneficios y representan una terapia alternativa o preventiva para determinadas enfermedades, justificado en la mayoría de los casos por razones económicas y disminución de los efectos tóxicos producidos por medicamentos con sustancias químicas puras. La curcumina, un polifenol extraído de la planta *Curcuma longa o* turmérica, ha demostrado a través del tiempo inocuidad y eficacia en la práctica de la medicina tradicional (Aggarwal y Sun, 2009), por lo cual ha despertado el interés de investigadores por demostrar e indagar sus acciones farmacológicas.

El presente trabajo describe el efecto gastroprotector de la curcumina contra el daño gástrico ocasionado por la indometacina en la rata, demostrando el mecanismo involucrado.

Se decidió utilizar el modelo de daño gástrico con indometacina por dos razones muy importantes:

1. La indometacina es un AINE ampliamente usado a nivel clínico en el tratamiento del dolor, la fiebre y la inflamación. De acuerdo con los reportes realizados por la Secretaria de Salud de nuestro país en 2009, la indometacina se encuentra dentro de la guía de la práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de la artritis reumatoide en el adulto, siendo uno de los principales fármacos utilizados en el tratamiento farmacológico de esta enfermedad; sin embargo, la principal limitación de su uso son los serios efectos adversos GI que produce, como: erosiones, úlceras y sangrado gástrico (Alsaif, 2004).
2. A nivel experimental, ha sido demostrado que este fármaco produce mayor toxicidad gástrica en comparación con otros AINEs (Takeuchi *et al.*, 2005); Por su parte, Yamada y colaboradores en 1993 evidenciaron que la administración aguda por vía subcutánea con una dosis de 7.5 mg/kg de indometacina en ratas Sprague-Dawley produjo inflamación y úlceras en la mucosa gastrointestinal, y existe un engrosamiento del intestino delgado y del mesenterio, adherencias y obstrucciones e inflamación granulomatosa transmural, estas lesiones comparten

características, clínicas, histológicas y patofisiológicas con la enfermedad de Crohn, correlacionando a nivel clínico la inflamación gastroentérica que se produce en aproximadamente el 70% de los pacientes que reciben una terapia durante 6 meses con AINEs e incluso esta inflamación intestinal persiste hasta 16 meses después de la interrupción del tratamiento.

En el modelo experimental de daño gástrico con la indometacina, las dosis más utilizadas por varios autores es de 30 mg/kg p.o, en la cual se ha evaluado el efecto gastroprotector de diversos compuestos (Bhargava et al., 1973; Al Moutaery, 2003; Gurbuz y Yesilada, 2007), en este trabajo se empleó esta dosis para evaluar el efecto gastroprotector de la curcumina.

Como fue descrito en los resultados, la curcumina protegió a nivel macroscópico el daño gástrico inducido por la indometacina, estos resultados se suman a lo reportado por Thong-Ngam y colaboradores en 2012, en ese trabajo la curcumina disminuyó de manera significativa los niveles de ICAM-1 y TNF-α en suero, lo que llevó a una disminución de la inflamación y de la adhesión de los leucocitos al endotelio, procesos inducidos por la administración de la indometacina. La evidencia experimental sugiere que el daño gástrico que produce la indometacina, en parte, es un proceso dependiente de neutrófilos (leucocito polimorfonuclear) en el que hay un incremento significativo en la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular, mecanismo dependiente de la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 que se expresa en el endotelio, esta molécula juega un papel importante en la reacción inflamatoria y promueve la migración transendotelial de los leucocitos a los sitios de inflamación; por lo tanto, en ese estudio, la curcumina previno el daño gástrico inducido por la indometacina al mejorar la microcirculación gástrica. A diferencia de nuestros resultados, la curcumina previene el daño gástrico inducido por la indometacina de manera dependiente de la participación del NO y los canales de K_{ATP}, estos últimos producen relajación de la células del músculo liso vascular, lo que sugiere que existe un aumento del flujo sanguíneo en el tracto gastrointestinal que conduce a una adecuada perfusión vascular, permitiendo una rápida restitución del epitelio superficial dañado por la indometacina, tomando en consideración que este último fármaco disminuye el flujo sanguíneo

gástrico (componente de la defensa de la mucosa gástrica que es alterado después de la administración de los AINEs).

Por otro lado, la evidencia experimental demuestra que las lesiones gástricas inducidas por la indometacina son causadas por una disminución de la síntesis de PGs (Kushima *et al.,* 2007), estos eicosanoides son producidos en respuesta a varios mecanismos extrínsecos y se conoce que su efecto gastroprotector se debe a la regulación de factores que participan en la defensa de la mucosa gástrica (Motilva *et al.*, 2005) como: regulación de la secreción de moco y bicarbonato, mantenimiento del flujo sanguíneo mucosal, además de inhibir la adherencia de leucocitos al endotelio (Atay *et al.*, 2000), existiendo una correlación entre el tiempo y la dosis de los AINEs para suprimir dicha síntesis (Whittle, 1981; Lanza, 1989). Estudios realizados por Wallace y McKnight en 1990, demostraron que la disminución de la síntesis de prostaglandinas ocurre en un intervalo de tiempo de 15-60 min después de la administración i.p de dosis de 5 mg/kg de indometacina y de 10 mg/kg de naproxeno en ratas, tiempo necesario en el que se van desarrollando las lesiones gástricas, observándose mayor área de lesión formada a las 3 h después de la administración de la indometacina (Souza *et al.,* 2008).

Debido a que la inhibición de la síntesis de PGs es uno de los mecanismos de mayor importancia en la gastropatía inducida por la indometacina, este hecho llevó a pensar que posiblemente las PGs estaban participando en el efecto gastroprotector de la curcumina. Nuestros resultados confirman que el mecanismo de daño gástrico producido por la indometacina es debido a la inhibición de la síntesis de PGE_2 en el tejido gástrico. Los niveles de PGE_2 determinados en el tejido gástrico después de la administración de 30 mg/kg p.o de indometacina (9.40±1.13 ng/g) son similares a los valores reportados por Pineda-Peña y colaboradores en 2012, cuyos valores son de 6.06±0.6 ng/g después de la administración de la misma dosis y vía de administración de este fármaco. Nuestros resultados también son equivalentes a los datos publicados por Santos y colaboradores en 2005, en donde la administración de 20 mg/kg p.o de indometacina en la rata produce un 70% de inhibición del nivel de PGE_2 en el tejido gástrico, mientras que en este trabajo la indometacina produjo un 80% de inhibición de PGE_2 en el tejido gástrico de la rata comparado con el grupo testigo.

Sin embargo, el mecanismo gastroprotector de la curcumina no está relacionado con el mantenimiento del nivel de PGE_2 en el tejido gástrico, debido a que la administración de la curcumina sola disminuye de manera significativa dichos niveles, este evento se confirma ya que al pre-tratar a las ratas con curcumina, esta última no es capaz de revertir la disminución de PGs suprimidas por la indometacina. En la literatura no existen reportes del nivel de PGs en el estómago después de la administración de la curcumina, pero este resultado en parte podría explicarse de acuerdo con estudios que demuestran que la curcumina inhibe a nivel transcripcional, la expresión de COX-2 reduciendo la producción de prostanoides en las células epiteliales gástricas (Jagetia y Aggarwa, 2007), dicho evento ocurre a través de la inhibición de la activación del factor nuclear NF-κB, el cual es necesario para la expresión de la COX-2, las citocinas pro-inflamatorias y los factores tumorales, este mecanismo está mediado por la supresión de la activación de la cinasa de IκBα, la cual es esencial para la activación del factor nuclear (Plummer *et al.*, 1999). Con estos resultados, se sugiere que la curcumina posiblemente esté inhibiendo la síntesis de PGE_2 que se produce por la acción de COX-2, mientras que COX-1 se encontraría libre para producir PGs de manera constitutiva en el estómago, este hecho podría explicar que la curcumina sola disminuyó en un 58% el nivel de PGE_2, de tal manera que, la enzima COX-1 se encuentra expresada constitutivamente en tejido gástrico, mientras que la COX-2 se expresa en respuesta a estímulos inflamatorios y que es necesaria la inhibición de ambas isoformas para producir daño, se podría atribuir a este hecho, el que la curcumina por sí sola no produjo daño gástrico.

Por otro lado, como fue mencionado anteriormente, la curcumina no restaura los niveles de PGs que disminuye la indometacina, lo que indica que el mecanismo gastroprotector de la curcumina es independiente de la participación de PGE_2 en el tejido gástrico.

En nuestro propósito por elucidar el efecto gastroprotector de la curcumina en el daño gástrico producido por la indometacina, se planteó la idea de la intervención de los canales de $K_{ATP,}$ bajo la hipótesis que después de la administración de los AINEs, inicialmente existe un deterioro bioquímico en el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y/o la inhibición del transporte de electrones de la cadena respiratoria, lo que

resulta en una disminución del ADP. Sobre la base de la histología, la contracción muscular de la submucosa produce una disminución del flujo sanguíneo gástrico (Rainsford, 1983), y la oclusión microvascular (Anthony, *et al.,* 1995) entre los primeros estadíos tempranos de la generación de lesiones, lo que da pie a la infiltración de neutrófilos (Somasundaram, *et a.l,* 1995), además de que existe una hiperacidez e hipercontractilidad trayendo consigo una susceptibilidad al daño gástrico.

Por otro lado, la participación de los canales de K_{ATP} en el efecto antinociceptivo de la curcumina ha sido descrita recientemente (De Paz-Campos *et al.*, 2012), antecedente que llevó a pensar que posiblemente estos canales podrían estar participando en el efecto gastroprotector de la curcumina, añadiendo el hecho que investigaciones recientes han descrito la activación de estos canales en la gastroprotección (Peskar *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2006). Además de ello, diversos autores han demostrado una disminución significativa del daño gástrico producida por algunos abridores de canales de K_{ATP}, como: cromakalim (Goswami *et al.*, 1997), diazóxido (Toroudi *et al.*, 1999) y nicorandil (Patel *et al.*, 2001).

Toroudi y colaboradores en 1999, al dar un pre-tratamiento con diazóxido con dosis de 5, 15 y 45 mg/kg i.p y posteriormente inducir el daño gástrico con 30 mg/kg de indometacina s.c, demuestran que el diazóxido de manera dependiente de la dosis previene el daño gástrico producido por la indometacina. Por el contrario, el pre-tratamiento de la glibenclamida con dosis de 2 y 6 mg/kg i.p, aumenta de manera significativa el daño gástrico producido por la indometacina. Estos autores concluyen que los canales de K_{ATP} juegan un papel importante en la fisiopatología de las úlceras gástricas a través de una acción periférica en el flujo sanguíneo en la mucosa y submucosa del estómago.

En el músculo liso vascular (MLV), los canales de K_{ATP} desempeñan un papel importante en la regulación del tono muscular y la vasorelajación en condiciones de hipoxia (Miura *et al.*, 2003). En este estudio, el pre-tratamiento con glibenclamida, un bloqueador de canales de K_{ATP} disminuyó de manera significativa el efecto gastroprotector de la curcumina; este resultado evidencia la participación de estos canales en dicho efecto gastroprotector. En la literatura ha sido documentado que la

adición de sulfonilureas (glibenclamida o glipizida) conduce a una inhibición de la actividad de los canales K_{ATP} y por lo tanto, a una despolarización de la membrana plasmática, lo cual produce la apertura del canal de calcio dependiente de voltaje (Ca_v) y un aumento de la afluencia de Ca^{2+}, lo que resulta en un incremento del calcio intracelular que facilita la contracción del MLV. Por el contrario, la apertura de estos canales produce una hiperpolarización de la membrana plasmática provocando el cierre de canales de Ca_v y con ello una disminución de Ca^{2+} intracelular y facilitando la relajación del MLV (Gollasch *et al.*, 1996; Jackson, 2005). La importancia de la activación de los canales K_{ATP} en el músculo liso GI se debe a que dicha activación genera un aumento del flujo sanguíneo, por lo tanto, una adecuada perfusión vascular permitiendo una rápida restitución del epitelio superficial dañado, contribuyendo de esta manera a la gastroprotección, mecanismo que explicaría el efecto gastroprotector de la curcumina.

Se ha demostrado que el NO y GMPc pueden activar diferentes tipos de canales de K^+, entre ellos canales de K_{ATP} (Archer *et al.*, 1994; Bolotina *et al.*, 1994; Carrier *et al.*, 1997). Polte y colaboradores, 1997 reportaron que la vía NO/GMPc protege a las células endoteliales contra el daño celular en varios tejidos; Santos y colaboradores, 2005 demostraron que el sildenafil, vía activación de mecanismos dependientes de NO, previno la gastropatía inducida por la indometacina a través de la reducción de la adherencia de los leucocitos al endotelio y manteniendo el flujo sanguíneo en la mucosa gástrica. Por su parte, Medeiros y colaboradores, 2008 profundizaron en el mecanismo gastropotector de sildenafil, y reportaron la participación de la vía NO/GMPc/$K_{ATP.}$ De la misma manera, la activación de este mecanismo fue descrita en el efecto gastroprotector de la carbenoxolona un fármaco antiinflamatorio y antiulceroso (Chávez Piña *et al.,* 2011).

En este trabajo, la administración previa de L-NAME, un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico reduce de manera significativa el efecto gastroprotector de la curcumina, este efecto se correlaciona con los niveles de nitritos (como un indicador de NO) en el tejido gástrico.

Además, nuestros resultados demostraron una reducción marcada de los niveles de nitritos en el grupo tratado con indometacina, resultados consistentes con lo que reportaron Polat y colaboradores en 2010, en el que tras la administración de 25 mg/kg p.o de indometacina, este fármaco disminuye de 60 a 20 µM/g los niveles de nitritos en el tejido gástrico, mientras que en nuestro trabajo, la indometacina redujo los niveles de nitritos de 87±6.9 a 57±3.07 µM/g de tejido. Este resultado se atribuye a la capacidad de la indometacina para regular a la alta la expresión de endotelina-1, lo que conduce a una disminución de la producción de NO en la mucosa gástrica (Slomiany y Slomiany, 2000).

Por otra parte, los niveles de nitritos se incrementaron en las ratas pre-tratadas con curcumina sin sobrepasar los niveles basales de nitritos (74.8±6.2 vs. 87±6.9 µM/g de tejido) en el tejido gástrico. Este hecho es relevante, ya que descarta la posibilidad de que un aumento de los nitritos en la sangre de como resultado que el NO produzca daño a otro nivel como en el sistema cardiovascular; ya que este mediador gaseoso regula procesos fisiológicos tales como el control de la presión arterial ejerciendo un efecto hipotensor, sin embargo, a pesar de que la presión arterial no fue determinada en las ratas tratadas, la curcumina no produciría este efecto adverso debido a que el aumento de los niveles de nitritos son similares a los valores basales.

El efecto de la curcumina sobre la producción del NO en nuestros resultados contrarrestan con los resultados reportados por De Paz Campos y colaboradores, 2012 debido a que en ese trabajo el L-NAME no revierte el efecto antinociceptivo de la curcumina en el modelo de dolor inducido por la formalina a diferencia de que en este trabajo el L-NAME revierte el efecto gastroprotector de la curcumina.

De acuerdo a los resultados, se sugiere la participación de la vía NO-K_{ATP} en el mecanismo protector de la curcumina, este hallazgo lleva a proponer la participación de la vía NO-GMPc- K_{ATP} en este mecanismo de gastroprotección, debido a que el NO activa a la enzima guanilato ciclasa soluble (CGs) incrementando con ello los niveles de GMPc en varios tejidos describiéndose que este último segundo mensajero promueve la activación de los canales de K_{ATP} (Medeiros *et al.,* 2008).

También, existe la posibilidad de la participación del H_2S en la modulación de la apertura de los canales de K_{ATP}, debido a que este mediador gaseoso comparte funciones vasodilatadoras con el NO (Wang, 2002), además que estudios recientes han mostrado que el H_2S participa en el mantenimiento de la integridad de la mucosa y en la regulación del flujo sanguíneo (Fiorucci *et al.,* 2006).

Con los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye lo siguiente:

8. CONCLUSIONES

1. La curcumina ejerce un efecto gastroprotector significativo en el daño gástrico producido por la indometacina en la rata.
2. El mecanismo gastroprotector de la curcumina es independiente de la síntesis de las PGs en el tejido gástrico. Este efecto no parece estar mediado por una interferencia con el efecto inhibidor de la COX por parte de la indometacina, debido a que la curcumina no restaura los niveles de PGs tras la administración de la indometacina.
3. Los canales de K_{ATP} participan en el efecto gastroprotector de la curcumina.
4. La síntesis de óxido nítrico está involucrada en el efecto gastroprotector de la curcumina, lo que sugiere la participación de la vía NO-GMPc-K_{ATP}.

Cinvestav

9. PERSPECTIVAS

Nuestros resultados sugieren la participación de la vía NO-K_{ATP} en el mecanismo gastroprotector de la curcumina. Sin embargo, no se puede descartar la participación de otros mecanismos como son:

1. La participación de H_2S en el efecto gastroprotector de la curcumina, debido a que dicho mediador gaseoso participa en la activación de los canales de K_{ATP}.
2. Es probable una acción directa de la curcumina sobre la activación del canal de K_{ATP}.
3. La curcumina podría activar la enzima guanilato ciclasa particulada que se encuentra en la membrana celular, evento que lleve a la señalización de los segundos mensajeros y la activación de los canales de K_{ATP}.
4. La activación de los receptores involucrando la participación de las proteínas G que abren los canales de K_{ATP}.
5. La disminución de la secreción del ácido clorhídrico por interferencia con la histamina, colecistoquinina y acetilcolina.
6. La curcumina podría inhibir la bomba de protones produciendo una disminución directa de la secreción ácida.

Cinvestav

BIBLIOGRAFÍA

Abadi, A.H., Abou-Seri, S.M., Abdel-Rahman, D.E., Klein, C., Lozach, O., Meijer, L. (2006) Synthesis of 3-substituted-2-oxoindole analogues and their evaluation as kinase inhibitors, anticancer and antiangiogenic agents. *Eur J Med Chem*, 41, 296-305.

Aggarwal, B.B., Bhatt, I.D., Ichikawa, H., Ahn, S., Sethi, G., Sandur, S.K., Natarajan, C., Seeram, N., Shishodia, S. (2006) Curcumin — Biological and Medicinal Properties. Book. fm

Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N., Ichikawa, H. (2007) Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol*, 595, 1-75.

Aggarwal, B.B. y Sung, B. (2009) Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci*, 30, 85-94.

Aguilar-Bryan, L., Bryan, J., Nakazaki, M. (2001) Of mice and men: K(ATP) channels and insulin secretion. *Recent Prog Horm Res*, 56, 47-68.

Akar, F., Uydes-Dogan, B.S., Buharalioglu, C.K., Abban, G., Heinemann, A., Holzer, P., Van de Voorde, J. (1999) Protective effect of cromakalim and diazoxide, and proulcerogenic effect of glibenclamide on indomethacin-induced gastric injury. *Eur J Pharmacol*, 374, 461-470.

Al Moutaery, A. (2003) Methimazole prevents stress and chemical induced gastropathy in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 55, 277-285.

Alsaif, M.A. (2004) Inhibition of gastric mucosal damage by boric acid pretreatment in rats. *Journal Medicine Science*, 4.

Allen, G.C., Grimm, D.T., Elkan, G.H. (1991) Oxygen Uptake and Hydrogen-Stimulated Nitrogenase Activity from Azorhizobium caulinodans ORS571 Grown in a Succinate-Limited Chemostat. *Appl Environ Microbiol*, 57, 3220-3225.

Allison, M.C., Howatson, A.G., Torrance, C.J., Lee, F.D., Russell, R.I. (1992) Gastrointestinal damage associated with the use of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med*, 327, 749-754.

Ammala, C., Moorhouse, A. y Ashcroft, F.M. (1996) The sulphonylurea receptor confers diazoxide sensitivity on the inwardly rectifying K+ channel Kir6.1 expressed in human embryonic kidney cells. *J Physiol*, 494 (Pt 3), 709-714.

Ammon, H.P. y Wahl, M.A. (1991) Pharmacology of Curcuma longa. *Planta Med*, 57, 1-7.

Andrews, F.J., Malcontenti-Wilson, C., O'Brien, P.E. (1994) Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on LFA-1 and ICAM-1 expression in gastric mucosa. *Am J Physiol*, 266, G657-664.

Anthony, A., Dhillon, A.P., Thrasivoulou, C., Pounder, R.E., Wakefield, A.J. (1995) Pre-ulcerative villous contraction and microvascular occlusion induced by indomethacin in the rat jejunum: a detailed morphological study. *Aliment Pharmacol Ther,* 9,605-13.

Archer, S.L., Huang, J.M., Hampl, V., Nelson, D.P., Shultz, P.J., Weir, E.K. (1994) Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 7583-7587.

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. *Am J Physiol*, 262, G903-908.

Ashcroft, S.J. y Ashcroft, F.M. (1990) Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal*, 2, 197-214.

Ashcroft, F.M. (1996) Mechanisms of the glycaemic effects of sulfonylureas. *Horm Metab Res*, 28, 456-463.

Atay, S., Tarnawski, A.S., Dubois, A. (2000) Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 61, 105-124.

Babenko, A.P., González, G., Bryan, J. (1999) The tolbutamide site of SUR1 and a mechanism for its functional coupling to K(ATP) channel closure. *Febs Lett*, 459, 367-376.

Bhargava, K.P., Gupta, M.B., Tangri, K.K. (1973) Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. *Eur J Pharmacol*, 22, 191-195.

Blower, P.R. (1993) Non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Rheumatol*, 32 Suppl 4, 35-38.

Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., Cohen, R.A. (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 368, 850-853.

Brunton, B. y Chabner, B. (2012) Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12° Edición. México: McGraw-Hill. p.p 938.

Cairns, J.A. (2007) The coxibs and traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a current perspective on cardiovascular risks. *Can J Cardiol*, 23, 125-131.

Carrier, G.O., Fuchs, L.C., Winecoff, A.P., Giulumian, A.D., White, R.E. (1997) Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K channels. *Am J Physiol*, 273, H76-84.

Cirino, G. (2003) Nitric oxide releasing drugs: from bench to bedside. *Dig Liver Dis*, 35 Suppl 2, S2-8.

Cryer, B. y Kimmey, M.B. (1998) Gastrointestinal side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*, 105, 20S-30S.

Cui, Z.M. (2002) Influence of N nitro-L-arginine methyl ester and L-arginine on gastric mucosal tolerant cytoprotection under stress. *Chin J Dig. Dis*, 3.

Chainani-Wu, N. (2003) Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (Curcuma longa). *J Altern Complement Med*, 9, 161-168.

Chan, T.A. (2002) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. *Lancet Oncol*, 3, 166-174.

Chávez-Piña, A.E., Tapia-Álvarez, G.R., Reyes-Raminrez, A., Navarrete, A. (2011) Carbenoxolone gastroprotective mechanism: participation of nitric oxide/(c) GMP/K(ATP) pathway in ethanol-induced gastric injury in the rat. *Fundam Clin Pharmacol*, 25, 717-722.

Chu, S., Tanaka, S., Kaunitz, J.D., Montrose, M.H. (1999) Dynamic regulation of gastric surface pH by luminal pH. *J Clin Invest*, 103, 605-612.

Daube, F.V. (1870) Uber Curcumin, den Farbstoff der Curcumawurzel. *Ber* 3, 609.

De Paz-Campos, M.A., Chávez-Piña, A.E., Ortiz, M.I., Castaneda-Hernández, G. (2012) Evidence for the Participation of ATP-sensitive Potassium Channels in the Antinociceptive Effect of Curcumin. *Korean J Pain*, 25, 221-227.

Douthwaite, A.H., Lintott, G.A.M. (1938) Gastroscopic observation of the effect of aspirin and certain other substances on the stomach. *Lancet*, 2, 1222-1225.

Eigner, D. y Scholz, D. (1999) Ferula asa-foetida and Curcuma longa in traditional medical treatment and diet in Nepal. *J Ethnopharmacol*, 67, 1-6.

Eikelenboom, P., Bate, C., Van Gool, W.A., Hoozemans, J.J., Rozemuller, J.M., Veerhuis, R., Williams, A. (2002) Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia*, 40, 232-239.

Elliott, S.N. y Wallace, J.L. (1998) Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and injury. *J Gastroenterol*, 33, 792-803.

Estes, L.L., Fuhs, D.W., Heaton, A.H., Butwinick, C.S. (1993) Gastric ulcer perforation associated with the use of injectable ketorolac. *Ann Pharmacother*, 27, 42-43.

Faich, G.A. (1986) Adverse-drug-reaction monitoring. *N Engl J Med*, 314, 1589-1592.

Feng, L., Sun, W., Xia, Y., Tang, W.W., Chanmugam, P., Soyoola, E., Wilson, C.B., Hwang, D. (1993) Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys*, 307, 361-368.

Ferreira, S.H., Moncada, S., Vane, J.R., (1979) Indomethacin and Aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nat New Biol,* 231, 237-239.

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

Fiorucci, S., Distrutti, E., Cirino, G., Wallace, J.L. (2006) The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology*, 131, 259-271.

Flórez, J. y Espulgues, V. (1999) Farmacología de la secreción ácida gástrica y de la ulceración de la mucosa digestiva. Farmacología Humana 3° ed. Editorial Masson S.A. 756-784.

Fromm, D. (1987) How do non-steroidal anti-inflammatory drugs affect gastric mucosal defenses? *Clin Invest Med*, 10, 251-258.

Fu, S., Ramanujam, K.S., Wong, A., Fantry, G.T., Drachenberg, C.B., James, S.P., Meltzer, S.J., Wilson, K.T. (1999) Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in Helicobacter pylori gastritis. *Gastroenterology*, 116, 1319-1329.

Garner, A., Flemstrom, G., Allen, A., Heylings, J.R., McQueen, S. (1984) Gastric mucosal protective mechanisms: roles of epithelial bicarbonate and mucus secretions. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 101, 79-86.

Gasparini, L., Ongini, E., Wenk, G. (2004) Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Alzheimer's disease: old and new mechanisms of action. *J Neurochem*, 91, 521-536.

Goel, A. y Aggarwal, B.B. (2010) Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutr Cancer*, 62, 919-930.

Gollasch, M., Ried, C., Bychkov, R., Luft, F.C., Haller, H. (1996) K+ currents in human coronary artery vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 78, 676-688.

Gomes, A.S., Lima, L.M., Santos, C.L., Cunha, F.Q., Ribeiro, R.A., Souza, M.H. (2006) LPS from Escherichia coli protects against indomethacin-induced gastropathy in rats-role of ATP-sensitive potassium channels. *Eur J Pharmacol*, 547, 136-142.

Gopel, S.O., Kanno, T., Barg, S., Weng, X.G., Gromada, J., Rorsman, P. (2000) Regulation of glucagon release in mouse -cells by KATP channels and inactivation of TTX-sensitive Na+ channels. *J Physiol*, 528, 509-520.

Goswami, S., Jain, S., Santani, D. (1997) Anti-ulcer activity of cromakalim (BRL 34915), a potassium-channel opener, against experimentally induced gastric and duodenal ulcers in rats and guinea-pigs. *J Pharm Pharmacol*, 49, 195-199.

Grant, K.L. y Schneider, C.D. (2000) Turmeric. *Am J Health Syst Pharm*, 57, 1121-1122.

Gretzer, B., Ehrlich, K., Maricic, N., Lambrecht, N., Respondek, M., Peskar, B.M. (1998) Selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and their influence on the protective effect of a mild irritant in the rat stomach. *Br J Pharmacol*, 123, 927-935.

Gross, I., Toman, A., Uhde, I., Schwanstecher, C., Schwanstecher, M. (1999) Stoichiometry of potassium channel opener action. *Mol Pharmacol*, 56, 1370-1373.

Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento de Artritis Reumatoide del adulto, México: Secretaria de Salud, 2009.

Gurbuz, I. y Yesilada, E. (2007) Evaluation of the anti-ulcerogenic effect of sesquiterpene lactones from Centaurea solstitialis L. ssp. solstitialis by using various in vivo and biochemical techniques. *J Ethnopharmacol*, 112, 284-291.

Hardman, J.G., Gilman, A.G., Limbird, L.E. (1996) Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. Goodman and Gilman's. Pharmacological basis of therapeutics, 9th ed. McGraw-Hill, New York. p.p 617-657.

Hawkins, C. y Hanks, G.W. (2000) The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a review of the literature. *J Pain Symptom Manage*, 20, 140-151.

Holder, G.M., Plummer, J.L., Ryan, A.J. (1978) The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica*, 8, 761-768.

Inagaki, N., Gonoi, T., Clement, J.P.T., Namba, N., Inazawa, J., González, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., Bryan, J. (1995) Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, 270, 1166-1170.

Inoue, I., Nagase, H., Kishi, K., Higuti, T. (1991) ATP-sensitive K+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*, 352, 244-247.

Isomoto, S., Kondo, C., Yamada, M., Matsumoto, S., Higashiguchi, O., Horio, Y., Matsuzawa, Y., Kurachi, Y. (1996) A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K+ channel. *J Biol Chem*, 271, 24321-24324.

Jackson, W.F. (2005) Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation*, 12, 113-127.

Jagetia, G.C. y Aggarwal, B.B. (2007) "Spicing up" of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol*, 27, 19-35.

Jakobsson, P.J., Thoren, S., Morgenstern, R., Samuelsson, B. (1999) Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7220-7225.

Jobin, C., Bradham, C.A., Russo, M.P., Juma, B., Narula, A.S., Brenner, D.A., Sartor, R.B. (1999) Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J Immunol*, 163, 3474-3483.

Kam, P.C. y See, A.U. (2000) Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. *Anaesthesia*, 55, 442-449.

Keeble, J.E. y Moore, P.K. (2002) Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs. *Br J Pharmacol*, 137, 295-310.

Kim, D.C., Kim, S.H., Choi, B.H., Baek, N.I., Kim, D., Kim, M.J., Kim, K.T. (2005) Curcuma longa extract protects against gastric ulcers by blocking H2 histamine receptors. *Biol Pharm Bull*, 28, 2220-2224.

Kinoshita, H., Azma, T., Nakahata, K., Iranami, H., Kimoto, Y., Dojo, M., Yuge, O., Hatano, Y. (2004) Inhibitory effect of high concentration of glucose on relaxations to activation of ATP-sensitive K+ channels in human omental artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 2290-2295.

Kitahora, T. y Guth, P.H. (1987) Effect of aspirin plus hydrochloric acid on the gastric mucosal microcirculation. *Gastroenterology*, 93, 810-817.

Koster, J.C., Permutt, M.A., Nichols, C.G. (2005) Diabetes and insulin secretion: the ATP-sensitive K+ channel (K ATP) connection. *Diabetes*, 54, 3065-3072.

Krotz, F., Schiele, T.M., Klauss, V., Sohn, H.Y. (2005) Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction. *J Vasc Res*, 42, 312-324.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., (2004) Robbins and Cotran. Phatologic Basis of Disease. 7˚ ed. WB Saunders. St Louis, Mo.

Lacy, C., Armstrong, L., Goldman, M., Lance, L. (2000-2001) Drug information Handbook 8° ed. Editorial International American Pharmaceutical Association.

Lanza, F.L. (1989) A review of gastric ulcer and gastroduodenal injury in normal volunteers receiving aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 163, 24-31.

Luper, S. (1999) A review of plants used in the treatment of liver disease: part two. *Altern Med Rev*, 4, 178-188.

Lutomski, J., Kedzia, B., Debska, W. (1974) [Effect of an alcohol extract and of active ingredients from Curcuma longa on bacteria and fungi (author's transl)]. *Planta Med*, 26, 9-19.

Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Manning, P.T., Hauser, S.D., Leahy, K.M., Smith, W.G., Isakson, P.C., Seibert, K. (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 3228-3232.

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

Miller, M.J. y Grisham, M.B. (1995) Nitric oxide as a mediator of inflammation?-You had better believe it. *Mediators Inflamm*, 4, 387-396.

Miura, H., Wachtel, R.E., Loberiza, F.R., Jr., Saito, T., Miura, M., Nicolosi, A.C., Gutterman, D.D. (2003) Diabetes mellitus impairs vasodilation to hypoxia in human coronary arterioles: reduced activity of ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res*, 92, 151-158.

Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., Vane, J.R. (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 263, 663-665.

Motilva, V., Alarcón de la Lastra, C., Bruseghini, L., Manuel Herrerias, J., Sánchez-Fidalgo, S. (2005) COX expression and PGE(2) and PGD(2) production in experimental acute and chronic gastric lesions. *Int Immunopharmacol*, 5, 369-379.

Munzenmaier, A., Lange, C., Glocker, E., Covacci, A., Moran, A., Bereswill, S., Baeuerle, P.A., Kist, M., Pahl, H.L. (1997) A secreted/shed product of Helicobacter pylori activates transcription factor nuclear factor-kappa B. *J Immunol*, 159, 6140-6147.

Navarrete, A., Arrieta, J., Terrones, L., Abou-Gazar, H., Calis, I. (2005) Gastroprotective effect of Astragaloside IV: role of prostaglandins, sulfhydryls and nitric oxide. *J Pharm Pharmacol*, 57, 1059-1064.

NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Poder Ejecutivo, Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. Diario Oficial, Lunes, diciembre 6, 1999.

Noma, A. (1983) ATP-regulated K+ channels in cardiac muscle. *Nature*, 305, 147-148.

O'Neill, G.P. y Ford-Hutchinson, A.W. (1993) Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *Febs Lett*, 330, 156-160.

O'Rourke, B. (2000) Myocardial K(ATP) channels in preconditioning. *Circ Res*, 87, 845-855.

O'Rourke, B. (2004) Evidence for mitochondrial K+ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res*, 94, 420-432.

Ohki, S., Ogino, N., Yamamoto, S., Hayaishi, O. (1979) Prostaglandin hydroperoxidase, an integral part of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J Biol Chem*, 254, 829-836.

Pain, T., Yang, X.M., Critz, S.D., Yue, Y., Nakano, A., Liu, G.S., Heusch, G., Cohen, M.V., Downey, J.M. (2000) Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res*, 87, 460-466.

Pan, M.H., Huang, T.M., Lin, J.K. (1999) Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos*, 27, 486-494.

Patel, H.M., Santani, D.D., Goswami, S.G. (2001) Evaluation of the effects of nicorandil on experimentally induced gastric ulcers. *Pharmacology*, 63, 154-159.

Peskar, B.M., Ehrlich, K., Peskar, B.A. (2002) Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 301, 969-974.

Pineda-Peña, E.A., Jiménez-Andrade, J.M., Castañeda-Hernández G., Chávez-Piña A.E. (2012) Docosahexaenoic acid, an omega-3 polyunsaturated acid protects against indomethacin-induced gastric injury. *Eur J Pharmacol.* 697(1-3), 139-143.

Plummer, S.M., Holloway, K.A., Manson, M.M., Munks, R.J., Kaptein, A., Farrow, S., Howells, L. (1999) Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene*, 18, 6013-6020.

Rainsford, K.D. y Willis, C. (1982) Relationship of gastric mucosal damage induced in pigs by antiinflammatory drugs to their effects on prostaglandin production. *Dig Dis Sci*, 27, 624-635.

Rainsford, KD. (1983) Microvascular injury during gastric mucosal damage by anti-inflammatory drugs in pigs and rats. *Agents Actions* 13, 5–6.

Rampton, D.S. (1987) Non-steroidal anti-inflammatory drugs and the lower gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol*, 22, 1-4.

Robbins, M.E., Hopper, E.D., Schoenfisch, M.H. (2004) Synthesis and characterization of nitric oxide-releasing sol-gel microarrays. *Langmuir*, 20, 10296-10302.

Robert, A., Nezamis, J.E., Lancaster, C., Hanchar, A.J. (1979) Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology*, 77, 433-443.

Rostom, A., Muir, K., Dube, C., Jolicoeur, E., Boucher, M., Joyce, J., Tugwell, P., Wells, G.W. (2007) Gastrointestinal safety of cyclooxygenase-2 inhibitors: a Cochrane Collaboration systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5, 818-828, 828 e811-815; quiz 768.

Roth, S.H., Bennett, R.E., Mitchell, C.S., Hartman, R.J. (1987) Cimetidine therapy in nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. Double-blind long-term evaluation. *Arch Intern Med*, 147, 1798-1801.

Sacco, R., Innaro, N., Pata, F., Lucisano, A.M., Talarico, C., Aversa, S. (2007) [Preoperative diagnosis of incidental carcinoma in multinodular goitre by means of electromagnetic interactions]. *Chir Ital*, 59, 247-251.

Santos, C.L., Souza, M.H., Gomes, A.S., Lemos, H.P., Santos, A.A., Cunha, F.Q., Wallace, J.L. (2005) Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. *Br J Pharmacol*, 146, 481-486.

Schoen, R.T. y Vender, R.J. (1989) Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage. *Am J Med*, 86, 449-458.

Schatzberg, A.F., (2006) Tratado de psicofarmacología. Editorial Elsevier España, p.p 887. ISBN 84-458-1426-5

Schwanstecher, M., Sieverding, C., Dorschner, H., Gross, I., Aguilar-Bryan, L., Schwanstecher, C., Bryan, J. (1998) Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *Embo J*, 17, 5529-5535.

Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P. (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 12013-12017.

Serhan, C.N., Levy, B.D, Clish, C.B., Gronert, K., Schmidt, B., Gronert K. (2001) Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol,* 2(7), 612-9.

Sharma, M. y Ray, S.M. (2008) Synthesis and biological evaluation of amide derivatives of (5,6-dimethoxy-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl)acetic acid as anti-inflammatory agents with reduced gastrointestinal ulcerogenecity. *Eur J Med Chem*, 43, 2092-2102.

Shehzad, A., Wahid, F., Lee, Y.S. (2010) Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. *Arch Pharm (Weinheim)*, 343, 489-499.

Shyng, S. y Nichols, C.G. (1997) Octameric stoichiometry of the KATP channel complex. *J Gen Physiol*, 110, 655-664.

Simon, L.S., Smolen, J.S., Abramson, S.B., Appel, G., Bombardier, C., Brater, D.C., Breedveld, F.C., Brune, K., Burmester, G.R., Crofford, L.J., Dougados, M., DuBois, R.N., Fitzgerald, G.A., Frishman, W., Garcia Rodriguez, L.A., Hochberg, M.C., Kalden, J.R., Laine, L., Langman, M.J., Prescott, S.M., Van de Putte, L.B., Whelton, A., White, W.B., Willaims, G.H. (2002) Controversies in COX-2 selective inhibition. *J Rheumatol*, 29, 1501-1510.

Slomiany, B.L. y Slomiany, A. (2000) Role of endothelin-converting enzyme-1 in the suppression of constitutive nitric oxide synthase in rat gastric mucosal injury by indomethacin. *Scand J Gastroenterol*, 35, 1131-1136.

Smith, W.L. (1992) Prostanoide biosynthesis and mechanism of action. *Am J Physical,* 268, F181-F191.

Smith, C.J., Zhang, Y., Koboldt, C.M., Muhammad, J., Zweifel, B.S., Shaffer, A., Talley, J.J., Masferrer, J.L., Seibert, K., Isakson, P.C. (1998) Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 13313-13318.

Somasundaram, S., Hayllar, H., Rafi, S., Wrigglesworth, J.M., Macpherson, A.J., Bjarnason, I. (1995) The biochemical basis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced damage to the gastrointestinal tract: a review and a hypothesis. *Scand J Gastroenterol*, 30, 289-299.

Souza, M.H., Mota, J.M., Oliveira, R.B., Cunha, F.Q. (2008) Gastric damage induced by different doses of indomethacin in rats is variably affected by inhibiting iNOS or leukocyte infiltration. *Inflamm Res,* 57, 28-33.

Spalding, W.M., Reeves, M.J., Whelton, A. (2007) Thromboembolic cardiovascular risk among arthritis patients using cyclooxygenase-2-selective inhibitor or nonselective cyclooxygenase inhibitor nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Ther*, 14, 3-12.

Standen, N.B., Quayle, J.M., Davies, N.W., Brayden, J.E., Huang, Y., Nelson, M.T. (1989) Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K+ channels in arterial smooth muscle. *Science*, 245, 177-180.

Steinbach, G., Lynch, P.M., Phillips, R.K., Wallace, M.H., Hawk, E., Gordon, G.B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., Su, L.K., Levin, B. (2000) The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*, 342, 1946-1952.

Suleyman, H., Akcay, F., Altinkaynak, K. (2002) The effect of nimesulide on the indomethacin- and ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Pharmacol Res*, 45, 155-158.

Suleyman, H., Demircan, B., Karagoz, Y. (2007) Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep*, 59, 247-258.

Suzuki, M., Li, R.A., Miki, T., Uemura, H., Sakamoto, N., Ohmoto-Sekine, Y., Tamagawa, M., Ogura, T., Seino, S., Marban, E., Nakaya, H. (2001) Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res*, 88, 570-577.

Takeuchi, K., Tanaka, A., Hayashi, Y., Yokota, A. (2005) COX inhibition and NSAID-induced gastric damage--roles in various pathogenic events. *Curr Top Med Chem*, 5, 475-486.

Tammaro, P., Proks, P., Ashcroft, F.M. (2006) Functional effects of naturally occurring KCNJ11 mutations causing neonatal diabetes on cloned cardiac KATP channels. *J Physiol*, 571, 3-14.

Thong-Ngam, D., Choochuai, S., Patumraj, S., Chayanupatkul, M., Klaikeaw, N. (2012) Curcumin prevents indomethacin-induced gastropathy in rats. *World J Gastroenterol*, 18, 1479-1484.

Tonnesen, H.H. y Karlsen, J. (1985) Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z Lebensm Unters Forsch*, 180, 402-404.

Toroudi, H.P., Rahgozar, M., Bakhtiarian, A., Djahanguiri, B. (1999) Potassium channel modulators and indomethacin-induced gastric ulceration in rats. *Scand J Gastroenterol*, 34, 962-966.

Tusnady, G.E., Bakos, E., Varadi, A., Sarkadi, B. (1997) Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Febs Lett*, 402, 1-3.

Tusnady, G.E., Sarkadi, B., Simon, I., Varadi, A. (2006) Membrane topology of human ABC proteins. *Febs Lett*, 580, 1017-1022.

Uhde, I., Toman, A., Gross, I., Schwanstecher, C., Schwanstecher, M. (1999) Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *J Biol Chem*, 274, 28079-28082.

Vane, J.R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 231, 232-235.

Vane, J.R. y Botting, R.M. (1995) New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*, 44, 1-10.

Vane, J.R. (1996) Introduction: Mechanism of action of NSAIDs. *British J of Rreumatology,* 35, 1-3.

Vane, J.R. y Botting, R.M. (1998) Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*, 104, 2S-8S; discussion 21S-22S.

Wallace, J.R., y McKnight G.W., (1990) The mucoid cap over superficial gastric damage in the rat. A higt-pH microenviroment dissipated by nonsteroidal antiinflammatory drugs and endothelin. *Gastroenterology,* 99, 295-304

Wallace, J.L., Arfors, K.E., McKnight, G.W. (1991) A monoclonal antibody against the CD18 leukocyte adhesion molecule prevents indomethacin-induced gastric damage in the rabbit. *Gastroenterology,* 100, 878-883.

Wallace, J.L., McCafferty, D.M., Carter, L., McKnight, W., Argentieri, D. (1993a) Tissue-selective inhibition of prostaglandin synthesis in rat by tepoxalin: anti-inflammatory without gastropathy? *Gastroenterology*, 105, 1630-1636.

Wallace, J.L., McKnight, W., Miyasaka, M., Tamatani, T., Paulson, J., Anderson, D.C., Granger, D.N., Kubes, P. (1993b) Role of endothelial adhesion molecules in NSAID-induced gastric mucosal injury. *Am J Physiol*, 265, G993-998.

Wallace, J.L., Reuter, B., Cicala, C., McKnight, W., Grisham, M., Cirino, G. (1994a) A diclofenac derivative without ulcerogenic properties. *Eur J Pharmacol*, 257, 249-255.

Wallace, J.L., Reuter, B., Cicala, C., McKnight, W., Grisham, M.B., Cirino, G. (1994b) Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat. *Gastroenterology*, 107, 173-179.

Wallace, J.L., McKnight, W., Del Soldato, P., Baydoun, A.R., Cirino, G. (1995) Anti-thrombotic effects of a nitric oxide-releasing, gastric-sparing aspirin derivative. *J Clin Invest*, 96, 2711-2718.

Wallace, J.L. y Tigley, A.W. (1995) Review article: new insights into prostaglandins and mucosal defence. *Aliment Pharmacol Ther*, 9, 227-235.

Wallace, J.L. y Granger, D.N. (1996) The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *Faseb J*, 10, 731-740.

Wallace, J.L. (1997) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology*, 112, 1000-1016.

Wallace, J.L. (2000) How do NSAIDs cause ulcer disease? *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 14, 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, 706-714.

Wallace, J.L. (2001) Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 15, 691-703.

Wallace, J.L. y Ma, L. (2001) Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Exp Biol Med (Maywood)*, 226, 1003-1015.

Wallace, J.L. (2006) Nitric oxide, aspirin-triggered lipoxins and NO-aspirin in gastric protection. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 5, 133-137.

Wallace, J.L., Caliendo, G., Santagada, V., Cirino, G., Fiorucci, S. (2007) Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulfide-releasing diclofenac derivative in the rat. *Gastroenterology,*132, 261-271.

Wallace, J.L., Vong, L. (2008) NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDs. *Curr Opin Investig Drugs*; 9(11):1151-6.

Whelton, A. (1999) Nephrotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: physiologic foundations and clinical implications. *Am J Med*, 106, 13S-24S.

Wang, R. (2002) Two's company, three's a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? *Faseb J,* 16(13): 1792-1798

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

Wilson, D.E. (1991) Role of prostaglandins in gastroduodenal mucosal protection. *J Clin Gastroenterol*, 13 Suppl 1, S65-71.

Wolfe, M.M., Lichtenstein, D.R., Singh, G. (1999) Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med*, 340, 1888-1899.

Yamada, T., Deith, E., Specian R.D., Perry M.A., Sartor B., Grismam, M.B. (1993) Mechanism of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation,* 17, 641-662.

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

Zhao, Y.F. y Chen, C. (2007) Regulation of pancreatic beta-cell function by adipocytes. *Sheng Li Xue Bao*, 59, 247-252.