



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

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

**“Evaluación de las moléculas implicadas en el mecanismo  
gastro y entero protector del DHA (ácido  
docosaheptaenoico) en el daño gastrointestinal generado  
por indometacina”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN  
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

**P R E S E N T A:**

PINEDA PEÑA ELIZABETH ARLEN

**DIRECTORES DE TESIS:**

DRA. EN C. ARACELY EVANGELINA CHÁVEZ PIÑA

DR. EN C. ISMAEL ANTONIO LARES ASSEFF



**Ciudad de México, Junio del 2017.**

## **COMITÉ TUTORIAL**

***DRA. EN C. MARÍA ESTHER RAMÍREZ MORENO  
ENMyH***

***DRA. EN C. DORIS ATENEA CERECEDO MERCADO  
ENMyH***

***DR. EN C. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO  
FACULTAD DE QUÍMICA UNAM***



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 08 del mes de Junio del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMyH para examinar la tesis titulada:

Evaluación de las moléculas implicadas en el mecanismo gastro y entero protector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gastrointestinal generado por indometacina

Presentada por el alumno:

Pineda	Peña	Elizabeth Arlen
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
Con registro: B 1 3 0 6 9 7		

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

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

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. en C. Aracely Evangelina Chávez Piña

Dr. en C. Ismael Antonio Lares Asseff

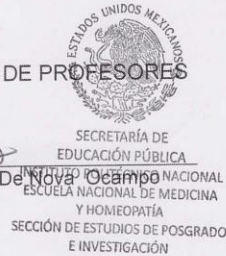
Dra. en C. Doris Atenea Cerecedo Mercado

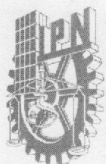
Dra. en C. María Esther Ramírez Moreno

Dr. en C. Andrés Navarrete Castro

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. en C. Mónica Ascención De Nova Ocampo





# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 25 de marzo del 2014

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMyH en su sesión ordinaria No. 3 celebrada el día 26 del mes de marzo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>Pineda</u>	<u>Peña</u>	<u>Elizabeth Arlen</u>
<small>Apellido paterno</small>	<small>Apellido materno</small>	<small>Nombre (s)</small>

Con registro: 

B	1	3	0	6	9	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
Evaluación de las moléculas implicadas en el mecanismo gastro y entero protector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gastrointestinal generado por indometacina

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:  
Estudio de las moléculas implicadas en el mecanismo gastro y enteroprotector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gástrico inducido por indometacina en un modelo murino

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:  
Dra. en C. Aracely Evangelina Chávez Piña y Dr. en C. Ismael Antonio Lares Asseff

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:  
Laboratorio de Farmacología de las instalaciones de la E.N.M.yH.  
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

 Dra. en C. Aracely E. Chávez Piña Aspirante		 Dr. en C. Ismael Antonio Lares Asseff Presidente del Comité
--	--	--

SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA  
 INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
 ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA HOMEOPATIA  
 SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

PROHIBICIÓN DE USO DE OBRA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

PRESENTE.

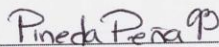
Bajo protesta de decir la verdad el que suscribe **C. Elizabeth Arlen Pineda Peña**, manifiesto ser autor (a) y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada **"Evaluación de las moléculas implicadas en el mecanismo gastro y entero protector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gastrointestinal generado por indometacina"**, en adelante "La Tesis" y de la cual se adjunta copia para efecto de requisito académico para la obtención de grado de Doctor en Ciencias en Biotecnología.

Por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 de la ley federal del Derecho de Autor, se prohíbe el uso y/o explotación de "La Tesis" en las formas y medios descritos en el fundamento legal citado, en virtud de que cualquier utilización por una persona física o moral distinta del autor puede afectar o violar derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad, o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros distintos al autor de "La Tesis". Ya que se ha realizado el trámite de patente con algunos de los resultados obtenidos en la misma, además del proceso de publicación en una revista científica de carácter internacional JCR indexada de otra parte de los resultados obtenidos.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis" y limitarse a su uso en la forma arriba señalada

Ciudad de México a 09 de mayo de 2017.

ATENTAMENTE

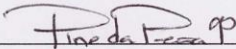


M. en C. Elizabeth Arlen Pineda Peña

**Declaración de originalidad**

"Declaro que esta tesis. Así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y, en mi conocimiento, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona. Tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en otra institución educativa, excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento a las personas que contribuyeron con su trabajo, principalmente a mis directores de tesis por su apoyo para realizar la concepción del proyecto, el estilo de la presentación y la expresión escrita."

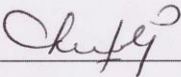
ATENTAMENTE



---

M. en C. Elizabeth Arlen Pineda Peña

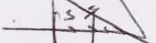
Vo.Bo.



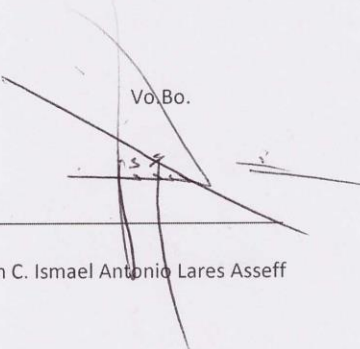
---

D. en C. Aracely Evangelina Chávez Piña

Vo.Bo.



---



D. en C. Ismael Antonio Lares Asseff

Ciudad de México a 09 de mayo de 2017.

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Farmacología de la Sección de Estudios de Posgrado de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. en C. Aracely Evangelina Chávez Piña .

Durante la realización de este proyecto, el alumno contó con la beca de Doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de becario 252829 y también con la Beca de Estimulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) del Instituto Politécnico Nacional. Esta tesis se realizó gracias al donativo de los proyectos SIP con clave 20141036, 20150031, 20160493, 20170176 así como al proyecto CONACYT con clave 178027.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Aracely Evangelina Chávez Piña**, mi directora de tesis, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su apoyo, orientación y dedicación que han sido fundamentales para mi formación como investigador, gracias infinitas doctora.

Al **Dr. Gilberto Castañeda**, por su valiosa asesoría, orientación y tiempo, por recibirme en su laboratorio y sobre todo por los consejos a nivel personal y profesional.

A mi comité tutorial: **Dra. María Esther Ramírez Moreno, Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado, Dr. Andrés Navarrete Castro y Dr. Ismael Antonio Lares Asseff**. Por su disposición, amabilidad, observaciones y tiempo dedicado a la revisión de este proyecto, pero especialmente por brindarme el apoyo académico que siempre recordare.

Al personal técnico (**Q.F.B. Lourdes González Flores y Q.F.B. Martha Patricia González García**) del **Laboratorio 34** de la sección externa de Farmacología del CINVESTAV, por su valiosa ayuda, ejemplar disposición al trabajo, por sus palabras de aliento durante el trabajo experimental.

Al **Dr. José Segovia** y al personal técnico (**QFB. Araceli Navarrete Alonso y QFI. Paula Vergara Zubillaga**) del **Laboratorio de Fisiología II** del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, por su asesoría y consejos durante el trabajo experimental de este proyecto, y sobre todo por el afectuoso trato que recibí en su laboratorio.

Al personal técnico (**Dra. Ivette Martínez Vieyra**) y alumnos (**Leah Alonso, Alma Martínez, Clarissa Leñero, Antonio Escarcega, Beatriz González, Tizziani Benitez, Giselle Pacheco, Erika Reus y Diana García**) del Laboratorio de Hematología de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENMyH, por su invaluable asesoría, paciencia y generosidad para compartir sus experiencias de tipo profesional y personal que han sido de gran valor y que recordare con cariño siempre.



A la **Dra. Cynthia Ordaz Pichardo** y alumnos (**Iván Arias, Elix Domínguez, Sergio Falconi y Daniel Espinosa**) del Laboratorio de Biología Celular y Productos Naturales I de la sección posgrado de la ENMyH por su cordialidad, apoyo, compañerismo y por su gran ejemplo de constancia y superación.

A mis compañeros de laboratorio **Nadia Díaz Triste, Arlette Arroyo Lira, Arizai Landa Juárez, Christopher Miranda Lara, Yoalli Martínez Pérez, Nora Núñez, Víctor Arellano, Cristina Reyes Nolasco y Reyes Abril Urias Roderico**, por su disposición para el trabajo en equipo, consejos profesionales, por la armonía y gratos momentos que he vivido al lado de ustedes, gracias por su amistad.

A todos los profesores y personal del posgrado la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENMyH, por el apoyo brindado durante mi formación, por la generosidad de los conocimientos transmitidos y por ser un ejemplo de desarrollo profesional a seguir.

# ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>pag.</b>
ÍNDICE DE DIAGRAMAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
Índice de gráficas .....	xvii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	xix
RESUMEN .....	xxiii
ABSTRACT.....	xxiv
1.- INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Elementos de defensa mucosal.....	3
1.1.1 Papel de las prostaglandinas en la defensa mucosal .....	4
1.2 Generalidades de los anti inflamatorios no esteroideos .....	5
1.2.1 Indometacina .....	6
1.2.2 Mecanismo de daño gástrico e intestinal por indometacina .....	7
1.2.4 Moléculas implicadas en el daño gástrico generado por AINEs .....	10
1.2.4.1 Mieloperoxidasa (MPO) .....	10
1.2.4.2 Leucotrieno B <sub>4</sub> (LTB <sub>4</sub> ) .....	11
1.2.4.3 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).....	12
1.2.4.4 Molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) .....	12
1.2.4.5 Interleucina 1- beta (Il-1 $\beta$ ).....	13
1.3 Alternativas terapéuticas para reducir el daño gástrico generado por AINEs.....	14
1.4 Ácido docosahexaenoico (DHA) .....	16

1.4.1 Resolvinas derivadas del ácido docosahexaenoico (RvD) y sus receptores .....	18
2. ANTECEDENTES .....	21
3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN .....	24
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVO GENERAL.....	26
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
8. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
8.1 Fármacos y Reactivos .....	28
8.2. Animales.....	29
8.3 Evaluación del daño gástrico e intestinal generado por la administración aguda de indometacina a diferentes dosis .....	30
8.4 Efecto gastro y entero protector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gastrointestinal generado por indometacina en el ratón.....	30
8.5 Efecto gastro y enteroprotector del omeprazol en el daño gástrico e intestinal agudo generado por indometacina en la rata. ....	31
8.6 Cuantificación de los niveles de mieloperoxidasa en tejido gástrico e intestinal de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo generado por indometacina.....	31
8.7 Valoración de la infiltración de leucocitos por corte histológico y tinción con hematoxilina eosina en tejido gástrico e intestinal de ratón después de la administración de indometacina. ....	32
8.8 Cuantificación de los niveles de LTB <sub>4</sub> , TNF- $\alpha$ , RvD1 en tejido gastrointestinal e Il-1 $\beta$ , ICAM-1 en tejido gástrico después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico e intestinal agudo generado indometacina. ....	32
8.10 Obtención de extractos nucleares para evaluar la translocación nuclear de NF $\kappa$ $\beta$ en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gástrico generado por indometacina.....	34

8.11 Cuantificación de proteínas por método de BCA (ácido bicinconínico) .....	35
8.12 Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	36
8.13 Transferencia a membrana de nitrocelulosa. ....	36
8.14 Bloqueo e incubación de la membrana con anticuerpos de interés .....	36
8.15 Revelado .....	38
8.16 Determinación de la translocación nuclear de NFκβ en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gástrico generado por indometacina.....	38
8.17 Obtención de extractos totales para determinar la expresión de GPR120 (FFAR 4) y GPR40 (FFAR 1) en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gástrico generado por indometacina.....	39
8.18 Inmunodetección de GPR120 (FFAR 4) y GPR40 (FFAR 1) en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gástrico generado por indometacina .....	39
8.15 Análisis estadístico .....	41
9. RESULTADOS .....	42
9.1 Evaluación del daño gástrico e intestinal generado por la administración aguda de indometacina.....	42
9.2 Efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gástrico generado por indometacina en el ratón. ....	43
9.3 Efecto gastroprotector del DHA frente al efecto gastroprotector de omeprazol en el daño gástrico generado por indometacina en el ratón .....	45
9.4 Efecto entero protector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño intestinal generado por indometacina en el ratón. ....	46
9.5 Efecto del DHA frente al efecto del omeprazol en el daño intestinal generado por indometacina en el ratón .....	47
9.6 Cuantificación de los niveles de mieloperoxidasa en tejido gástrico de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo generado por indometacina. .	48

9.6.1 Cuantificación de los niveles de mieloperoxidasa en tejido intestinal de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño intestinal agudo generado por indometacina.....	49
9.7.1 Valoración de la infiltración de leucocitos por corte histológico y tinción con hematoxilina eosina en tejido gástrico de ratón después de la administración de indometacina.....	50
9.7.2 Valoración de la infiltración de leucocitos por corte histológico y tinción con hematoxilina eosina en tejido intestinal de ratón después de la administración de indometacina.....	52
9.8.1 Cuantificación de los niveles de LTB <sub>4</sub> en tejido gástrico de raón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido por indometacina....	54
9.8.2 Cuantificación de los niveles de LTB <sub>4</sub> en tejido intestinal de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño intestinal agudo inducido por indometacina..	55
9.9.1 Cuantificación de los niveles de TNF- $\alpha$ en tejido gástrico de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido por indometacina....	56
9.9.2 Cuantificación de los niveles de TNF- $\alpha$ en tejido intestinal de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño intestinal agudo inducido por indometacina..	57
9.10 Obtención de extractos nucleares para evaluar la translocación nuclear de NF $\kappa$ B en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gastrointestinal generado por indometacina.....	58
9.11 Determinación de la translocación nuclear de NF $\kappa$ B en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gástrico generado por indometacina.....	61
9.12 Cuantificación de los niveles de ICAM-1 en tejido gástrico de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido por indometacina....	63
9.13 Cuantificación de los niveles de Il-1 $\beta$ en tejido gástrico de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido por indometacina....	64
9.14 Cuantificación de los niveles de RvD1 en tejido gástrico de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido por indometacina....	65
9.15 Cuantificación de los niveles de RvD1 en tejido intestinal de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño intestinal agudo inducido por indometacina..	66

9.16 Expresión de GPR120 y GPR40 en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gastrointestinal generado por indometacina .....	67
10.- DISCUSIÓN .....	72
11. CONCLUSIONES.....	90
12. PERSPECTIVAS.....	91
13.- REFERENCIAS .....	92
14.- ANEXOS.....	113
ANEXO I. Soluciones y reactivos.....	113
ANEXO II. Productos de Investigación.....	115

# ÍNDICE DE DIAGRAMAS

**Contenido** **pag.**

Diagrama 1. Estrategia metodológica general..... 27

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Contenido</b>	<b>pag.</b>
Figura 1. Estructura química de la indometacina.....	7
Figura 2 Enteropatía por AINEs.....	10
Figura 3. Estructura química del ácido docosahexaenoico.....	17
Figura 4. Imágenes representativas de las lesiones en cuerpo del estómago después de los diversos tratamientos.....	44
Figura 5. Imágenes representativas de cortes histológicos de las lesiones en el cuerpo del estómago después de los diversos tratamientos.....	51
Figura 6. Imágenes representativas de corte histológico de las lesiones en intestino después de los diversos tratamientos.....	53
Figura 7. Imagen representativa de la integridad del extracto de proteínas nucleares y citosólicas del tejido gástrico del ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina en gel de acrilamida- SDS al 12% con Tinción de Coomasie.....	58
Figura 8. Imagen representativa de la integridad del extracto de proteínas nucleares con proteína lamina $\beta$ del tejido gástrico del ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina en gel de acrilamida- SDS al 12%.....	59
Figura 9. Imagen representativa de la integridad del extracto de proteínas citosólica con proteína GAPDH de 37 kDa del tejido gástrico del ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina en gel de acrilamida- SDS al 12%.....	60
Figura 10. Imagen representativa de la integridad del extracto de proteínas totales del tejido gástrico del ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina en gel de acrilamida- SDS al 10% con Tinción de Coomasie.....	67



Figura 11. Imagen representativa de la expresión de GPR120 (FFAR 4) en tejido gástrico del ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina.....	68
Figura 12. Imagen representativa de la expresión deGPR40 (FFAR1) GPR40 en tejido gástrico del ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina.....	70
Figura 13. Esquema representativo del posible mecanismo gastroprotector del DHA ante el daño generado por indometacina.....	89

# Índice de gráficas

<b>Contenido</b>	<b>pag.</b>
Gráfica 1. Daño gástrico generado por la administración aguda de indometacina en estómago e intestino .....	42
Gráfica 2. Efecto del DHA en el daño gástrico inducido por la administración aguda de indometacina.....	43
Grafica 3. Comparación del efecto del DHA y omeprazol en el daño gástrico inducido por la administración aguda de indometacina en porcentaje de gastroprotección.....	45
Grafica 4. Efecto del DHA en el daño intestinal generado por la administración aguda de indometacina en porcentaje de enteroprotección.....	46
Gráfica 5. Comparación del efecto del DHA y omeprazol en el daño intestinal generado por la administración aguda de indometacina en porcentaje de gastroprotección.....	47
Gráfica 6. Niveles gástricos de mieloperoxidasa después del pre-tratamiento con DHA en el daño gástrico generado por la administración aguda de indometacina.....	48
Gráfica 7. Niveles intestinales de mieloperoxidasa, después del pre-tratamiento con DHA en el daño gástrico generado por la administración aguda de indometacina.....	49
Gráfica 8. Niveles gástricos de leucotrieno B <sub>4</sub> (LTB <sub>4</sub> ) después del pre-tratamiento con DHA en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina.....	54
Gráfica 9. Niveles intestinales de leucotrieno B <sub>4</sub> (LTB <sub>4</sub> ) después del pre-tratamiento con DHA en el modelo de daño intestinal inducido por la administración de indometacina en ratones.....	55
Gráfica 10. Niveles gástricos de TNF- $\alpha$ después del pre-tratamiento con DHA en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina .....	56
Gráfica 11. Niveles intestinales de TNF- $\alpha$ después del pre-tratamiento con DHA en el modelo de daño intestinal inducido por la administración de indometacina.....	57
Gráfica 12. Cuantificación de la unión del NF $\kappa$ B al DNA en extractos nucleares de tejido gástrico de las ratas tratadas con DHA en el daño gástrico generado por indometacina.....	62
Gráfica 13. Niveles gástricos de ICAM-1 después del pre-tratamiento con DHA en el modelo de	

daño gástrico inducido por la administración de indometacina.....	63
Gráfica 14. Niveles gástricos de Il-1bdespués del pre-tratamiento con DHA en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina.....	64
Gráfica 15. Niveles gástricos de RvD1 después del pre-tratamiento con DHA en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina.....	65
Gráfica 16. Niveles intestinales de RvD1 después del pre-tratamiento con DHA en el modelo de daño intestinal inducido por la administración de indometacina.....	66
Gráfica 17. Densitometría de los niveles de expresión de GPR120 (FFAR4) en tejido gástrico después del pre-tratamiento con DHA en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina.....	69
Gráfica 18. Densitometría de los niveles de expresión de GPR40 (FFAR1) en tejido gástrico después del pre-tratamiento con DHA en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina.....	71

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AChE	Acetilcolinesterasa
AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza de una vía
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
BCA	Ácido bicinconínico
CAT	Catalasa
COX	Ciclooxygenasas
Coxib	AINEs selectivos para la COX-2
CD11	Clúster de diferenciación 11
CD18	Clúster de diferenciación 18
CD54	Clúster de diferenciación 54
cPLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
CYP	Citocromo P450
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DHA	Ácido docosahexaenoico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EPA	Ácido eicosapentaenoico

EP1	Receptor 1 de Prostaglandina E <sub>2</sub>
FFAR	Receptores de ácidos grasos libres
FFAR 1	Receptor de ácidos grasos libres 1(GPR40)
FFAR 4	Receptor de ácidos grasos libres 4 (GPR120)
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
G-CSF	Factor estimulantes de colonias de granulocitos
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
GPR 40	Receptor acoplado a proteína G 40 (FFAR 1)
GPR120	Receptor acoplado a proteína G 120 (FFAR 4)
GSH	Glutación
H <sub>2</sub> S-NSAID	AINE liberador de sulfuro de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
HRP	Peroxidasa de rábano
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1
ICE	Enzima convertidora de interleucina 1
Il-1β	Interleucina 1 beta
IKK	Complejo inhibitorio de cinasa
IκBs	Complejo inhibitorio de κB
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP	Receptor de Prostaciclina I <sub>2</sub>

kDa	Kilodaltons
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LO-5	Lipoxigenasa 5
LO-15	Lipoxigenasa 15
LOX	Lipoxigenasa
MALT	Tejido linfoide asociado a la mucosa
MaR 1	Maresina 1
MDA	Malondialdehído
MPO	Mieloperoxidasa
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PE	Aminofosfolípidos fosfatidiletanolamina
pH	Potencial hidrogeno
PGs	Prostaglandinas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina I <sub>2</sub>
PS	Fosfatidilserina
PUFAs n-3	Ácidos grasos poliinsaturados omega-3
ROS	Especies reactivas a oxígeno
Rvs	Resolvinas

RvDs	Resolvinas de la serie D
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
SPMs	Mediadores especializados pro-resolutivos
TACE	Enzima convertidora del TNF- $\alpha$
TAK1	Transformador del crecimiento transformante beta
TBS	Amortiguador de solución salina con Tris
TLRs	Receptor de membrana tipo Toll
TMB	3, 3', 5, 5' - tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR1	Receptor 1 del factor de necrosis tumoral alfa
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular

## RESUMEN

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), provocan importantes efectos secundarios en el tracto gastrointestinal (GI) que limitan su uso. Además de la inhibición de las ciclooxigenasas (COX) y prostaglandinas (PGs), se ha reconocido la importancia de la respuesta inflamatoria en el daño gastrointestinal por AINEs. Se han reportado graves efectos secundarios a nivel intestinal debido a las terapéuticas actuales en contra del daño gastrointestinal por AINEs. En 2012, nuestro equipo de trabajo reportó el efecto gastroprotector de un ácido graso omega-3, el ácido docosahexaenoico (DHA) ante el daño gástrico generado por indometacina en rata; sin embargo, no se elucidó completamente el mecanismo por el cual se genera dicho efecto.

El objetivo de este trabajo fue investigar los posibles mecanismos implicados en el efecto gastro y enteroprotector del pre-tratamiento con DHA en un modelo de lesión gástrica e intestinal generada por indometacina en ratón BALB/c. Por lo tanto, se valoró la participación de diversas moléculas implicadas en el proceso inflamatorio, así como los niveles de resolvinas y la expresión de ciertos receptores. Los resultados obtenidos, muestran que el DHA ejerce un efecto protector ante el daño gástrico generado por indometacina, comparable con el efecto gastroprotector de omeprazol. El pre-tratamiento con DHA es capaz de reducir los niveles de mieloperoxidasa (MPO), mantener los niveles basales de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), molécula de adhesión intracelular I (ICAM-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), así como inhibir la translocación nuclear del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) a nivel gástrico. Además, el DHA incrementa la producción de RvD1 y logra reestablecer los niveles basales del receptor FFAR 4 (GPR120) a nivel gástrico. Los resultados obtenidos nos indican que el DHA participa en la modulación de la vía inflamatoria en el daño gástrico generado por indometacina, así como la posible participación de RvD1 y FFAR 4 en el efecto gastroprotector del DHA. A nivel intestinal, el DHA ejerce un efecto enteroprotector, siendo más efectivo que el efecto enteroprotector del omeprazol. Sin embargo, el DHA no modula los niveles de MPO, LTB<sub>4</sub>, RvD1 ni TNF- $\alpha$  en intestino, lo que sugiere de la participación de otras moléculas y la implicación de otros mecanismos a nivel intestinal.



## ABSTRACT

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), generates important side effects in the gastrointestinal (GI) tract that limited their clinical use. Besides the inhibition of cyclooxygenases (COX) and prostaglandins (PGs), the inflammatory response has been recognized in the NSAIDs-induced gastrointestinal damage. Severe intestinal side effects of the current therapies against gastrointestinal damage by NSAIDs has been reported. In 2012, our research group reported the gastroprotective effect of an omega-3 fatty acid, docosahexaenoic acid (DHA) against indomethacin has not been fully explained.

In consequence, the aim of this study was to examine the possible mechanisms associated with the gastro and enteroprotective effect of DHA pre-treatment in a BALB/c mouse model of indomethacin-induced gastric and enteric injury. Therefore, the participation of several molecules involved in the inflammatory process, as well as the resolving levels and the expression of certain receptors were evaluated. Our results show that DHA protected against indomethacin-induced gastric injury and this effect was comparable with the gastroprotective effect exerted by omeprazole. DHA pre-treatment reduced myeloperoxidase (MPO) levels, and was able to maintain basal levels of leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), also blocking the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in gastric tissue. In addition, DHA pretreatment enhanced the RvD1 production and restored FFAR 4 to the basal levels in gastric tissue. The results obtained indicate that DHA is involved in the modulation of the inflammatory pathway in the indomethacin-induced gastric damage model, and the possible implication of RvD1 and FFAR 4 in this gastroprotective effect. At intestinal level, DHA exerts an enteroprotective effect, which is better than the effect that omeprazole exerts in the intestine. However, DHA pre-treatment does not modulate MPO, LTB<sub>4</sub>, RvD1 or TNF- $\alpha$  levels on the intestine which means that the participation of other molecules and the regulation of other mechanism are involved.

# 1.- INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal está continuamente expuesto a diversas sustancias y factores agresivos como: pH luminal, temperatura, fármacos y agentes bacterianos que son capaces de causar reacciones inflamatorias locales y sistémicas que en su conjunto pueden dañar a la mucosa presente en el mismo (Bastaki and Wallace, 1999; Lim et al., 2009; Wallace and Granger, 1996). La habilidad que tiene la mucosa, de hacer frente a los diversos factores dañinos a los que está expuesta, es un proceso clave y dinámico denominado defensa de la mucosa, el cual involucra a todos los componentes que logran mantener su integridad y que en su mayoría están regulados por las prostaglandinas (PGs) (Bastaki and Wallace, 1999; Laine et al., 2008; Wallace and Ma, 2001). Por otra parte, el daño gastrointestinal incluye la lesión de la mucosa gástrica e intestinal, que ocurre principalmente cuando los factores agresores sobrepasan la capacidad de los componentes de defensa para eliminar o limitar el daño; destacando la inflamación, como uno de los mecanismos que más contribuye a dañar la mucosa (Bindu et al., 2013; Martin and Wallace, 2006).

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), fármacos con efecto analgésico, anti inflamatorio y antipirético de prescripción frecuente, constituyen uno de los grupos de fármacos más prescritos y auto medicados en el mundo; sin embargo, en consecuencia a su constante uso en el tratamiento de padecimientos de carácter inflamatorio, se encuentran entre los principales factores agresores de la mucosa gastrointestinal (Wallace, 2013). Los AINEs convencionales tienen la capacidad de inhibir a las ciclooxigenasas (COX), que se encuentran involucradas en la síntesis de prostaglandinas, afectando a la defensa mucosal y causando importantes efectos secundarios en el tracto gastrointestinal, los cuales incluyen desde erosiones y sangrado hasta perforaciones, provocando una limitación en su uso clínico (Laine et al., 2008; Martin and Wallace, 2006; Wallace, 2013). Recientemente, se han identificado otros mecanismo de daño gástrico generado por AINEs que son independientes a la inhibición de las prostaglandinas, entre

los cuales figuran la respuesta inflamatoria desencadenada a partir del daño tisular (Laine et al., 2008; Lim et al., 2009). Debido a ello, se ha originado la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para reducir los efectos secundarios asociados a los AINEs sin comprometer la eficacia de estos; ya que las terapias actuales como el uso de inhibidores de la bomba de protones, que si bien disminuyen las lesiones gástricas, aumentan la susceptibilidad al daño intestinal, resultan poco efectivas (Singh et al., 2016; Wallace, 2013).

La predilección por compuestos de origen natural para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en la industria farmacéutica, ha llevado a centrar la búsqueda de productos naturales presentes en la ingesta diaria. Investigaciones en diversos modelos de daño gástrico han reportado los beneficios del aceite de pescado como gastroprotector (Al-Harbi et al., 1995; Bhattacharya et al., 2006; Faust et al., 1989, 1990; Leung, 1994; Manjari and Das, 2000). Destacando que este beneficio se debe a que el aceite de pescado es rico en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (PUFA n-3), ya que entre sus principales componentes se encuentran el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), cuyas proporciones varían entre 6 a 12 % para DHA y 12 a 19% para EPA dependiendo de su origen; en consecuencia a la variada composición del mismo, no se había podido determinar cuál de todos los ácidos grasos poliinsaturados es el responsable del efecto gastroprotector y se había propuesto como posibles mecanismos la disminución de pepsina y secreción de ácido gástrico, e inclusive la modulación de prostanoïdes (Calder, 2009; Faust et al., 1989; Pineda-Peña et al., 2012).

Recientemente, nuestro equipo de trabajo ha logrado identificar el efecto gastroprotector de una dosis única de DHA en el daño gástrico agudo inducido por la indometacina en la rata, así como su intervención en la modulación de algunas moléculas implicadas en el proceso de inflamación del tejido gástrico como el LTB<sub>4</sub>, sin embargo no se han caracterizado todas las moléculas involucradas y los mecanismos por los cuales se lleva a cabo dicho efecto.

## *1.1 Elementos de defensa mucosal*

El estómago alcanza en su interior un pH de 1.2 durante el proceso digestivo, ya que es el órgano encargado de la digestión, esterilización de alimentos y agua (Kopic et al., 2010); por ello, entra diariamente en contacto con miles de microorganismos, nutrientes y diferentes sustancias, capaces de generar reacciones inflamatorias locales y sistémicas que en su conjunto dañan la mucosa (Hunt et al., 2015; Laine et al., 2008; Viggiano et al., 2015). En consecuencia, se ha propuesto la existencia de un sistema con la capacidad de prevenir dicho daño, así como la posibilidad de reparar el epitelio de forma rápida por lo que se le denomina “defensa mucosal” (Martin and Wallace, 2006; Wallace and Granger, 1996), dichos elementos establecen un equilibrio entre los factores agresores y protectores de la mucosa gástrica (Kopic et al., 2010; Viggiano et al., 2015; Wallace and Granger, 1996). Los componentes de la defensa mucosal se pueden jerarquizar acorde a su organización anatómica y se aplica a la mayoría del tracto digestivo; como el ácido clorhídrico (HCl), que permite la actividad de la enzima pepsina, sirviendo además como bactericida en estómago; este HCl es neutralizado en intestino gracias a la secreción de bilis y lipasas pancreáticas (Laine et al., 2008; Viggiano et al., 2015; Wallace and Granger, 1996). Seguido por el mucus formado por unidades de mucina MUC5/MUC6 en estómago y MUC2/MUC6 en intestino, quienes sirven como lubricante ante los movimientos peristálticos y como bacteriostático, existiendo también una mínima cantidad de fosfolípidos surfactantes que tienen propiedades hidrofóbicas (Allen and Flemström, 2005; Laine et al., 2008). Mientras que el bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) conforma una “barrera mucus-bicarbonato” junto con el mucus, formando un gradiente de pH que neutraliza la difusión de HCl y algunas enzimas, con lo que el pH en la superficie de las células epiteliales es neutro (Allen and Flemström, 2005; Laine et al., 2008; Wallace and Granger, 1996).

La presencia de las células epiteliales cilíndricas simples funciona como una barrera física a los agentes exógenos nocivos, debido a sus uniones intercelulares (tipo Gap), siendo

muy importante especialmente en intestino; este epitelio posee la cualidad de regenerarse continuamente gracias al flujo sanguíneo constante en su membrana basal, participando en dicha regeneración la formación de una capa mucoide (constituida por restos celulares, moco y plasma) que proporciona un microambiente favorable para la restitución epitelial en caso de lesión, gracias al flujo sanguíneo constante en su membrana basal (Iwata et al., 1998; Takeuchi et al., 2010, 2006). La micro circulación, formada por una extensa red de capilares distribuidos por debajo de la lámina propia, se encarga del transporte de nutrientes y oxígeno a las células; que gracias a la inervación sensorial aferente puede modificar el flujo sanguíneo por medio de la vasodilatación, lo que permite disipar las sustancias irritantes del sitio de lesión (Takeuchi et al., 2010; Wallace and Granger, 1996). La existencia de mastocitos adheridos a la fibronectina, vitronectina y laminina presentes en la lámina propia; forman parte funcional del tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) en intestino y actúan como sensores ante un estímulo nocivo, siendo capaces de liberar mediadores de la inflamación, lo que permiten el reclutamiento de células efectoras como los leucocitos encargados de montar la respuesta inflamatoria a través de la secreción de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (Süleyman et al., 2002; Wallace and Granger, 1996). Finalmente, las prostaglandinas (PGs), tienen la capacidad de mediar algunos elementos de la defensa y por lo tanto intervienen de manera activa en este proceso (Laine et al., 2008; Lim et al., 2009).

### *1.1.1 Papel de las prostaglandinas en la defensa mucosal*

Las prostaglandinas son miembros de una familia de ácidos grasos de 20 carbonos denominados eicosanoides, que emplean como sustrato al ácido araquidónico de los fosfolípidos en la membrana celular, en respuesta a estímulos hormonales, neuronales y locales (Atay et al., 2000; Johansson and Bergström, 1982). El ácido araquidónico liberado mediante la acción de la enzima fosfolipasa A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), puede ser metabolizado por la vía de las ciclooxigenasas (COX) generando tromboxano y prostaglandinas (Atay et al., 2000; Bindu et al., 2013; Johansson and Bergström, 1982).

La enzima ciclooxigenasa (prostaglandina-endoperóxido sintasa) tiene dos isoformas denominadas COX-1 y COX-2; en la mucosa gastrointestinal la acción de la COX-1 produce de manera constitutiva PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>; siendo PGE<sub>2</sub> a través de su receptor EP3 el que inhibe la secreción de HCl en las células parietales de estómago; mientras que en células epiteliales y calciformes tanto en estómago como en intestino, permite la secreción de moco y bicarbonato a través del receptor EP1 (Kato et al., 2005; Takeuchi et al., 2006). Por otro lado PGI<sub>2</sub> a través de sus receptores IP incrementa el flujo sanguíneo en mucosa previniendo el daño por isquemia; por lo tanto, la producción de prostaglandinas de manera fisiológica por parte de la mucosa gastrointestinal, es crucial ya que la mayoría de los mecanismos de defensa son estimulados o facilitados por ellas (Bindu et al., 2013; Laine et al., 2008; Martin and Wallace, 2006; Narumiya et al., 1999). Se ha reportado que la COX-1 es producida de manera constante en la mucosa, mientras que la COX-2 solo es detectada en presencia de estímulos inflamatorios; sin embargo, ha sido ampliamente reportado que ambas enzimas son necesarias para la protección de la mucosa ya que experimentalmente al inhibir las dos isoformas se produce daño gástrico considerable que no es producido al inhibirlas por separado (Atay et al., 2000; Wallace et al., 2000).

Una vez que ha ocurrido la lesión de la mucosa, otro de los mecanismos a través de los cuales las prostaglandinas reducen la severidad del daño gástrico es la modulación de las células inmunológicas en la mucosa, en donde la PGE<sub>2</sub> permite regular la liberación de diversas moléculas mediadoras de la inflamación en mastocitos, entre los que se encuentra TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Martin and Wallace, 2006; Wallace and Ma, 2001).

### *1.2 Generalidades de los anti inflamatorios no esteroideos*

Los anti inflamatorios no esteroideos (AINEs), son un grupo de fármacos químicamente heterogéneos pero que comparten determinados efectos terapéuticos como las acciones analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas. Las aplicaciones terapéuticas incluyen el tratamiento de patologías crónicas inflamatorias hasta el tratamiento de patologías

frecuentes como dolor dental y dolor de cabeza, constituyendo uno de los grupos de fármacos más prescritos y auto medicados en el mundo (Becker et al., 2004; Fiorucci et al., 2001). Pueden clasificarse acorde a su similitud química y según su selectividad para la isoforma de ciclooxigenasa (Brunton L.L., Chabner B.A., 2012). El mecanismo de acción general de los AINEs se genera principalmente a partir de la inhibición competitiva del sitio activo de las enzimas ciclooxigenasa COX-1 y COX-2, por lo que interfieren con la respuesta inflamatoria normal y disminuyen la producción de prostaglandinas (Praveen Rao and Knaus, 2008). En la clínica, el uso de AINEs se ha asociado con efectos adversos a nivel gastrointestinal ya que se han reportado erosiones, hemorragias e incluso ulceraciones gástricas e intestinales en el 70% de los pacientes que están bajo tratamiento con AINEs (Abimosleh et al., 2013; Babb and Alto, 1992; Becker et al., 2004).

### *1.2.1 Indometacina*

La indometacina [2-[1-(4-clorobenzoil)- 5-metoxi-2-metilindol-3-il] ácido acético] (Figura 1) es un derivado del ácido indolacético que pertenece al grupo de los AINEs no selectivos, siendo uno de los AINEs más utilizados (Brunton L.L., Chabner B.A., 2012; Burke et al., 1983; Waller, 1983). Sus concentraciones máximas en plasma se alcanzan de 1 a 2 h ( $T_{max}$ ) después de la administración oral, la unión a proteínas plasmáticas es de 90% y no tiene selectividad por un tejido particular; la concentración máxima en plasma ( $C_{max}$ ) presenta variabilidad inter e intra individual, mientras que su ventana terapéutica es considerada entre 0.3-3  $\mu\text{g/ml}$  y su toxicidad a partir de 6  $\mu\text{g/ml}$  (Mendoza Patiño, 2008; Waller, 1983) Se metaboliza en hígado a través del citocromo CYP2C, por O-desmetilación (50%), conjugación con ácido glucorónico (~10%) y N-desacilación a metabolitos inactivos; entre el 10 a 15 % de fármaco sin modificar se excreta por orina y sus metabolitos también se eliminan por bilis y heces siendo capaces de experimentar un ciclo enterohepático; la vida media ( $t_{1/2}$ ) de eliminación en plasma varía entre al menos de 4.6 h y hasta 14.4 h (Alqahtani and Kaddoumi, 2015; Brunton L.L., Chabner B.A., 2012; Chavez-Pina et al., 2009). Sus aplicaciones terapéuticas, incluyen el tratamiento de enfermedades

inflamatorias como la artritis reumatoide, osteoartritis, bursitis, tendinitis, sinovitis traumática, espondilitis anquilosante, como tratamiento para el cierre del conducto arterioso persistente en lactantes prematuros; para enfermedades osteoarticulares crónicas suelen emplearse dosis de 25 hasta 100 mg al día (Brunton L.L., Chabner B.A., 2012; Polat et al., 2011; Süleyman et al., 2002).

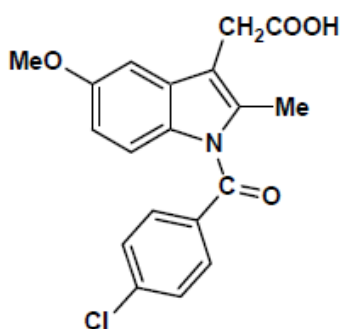


Figura 1. Estructura química de la indometacina. Fuente: (Praveen Rao and Knaus, 2008).

### *1.2.2 Mecanismo de daño gástrico e intestinal por indometacina*

La indometacina al igual que todos los AINEs, pueden alterar el equilibrio de la mucosa a través de mecanismos que se dividen en acciones locales y sistémicas (Kato et al., 2005; Wallace et al., 2000; Wallace and Granger, 1996). Los AINEs deben permanecer en el estómago por un determinado periodo de tiempo antes de que ocurra el vaciamiento gástrico (Van Den Abeele et al., 2017). Durante su estancia en el estómago, además de disminuir la capacidad amortiguadora de la barrera de mucus-biocarbonato producen un fenómeno conocido como “atrapamiento iónico”, donde la forma no ionizada del fármaco entra en las células epiteliales y una vez dentro pasa a su forma ionizada por lo que no puede atravesar la membrana nuevamente; la acumulación del fármaco dentro de la célula provoca necrosis epitelial secundaria a una lisis osmótica (Bastaki and Wallace, 1999; Boegh and Nielsen, 2015; Van Den Abeele et al., 2017). Otro de los mecanismos locales por el cual los AINEs favorecen la lesión del tejido de manera local, es mediante el desacople de la fosforilación oxidativa en mitocondria causando un decremento de ATP, generación de especies reactivas a oxígeno (ROS) y liberación de calcio mitocondrial (Ca<sup>2+</sup>)



lo que conduce a un desbalance osmótico junto con la pérdida de control sobre las uniones celulares, que finalmente da como resultado el aumento de la permeabilidad y un daño estructural celular irreversible (Bastaki and Wallace, 1999; Bhattacharya et al., 2006; Leite et al., 2001; Maity et al., 2009; Wallace and Ma, 2001). Además de lo anterior, los AINEs suprimen sistémicamente la síntesis de prostaglandinas, alterando todas las funciones protectoras orquestadas por las prostaglandinas, reduciendo la secreción de mucus y bicarbonato, que junto con la disminución del flujo sanguíneo lo que hace a la mucosa más susceptible a los agentes agresores, invasión bacteriana y actividad de endotoxinas (Bastaki and Wallace, 1999; Wallace, 2008).

Recientemente se han identificado otros mecanismos de daño gástrico generado por AINEs que son independientes a la inhibición de las prostaglandinas; entre los cuales figuran la respuesta inflamatoria desencadenada a partir de la lisis osmótica del epitelio gástrico, es decir a partir de la excreción del contenido intracelular hacia el intersticio (Bindu et al., 2013; Lanas, 2008; Wallace and Ma, 2001). El contacto del mastocito con el contenido de la célula necrosada, estimula al mastocito a liberar moléculas pro-inflamatorias como las citocinas (entre ellas TNF- $\alpha$  e Il-1 $\beta$ ) que, en conjunto con la inhibición de la actividad de COX ocasionada por la indometacina, provoca un mayor incremento en la expresión de las citocinas pro-inflamatorias; ya que aunque el mecanismo no ha sido claramente reportado, las prostaglandinas inhiben parcialmente la liberación de las citocinas, debido a que su regulación es un proceso complejo que involucra a diversas moléculas, esto por su naturaleza pleiotrópica (Atay et al., 2000; Bindu et al., 2013). La expresión de citocinas, desencadena el reclutamiento masivo de neutrófilos en un proceso de extravasación que consiste en la marginación, rodadura, adhesión, diapédesis y migración del leucocito desde el endotelio vascular hacia los tejidos y que es totalmente dependiente de la expresión de moléculas de adhesión de alta afinidad como ICAM-1, VCAM-1 en el endotelio e integrinas CD11/CD18 en neutrófilo (Cruvinel et al., 2010; Laine et al., 2008; Matsui et al., 2011; Uchida et al., 2001; Wallace, 2008). Una vez que el neutrófilo llega al sitio de lesión libera leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) que

funciona como un quimioatrayente para reclutar más neutrófilos, al permitir aún más la expresión de moléculas de adhesión celular que facilita a los leucocitos adherirse a la pared del vaso; los neutrófilos en conjunto, disminuyen la perfusión vascular provocando isquemia en el tejido, además liberan proteasas, especies reactivas de oxígeno y permiten la liberación de óxido nítrico mediado por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), este óxido nítrico reacciona con los aniones superóxido producido también por neutrófilos, formando peroxinitrito que provoca mayor necrosis epitelial (Cruvinel et al., 2010; Imaoka et al., 2010; Lanas, 2008; Matsui et al., 2011; Uchida et al., 2001; Wallace, 2008).

Aunque la fisiopatología del daño intestinal generado por indometacina es menos comprendida, comparte similitudes con la gastropatía por AINEs; ya que se han propuesto diversos mecanismos por los cuales se genera este daño: daño mitocondrial por contacto directo, aumento de la permeabilidad celular, disminución de prostaglandinas y finalmente respuesta inflamatoria exacerbada (Matsui et al., 2011; Wallace, 2013). Al ser ingerida, la indometacina es absorbida en estómago y posteriormente metabolizada en hígado, una pequeña fracción se excreta por bilis hacia duodeno en forma conjugada con ácido glucorónico y después de la acción de la deshidrogenasa se hidroliza quedando en su forma libre y puede ser reabsorbida en la luz intestinal (Figura 4); diversos factores luminales como son bilis, enzimas proteolíticas, jugo pancreático, microbiota intestinal, así como la indometacina excretada están en contacto directo con el enterocito constantemente; en este lugar la indometacina nuevamente como metabolito activo llega a formar aductos con las macromoléculas de los enterocitos e introducirse en los mismos, contribuyendo al incremento de la permeabilidad membranal, perjudicando la función mitocondrial y originando un daño al epitelio intestinal que activa el mecanismo generador de proteasas con lo que incrementa la peroxidación lipídica (Abimosleh et al., 2013; Atchison et al., 2000; LoGuidice et al., 2010; Matsui et al., 2011; Wallace, 2013).

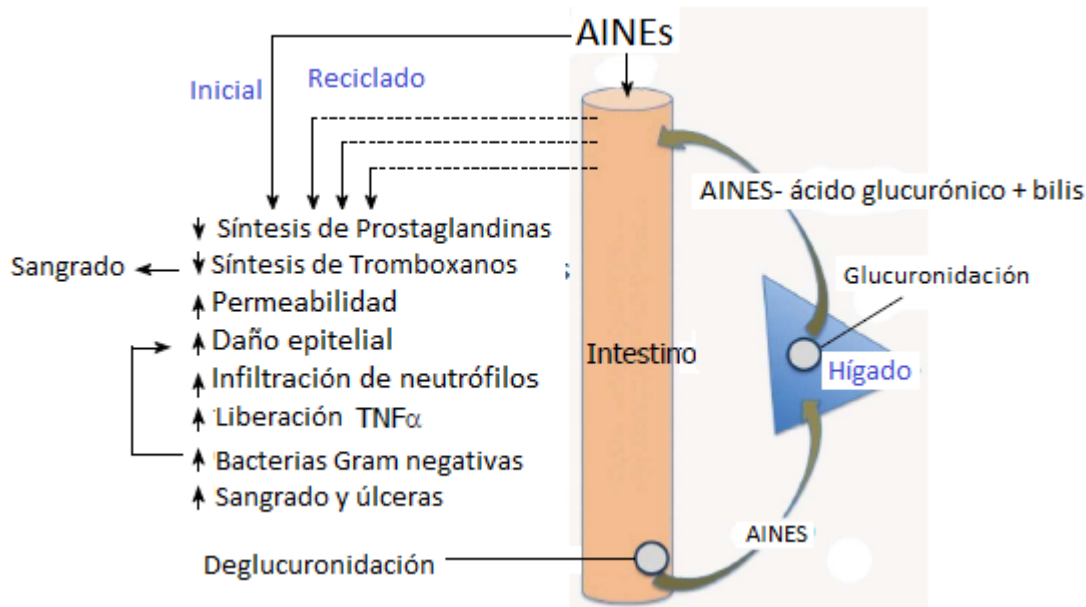


Figura 2. Enteropatía por AINEs. Fuente:(Wallace, 2013).

#### 1.2.4 Moléculas implicadas en el daño gástrico generado por AINEs

Como se ha mencionado anteriormente, existen diversas moléculas implicadas en el daño gástrico generado por AINEs, cada una posee características particulares que son importantes de revisar, siendo MPO, LTB<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$  e ICAM-1 las que generan mayor interés en nuestra investigación.

##### 1.2.4.1 Mieloperoxidasa (MPO)

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima producida por macrófagos residentes en mucosas, monocitos y principalmente neutrófilos; es una molécula de 150-165 kDa que se sintetiza durante la diferenciación mieloide inducida por el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (Kisic et al., 2016; Strzepa et al., 2017). La enzima es un homodímero que comprende un par de cadenas ligeras y pesadas, donde sus subunidades están unidas por un solo puente disulfuro (Strzepa et al., 2017). Es almacenada en los gránulos azurofílicos junto con otras proteínas como hidrolasas y proteasas; utiliza al

peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) para producir ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), que sirve como microbicida y desempeña un papel importante en la respuesta inmune innata (Kisic et al., 2016). Sin embargo, este agente altamente citotóxico puede dañar el tejido, iniciar y contribuir al desarrollo del estrés oxidativo, así como prolongar la respuesta inflamatoria (Hansberry et al., 2017; Strzepa et al., 2017).

En el daño gastrointestinal generado por AINEs, se ha reportado que la infiltración de neutrófilos es acompañada por un incremento de los niveles de MPO (Jung et al., 2012; Yan et al., 2011); donde tiene la capacidad de estimular la producción de citocinas proinflamatorias como  $TNF-\alpha$  y por lo tanto regular de manera indirecta la respuesta inflamatoria (Bindu et al., 2013; Strzepa et al., 2017). Además, se ha reportado que el MPO junto con las proteasas presentes en los gránulos azurofílicos, destruyen el tejido subyacente, pero además su presencia o ausencia es un indicativo de la cantidad de neutrófilos presentes, estimulando de manera indirecta la fagocitosis de cuerpos apoptóticos (Martin and Wallace, 2006; Serhan et al., 2007; Strzepa et al., 2017).

#### *1.2.4.2 Leucotrieno $B_4$ ( $LTB_4$ )*

El leucotrieno  $B_4$  ( $LTB_4$ ) es un eicosanoide que forma parte de la familia de los leucotrienos; es un mediador pro inflamatorio de naturaleza lipídica, producto de la acción de la lipooxigenasa 5 (5-LO) sobre el ácido araquidónico (Atay et al., 2000; Ohnishi et al., 2008). El  $LTB_4$  se genera en polimorfonucleares, eosinófilos, macrófagos, células epiteliales y endoteliales, actuando a través de receptores de alta afinidad como el BLT1 en dichas células (Monteiro et al., 2011).

En la mucosa gástrica, se ha reportado que estimulan la secreción de pepsina, reducen el flujo sanguíneo e interfieren con el vaciamiento gástrico (Atay et al., 2000). En el daño gástrico generado por indometacina, la expresión de  $LTB_4$  aumenta y estimula la síntesis de enzimas pro-inflamatorias como  $TNF-\alpha$  e  $IFN-\gamma$ ; también permite la expresión de moléculas como las integrinas  $\beta_2$  (CD11/ CD18) y moléculas de adhesión intercelular como ICAM-1, contribuyendo a la reducción del flujo sanguíneo hacia la mucosa y además,

participan en la generación de otras moléculas que alteran al endotelio vascular y a la mucosa gástrica como las especies reactivas a oxígeno (ROS)(Davies et al., 1999). Por lo anterior, el exceso de LTB<sub>4</sub> combinado con el déficit de PGE<sub>2</sub> contribuye a la lesión gástrica ya provocada por los AINEs (Atay et al., 2000; Davies and Wallace, 1997; Wallace and Ma, 2001).

#### *1.2.4.3 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )*

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es una hormona polipeptídica, perteneciente a la súper familia de mediadores que llevan su nombre (Camussi et al., 1991). Siendo una glicoproteína que se produce *de novo* en el momento de la activación celular, sintetizada como un propéptido (de 233 aa y 26 kDa), el cual es procesado por la enzima convertidora del TNF- $\alpha$  (TACE) a la forma soluble de TNF- $\alpha$  (de 157 aa y 17 kDa) con actividad biológica (Camussi et al., 1991; Parameswaran and Patial, 2010).

En el daño gástrico generado por AINEs, se produce un incremento en la adherencia de leucocitos al endotelio vascular, por un proceso definido como “activación endotelial”; en donde el TNF- $\alpha$ , a través de su receptores TNFR1 (p55 ó p60) hace que las células endoteliales generen proteínas que reorganizan estructuralmente a la célula y facilitan la expresión de moléculas de adhesión endoteliales como ICAM-1, esto último mediante su capacidad de activación del NF $\kappa$ B (Appleyard et al., 1996; Bonizzi and Karin, 2004). En la inflamación, TNF- $\alpha$  es quimiotáctico para los monocitos y polimorfonucleares, estimulando la actividad fagocítica, la adhesión al endotelio y la producción de especies reactivas de oxígeno en estas células (Appleyard et al., 1996).

#### *1.2.4.4 Molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1)*

La molécula de adhesión intracelular I (ICAM-1) o clúster de diferenciación 54 (CD54), forma parte de la familia de las proteínas de superficie celular tipo inmunoglobulina (Ig-like); es una proteína transmembranal tipo I con un peso molecular de 80 - 114 kDa en su forma glicosilada y de 60 kDa en su forma no glicosilada (Lawson and Wolf, 2009).

Se ha reportado que después de la administración de indometacina se incrementa la expresión de ICAM-1, en consecuencia a alta concentración de TNF- $\alpha$  ocasionado por el daño generado por la indometacina en la mucosa gástrica (Yan et al., 2011). El incremento en la expresión de ICAM-1, permite la infiltración de neutrófilos como primer paso en el proceso inflamatorio desencadenado por el daño a la mucosa gastrointestinal generado por la indometacina, y que a su vez puede generar la disminución de la perfusión tisular por el incremento de neutrófilos adheridos al endotelio vascular, dañando aún más el tejido por la reducción de oxígeno (Lawson and Wolf, 2009; Rabelo-Gonçalves et al., 2005).

#### *1.2.4.5 Interleucina 1- beta (Il-1 $\beta$ )*

La interleucina 1- beta (Il-1 $\beta$ ) forma parte de la familia de mediadores más importantes en la inflamación; siendo una molécula de origen proteico producida principalmente por monocitos, macrófagos y células dendríticas, aunque también bajo ciertos estímulos por células endoteliales y fibroblastos (Eder, 2009; Gyenge et al., 2013). La Il-1 $\beta$  se produce a partir de estímulos como los lipopolisacáridos (LPS) de microorganismos, que son reconocidos a través de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y proteínas que son reconocidas por patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Eder, 2009). Tanto los PAMPs como los DAMPs, permiten la activación de los receptores de membrana tipo toll (TLRs) que desencadenan la síntesis del pro péptido de Il-1 $\beta$  (31 kDa) localizado en vesículas secretoras (Eder, 2009). Este pro péptido gracias a la acción de la enzima convertidora de interleucina 1 (ICE), es procesado en el residuo 116 y se convierte en una molécula Il-1 $\beta$  activa (de 269 aa y 17.5 kDa) que es llevada hacia el exterior de las células por medio de exocitosis, no hallándose en la circulación general excepto en casos de patología severa (Eder, 2009; Lopez-Castejon and Brough, 2011a; Martinon et al., 2002).

Il-1 $\beta$  es una citocina que posee funciones reguladoras de la actividad inmunológica, por lo que tiene la capacidad de actuar en diversos tejidos; entre ellas la inducción de fiebre,

proliferación, maduración de linfocitos y fibroblastos, así como el aumento del catabolismo muscular (Eder, 2009; Sahoo et al., 2011). En la gastropatía por AINEs, se ha reportado que participa mediante el reclutamiento de neutrófilos, activación de moléculas de adhesión, así como la inducción y regulación de otras citocinas; sin embargo, también es un potente inhibidor de la secreción de HCl y paradójicamente puede ser capaz de inducir la expresión de COX-2 e iNOs, generando cierto grado de resistencia a las lesiones, por lo que su papel en el daño gástrico aun no es comprendido del todo (Gyenge et al., 2013).

### *1.3 Alternativas terapéuticas para reducir el daño gástrico generado por AINEs*

Todos los AINEs disponibles en el mercado, están asociados con efectos secundarios potenciales particularmente a nivel cardiovascular y gastrointestinal (Becker et al., 2004; Szura and Pasternak, 2014). Hasta el momento, las estrategias disponibles en el mercado para reducir el daño gástrico incluyen la terapia conjunta con fármacos de diversa naturaleza y mecanismos de acción (Ueda et al., 2015); dichas estrategias se enfocan en el uso de inhibidores selectivos de la COX, la supresión de ácido clorhídrico (Latimer et al., 2009), la sustitución de las prostaglandinas con análogos (Nordgren et al., 2014) y finalmente el uso de combinaciones entre AINEs con otras moléculas gastroprotectoras (Wallace, 2007).

Hace más de una década, se diseñaron los AINEs selectivos para la COX-2 (Coxibs), con la finalidad continuar con la terapéutica antiinflamatoria por AINEs sin los efectos adversos a nivel gastrointestinal (Süleyman et al., 2007; Watson et al., 2000). En su aplicación clínica, aunque lograron una reducción del daño gástrico; se reportó en los pacientes que los consumían de manera crónica, efectos tales como tromboembolias e infarto al miocardio, lo que obligó a retirar del mercado a rofecoxib en 2004 e incluso a recomendar discreción en el uso de otros AINE solos o en conjunto con antiagregantes plaquetarios (Fosbøl et al., 2010; Lazzaroni and Bianchi Porro, 2004; Watson et al., 2000). Por lo que el uso de los

coxibs no logró ser una estrategia óptima para reducir el daño gástrico generado por AINEs (Fosbøl et al., 2010; Watson et al., 2000).

Las estrategias para reducir el daño gástrico más utilizadas en la actualidad, incluyen la coterapia con otro tipo de fármacos como los supresores de la secreción de ácido clorhídrico (Nordgren et al., 2014). Entre ellos los antagonistas de receptores de histamina tipo  $H_2$ , que inhiben de manera competitiva la unión de histamina con los receptores de histamina  $H_2$  de la célula parietal logrando suprimir la secreción de HCl, sin embargo incrementan el riesgo de sangrados gástricos, ya que suelen enmascarar los síntomas de alarma (vómitos, dolor estomacal o dolor de cabeza), por lo que ha comenzado a disminuir su uso (Becker et al., 2004). El otro grupo de fármacos empleados en la coterapia para el daño gástrico generado por AINEs son los inhibidores de la bomba de protones ( $H^+/K^+$  -ATPasa) cuyo mecanismo de acción consiste en formar una unión covalente con la subunidad alfa de la  $H^+/K^+$  -ATPasa, inhibiendo la actividad de esta última de forma irreversible; estos fármacos reducen el daño gástrico en combinación con AINEs tradicionales, pero una de sus desventajas es el alto impacto económico en los pacientes, ya que tendrán que sostener un tratamiento de hasta 8 semanas en promedio para disminuir la lesión (Abramson and Weaver, 2005; Biswas et al., 2003; Latimer et al., 2009). Además, se ha reportado que el uso prolongado de omeprazol está asociado a la posibilidad de efectos adversos tales como fracturas de cadera, deficiencia de hierro y cobalamina; así como un incremento en la microbiota intestinal patógena, fenómeno conocido como disbiosis intestinal, dicho evento incrementa el riesgo de sufrir úlceras y perforaciones intestinales (Thomson et al., 2010; Wallace et al., 2011a).

Entre las terapias para disminuir el daño gástrico generado por AINEs empleadas en menor frecuencia o bajo circunstancias especiales, se encuentra el uso del misoprostol, un análogo de la prostaglandina que se utiliza para sustituir localmente las prostaglandinas inhibidas por AINEs y que en la clínica logra una reducción efectiva del daño gástrico; desafortunadamente sus efectos secundarios como diarrea frecuente, dolor abdominal constante y ser un potente abortivo limitan su uso, por lo que rara vez son prescritos



(Becker et al., 2004; Cavallini et al., 2006). Finalmente, en cuanto a los AINEs tradicionales como la aspirina, se han sintetizado fármacos como aspirina liberadora de óxido nítrico (NO-AINE) y sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S-AINE) que han reportado una disminución del daño gástrico; esta clase de fármacos aún se encuentran en fase de investigación clínica tempranas por lo que sus efectos secundarios no han sido definidos (Wallace, 2007).

#### 1.4 Ácido docosahexaenoico (DHA)

Recientemente se ha mostrado predilección por el empleo de terapias con productos de origen natural; como es el caso del aceite de pescado que es rico en ácidos grasos omega-3 (PUFA n-3, por sus siglas en inglés)(Pineda-Peña et al., 2012); los cuales son importantes para la estructura de membrana celular, absorción de vitaminas, regulación del metabolismo y múltiples procesos celulares (Connor, 2000; Hashimoto et al., 2016; Kantha, 1987). Entre los principales componentes del aceite de pescado se encuentran el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (Kantha, 1987; Serhan, 2006), a los cuales se les atribuye la mayoría de sus propiedades terapéuticas (Calder, 2009; Hashimoto et al., 2016). En cuanto al ácido docosahexaenoico, este está formado por 22 carbonos y 6 dobles enlaces (Figura 4), y es un ácido graso poliinsaturado omega-3 (PUFA n-3). En los seres humanos el DHA no puede sintetizarse *de novo* (al carecer de  $\Delta 12$ - y  $\Delta 15$ -desaturasas), obteniéndose directamente del consumo de alimentos ricos en ácidos grasos esenciales como son el aceite de pescado cuya composición de DHA varía entre un 6 a 12 % dependiendo de su origen, pero también lo podemos encontrar en las semillas de girasol, cártamo, calabaza, sésamo, maíz, soja, haba, nuez, linaza, germen de trigo en rangos de 7 a 20 % en forma de precursores (Applegate and Glomset, 1986; Holub, 2002; Pineda-Peña et al., 2012; Sargent, 1997). En la actualidad, el DHA es utilizado como un suplemento nutricional en diversas formulaciones que contienen aceite de pescado (Holub, 2002; Tvrzicka et al., 2011); donde la composición de DHA en cada formulación y las recomendaciones individuales de cada estudio clínico realizado, hace difícil establecer un consenso global en las dosis mínimas y máximas recomendadas para su consumo

(Simopoulos, 2002). Hasta el momento, la dosis recomendada de DHA para disminuir el riesgo de diversas patologías en un adulto, es de al menos 200 mg al día solo y de 200 a 500 mg al día en combinación con otros omega-3 (equivalente a 3-5 porciones de pescado a la semana)(Bradbury, 2011; Intake, 2014; Tvrzicka et al., 2011).

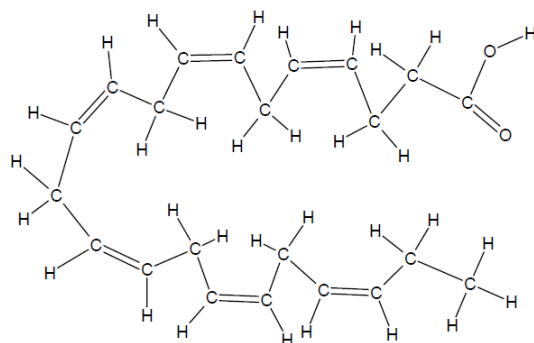


Figura 3. Estructura química del ácido docosahexaenoico. Fuente:(Holub, 2002).

Se ha reportado el papel esencial del DHA para el desarrollo de la sinaptogénesis en el sistema nervioso central (SNC) de los seres humanos, ya que puede encontrarse en los aminofosfolípidos fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS) de las membranas neuronales y los foto receptores; surgiendo la importancia del consumo de DHA preformado en la dieta para el mantenimiento de concentraciones adecuadas de DHA en los tejidos (Lukiw and Bazan, 2008; Yadav et al., 2012). Se han documentado extensamente los beneficios de sus propiedades antiaterogénicas y antitrombóticas pero principalmente su papel como cardioprotector y neuroprotector, especialmente por disminuir el estrés oxidativo al que está sometido la célula; también recientemente se comenzó a estudiar su participación en la inflamación y el dolor (Mayurasakorn et al., 2011a; Nakamoto et al., 2010; Nowak, 2013; Picq et al., 2010; Pineda-Peña et al., 2012). Adicionalmente, se ha documentado que el consumo PUFA n-3 ejerce efectos en la resolución de la respuesta inflamatoria; debido a un mecanismo que involucra la competencia del DHA con el ácido araquidónico por las enzimas omega oxidasas del citocromo P450 (CYP) específicamente por la CYP4F2, reemplazando al ácido araquidónico en las vías de lipooxigenasa (LOX) o ciclooxigenasa (COX) particularmente COX-2, lo que resulta en el bloqueo de la producción de los eicosanoides inflamatorios y recientemente se reporta la participación de

mediadores derivados del DHA en la resolución del proceso inflamatorio conocidos como resolvinas, protectinas y maresinas (Dalli and Serhan, 2016; Morisseau et al., 2010; Nauroth et al., 2010; Zhang et al., 2013).

Con respecto a su papel en la gastroprotección, autores como Bhattacharya en 2006, Al-Harbi en 1995, Manjari y Das en 2000 mencionan los beneficios de la administración crónica de aceite de pescado en diversos modelos de daño gástrico, debido a que es rico en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (Al-Harbi et al., 1995; Bhattacharya et al., 2006; Faust et al., 1989; Manjari and Das, 2000). Sin embargo, no se había podido determinar cuál de todos los ácidos grasos poliinsaturados es el responsable del efecto gastroprotector y de manera general autores como Faust et al., en 1989 proponen como mecanismo gastroprotector la modulación de prostanooides y otras moléculas implicadas en el proceso de inflamación del tejido gástrico (Faust et al., 1989). Recientemente nuestro equipo de trabajo demostró que la administración única de DHA como compuesto puro, presenta un efecto gastroprotector ante el daño generado por la indometacina; además de que produce una disminución en LTB<sub>4</sub> y el TNF- $\alpha$ ; por ello, se postula la modulación de dichas moléculas como el posible mecanismo por el cual el DHA ejerce su efecto gastroprotector (Pineda-Peña et al., 2012).

#### *1.4.1 Resolvinas derivadas del ácido docosahexaenoico (RvD) y sus receptores*

El análisis lipidómico de exudados en fase resolutive de algunos modelos de inflamación, reportaron la presencia de compuestos denominados resolvinas, entre los que se encuentran las resolvinas de la serie D (RvD) (Serhan, 2006; Serhan et al., 2007). La biosíntesis de resolvinas se lleva a cabo a partir del DHA presente en la membrana fosfolipídica, por acción de las enzimas Lipoxigenasas LO-15 y LO-5 presente en polimorfonucleares donde puede ser convertido al menos 5 tipos diferentes de resolvinas (RvD1, RvD2, RvD3, RvD4 y RvD5) (Serhan et al., 2007). Al respecto, las resolvinas son mediadores de carácter lipídico que se han reportado como los responsables de limitar la infiltración de polimorfonucleares en modelos de inflamación y estimular a macrófagos

para efectuar la fagocitosis, que contribuye activamente en la remoción de restos celulares y polimorfonucleares apoptóticos (Seki et al., 2010; Spite et al., 2009).

Hasta el momento se han identificado dos receptores para resolvina D1, el GPR32 en seres humanos y el otro denominado ALX, un receptor también identificado para la lipoxina A<sub>4</sub> que además de mediar la adherencia del leucocito al endotelio, se encuentra involucrado en la actividad fagocítica del macrófago (Krishnamoorthy et al., 2010; Weylandt et al., 2012). Aunque también se ha reportado la interacción de DHA y RvD1 con los receptores GPR40 (FFAR 1) y GPR120 (FFAR 4) en modelos de nocicepción, así como en ensayos de interacción celular donde participan en procesos anti-inflamatorios a través de los mecanismos mediados por macrófagos (Nakamoto et al., 2010; Norling et al., 2012; Oh and Olefsky, 2012). Los receptores identificados o aquellos en donde se ha reportado la interacción con RvD1, son receptores acoplados a proteína G (GPCRs) que forman parte de una extensa familia de receptores que comparten características estructurales en común (Oh and Olefsky, 2012). Estructuralmente, los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) se componen de una cadena polipeptídica sencilla de longitud variable que posee siete regiones transmembranales formadas por hélices  $\alpha$  sencillas, tres asas extracelulares (ECL1-3) y tres asas intracelulares (ICL1-3) (Lu and Wu, 2016). La región extracelular suele especializarse en los dominios de unión a ligando, mientras que la región intracelular se encuentra estrechamente relacionada con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$  de la proteína G (Gurevich et al., 2012). Entre las principales funciones de las proteínas G, se encuentra su capacidad de activar la producción de segundos mensajeros que actúan como moléculas de señalización hacia los efectores citoplasmáticos, que finalmente llevan a cabo las acciones celulares (Heifetz et al., 2016).

En cuanto a GPR32, este ha sido plenamente identificado en humano con un peso de 40 kDa (356 aa), pero su contraparte en rata permanece desconocido, se reporta que incrementa su expresión en monocitos en presencia de zymozan en modelos de inflamación in vitro, así como su participación en la inhibición de infiltración de polimorfonucleares mediada por RvD1 y de la estimación de fagocitosis en macrófagos (Krishnamoorthy et al., 2010; Norling et al., 2012). Mientras que el receptor GPR40

actualmente conocido como receptor de ácidos grasos libres 1 (FFAR 1), de 31.4 kDa se encuentra distribuido en células  $\beta$  del páncreas donde al unirse a ácidos grasos libres promueve la liberación de insulina y en sistema nervioso donde se ha demostrado que media el efecto antinociceptivo de RvD1 a través de la liberación de  $\beta$ -endorfina (Briscoe et al., 2003; Moberaten et al., 2013; Nishinaka et al., 2013). Finalmente, el receptor GRP120 (FFAR 4) de 40.9 kDa, se ha descrito en diversos tejidos incluyendo epitelio intestinal, tejido adiposo, y macrófagos; se activa por ácidos grasos libres (FFA) y se ha reportado que inhibe la activación de NF $\kappa$ B en células Caco-2, presentando acción anti-inflamatoria al inhibir a TNF- $\alpha$  o previniendo la activación de IKK en macrófagos (Moberaten et al., 2013; Nakamoto et al., 2012; Oh and Olefsky, 2012). Hasta el momento no se han identificado completamente las vías de señalización mediante las cuales dichos receptores llevan a cabo sus acciones, ya que los diferentes estudios in vitro se han centrado en la expresión de los receptores en ciertos tejidos y su acción específica en los mismos, por lo que una generalización de sus mecanismos resultaría muy prematura (Moniri, 2016).

## 2. ANTECEDENTES

El daño gástrico generado por AINEs, ha sido extensamente documentado; por lo que ya está establecido el potencial ulcerogénico de la indometacina (Bjarnason et al., 1986; Suwa et al., 1987; Wallace and McKnight, 1993). Diversos estudios en modelos murinos de daño gastrointestinal por indometacina, han reportado el incremento en la producción de  $LTB_4$  (Asako et al., 1992; Mion et al., 1994), ICAM-1 (Okada et al., 1998; Wallace and McKnight, 1993),  $TNF-\alpha$  (Appleyard et al., 1996; Zhang et al., 2008), así como la infiltración de neutrófilos (Asako et al., 1992). Consideramos importante mencionar el estudio reciente de Bindu et al., 2013 donde se reporta la participación de  $NF\kappa\beta$  en el daño gástrico generado por la administración de 48 mg/kg de indometacina en ratas, así como un incremento en el estrés oxidativo de la célula y de la actividad de  $NF\kappa\beta$  (Bindu et al., 2013).

En las últimas décadas los estudios sobre la administración crónica de aceite de pescado, como el de Al-Harbi et al., 1995 reportan que la administración de aceite de pescado (5 y 10 mg/kg, p.o.) redujo el daño gástrico generado por aspirina (200mg/kg, p.o.) e indometacina (300 mg/kg, p.o.) en ratas Wistar. Mientras que Ghosh et al., 2013 reporta que la administración de 1.5 g diarios aceite de pescado puede atenuar el daño ante la colitis severa en ratas con alta ingesta de ácidos grasos omega 6, aunque no tenía efecto alguno en modelos de sepsis. También Bhattacharya et al., 2006 reporta que el aceite de pescado (50, 100 y 200 mg/kg, p.o.) durante 5 días protegían la mucosa gástrica del daño por aspirina (200 mg/kg) en ratas Wistar; Hudert et al., 2006 demuestra que una dieta rica en ácidos grasos omega 3 en ratones transgénicos disminuye los niveles de ciertos mediadores inflamatorios como  $LTB_4$ ,  $IL-1\beta$  y  $TNF-\alpha$  así como la actividad de  $NF\kappa B$  incluso en la sobreexpresión de genes relacionados con colitis. Finalmente Bhattacharya et al., 2007 identifica que una dieta enriquecida con un 90% de aceite de pescado (con un alto ratio de DHA) durante 8 semanas logra reducir los niveles de  $TNF-\alpha$  en ratones C57BL/6,

por lo que evidencian las propiedades citoprotectoras de los ácidos grasos omega-3 en el tracto gastrointestinal.

En la actualidad se reconocen las propiedades citoprotectoras del DHA; los antecedentes que reportan el papel del DHA en modelos inflamatorios asociados a la mucosa gastrointestinal son escasos, por ejemplo Camuesco et al., 2006 señala que una dieta rica en DHA (3.7-1.8 %) disminuye a LTB<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$  y MPO en un modelo de colitis en ratas. Sin embargo, en cuanto a modelos inflamatorios tenemos el estudio reportado por Raederstorff et al., 1996 que reporta que una dieta rica en DHA (1%) durante 6 semanas disminuye los niveles locales de MPO y LTB<sub>4</sub> en la inflamación aguda inducida por éster de forbol (TPA) en la oreja de ratones; mientras que Honda et al., 2015 describe la disminución de los niveles de TNF- $\alpha$  en macrófagos murinos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) que fueron tratados con DHA. Recientemente Allam-Ndoul et al., 2016 reportó que el DHA tiene la capacidad de inhibir la expresión del gen de NF- $\kappa$ B en un modelo de macrófagos THP-1. Cabe mencionar que en la actualidad los potenciales mecanismos para los efectos del DHA son atribuidos a las resolvinas.

En cuanto a las resolvinas, si bien hasta la fecha se ha reportado su papel en la protección del sistema nervioso central (Calder, 2012), debemos considerar los antecedentes relacionados con la modulación del proceso inflamatorio. Serhan et al., 2002, reportan haber logrado la síntesis de los mediadores pro-resolutivos que habían sido identificados en exudados inflamatorios a los cuales denominan resolvinas, y que pueden ser derivados del ácido docosahexaenoico. Así mismo, Hudert et al., 2006 identifican resolvinas en las muestras de tejido obtenidas de colon de ratones transgénicos con colitis con una dieta rica en ácidos grasos omega-3 (Hudert et al., 2006). El estudio realizado por Sun et al., 2007 reporta que la administración intravenosa de resolvina D1 a dosis de 100  $\mu$ g reduce la infiltración de polimorfonucleados en un 35% comparados con su control, en un modelo de inducción de inflamación y activación de leucocitos con zymosan A. Spite et al., 2009 indica que ratones con peritonitis, inducida por punción cecal, la administración intraperitoneal de resolvina D1 (100  $\mu$ g) disminuye la interacción de leucocitos con el

endotelio, esto por la modulación directa de los receptores de moléculas de adhesión en los neutrófilos, así como participa en la disminución del estrés oxidativo de las células intestinales.

Recientemente se han reportado algunos estudios que relacionan al DHA o a las resolvinas (Rvs) con los receptores de ácidos grasos libres (FFAR). Por ejemplo Krishnamoorthy et al., 2010 demuestran la interacción de RvD1 con los receptores acoplados a proteína G denominados AXL y GPR32, los cuales disminuyen la polimerización de actina, la infiltración de polimorfonucleares y estimulan la fagocitosis en macrófagos; además reporta que RvD1 también disminuye la actividad de NFκB estimulada por TNF-α, todo esto en polimorfonucleares humanos. Nakamoto et al., 2012 reportan que el efecto antinociceptivo del DHA, está mediado por la activación de los receptores acoplados a proteína G denominados GRP40 (FFAR 1) y GRP120 (FFAR 4), encontrando que este último se expresa también en intestino. Mientras que Zhao et al., 2017 evalúa en un modelo de colitis con ratones knock out para IL-10, el pre-tratamiento con DHA (5.5mg/kg al día), este promueve la expresión de GPR120 (FFAR 4) y probablemente moléculas implicadas en la regulación de NFκB.

Hasta el momento el antecedente directo a este proyecto, es la investigación realizada por nuestro equipo de trabajo, en el que se demostró que la administración de DHA disminuye el área de lesiones (mm<sup>2</sup>) generada por la administración de 30 mg/ kg de indometacina, con un efecto dosis dependiente. Donde se demostró que el DHA mantiene los niveles basales de LTB<sub>4</sub>, así como la expresión de TNF-α en el tejido gástrico (Pineda-Peña et al., 2012). Recientemente el estudio de Han et al., 2016, reporta que otro ácido graso omega 3, el ácido eicosapentaenoico (EPA), presenta un efecto gastro y enteroprotector ante el daño por indometacina en un modelo de ratones transgénicos *fat-1*, asociando dicho efecto a la posible activación del receptor de ácidos grasos 4 (FFAR 4) (GPR120). Sin embargo no existen más antecedentes que asocien directamente el efecto gastroprotector del DHA con algún mecanismo específico ni se ha identificado el efecto enteroprotector del mismo.



### 3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

La toxicidad gastrointestinal asociada con los fármacos anti inflamatorios no esteroideos continua siendo un problema médico y socioeconómico importante a pesar de los recientes avances farmacéuticos; por lo que se le considera una "epidemia silenciosa" y, por lo tanto, se enfatiza la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la tolerabilidad de los AINEs, especialmente porque son los medicamentos más prescritos en el mundo ya que constituyen la principal terapia en las condiciones crónicas caracterizadas por inflamación y dolor (Abramson and Weaver, 2005; Wallace, 2013). Se ha demostrado que el consumo crónico de AINEs es una de las principales causas de lesiones gastrointestinales, entre ellas las úlceras caracterizadas por inflamación y sangrado en los pacientes no tratados, desarrollando a la larga complicaciones como atrofia e incluso cáncer gástrico (Davies and Wallace, 1997). En México, las úlceras gástricas y duodenales se reportan semanalmente en el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) con la clave CIE 10 K25-K29, ocupando el cuarto lugar dentro de las veinte principales causas de enfermedad durante el 2015 y ubicándose entre las 20 primeras causas de mortalidad en la población en los últimos 5 años (Dirección General de Epidemiología, 2015).

Ha sido bien establecido que los AINEs bloquean las ciclooxigenasas que intervienen en la respuesta inflamatoria normal y por lo tanto, bloquean la producción local de prostaglandinas, asociándose con incremento en la permeabilidad de ácido y pepsina en la mucosa originando erosiones y úlceras gástricas (Bastaki and Wallace, 1999). La mayoría de los AINEs disponibles en el mercado no son selectivos, por ello los enfoques terapéuticos para reducir los efectos gastrointestinales asociados a los AINEs están dirigidos a un cotratamiento, ya sea con inhibidores de la bomba de protones, agonistas de receptores de histamina H<sub>2</sub> y antiácidos junto con la implementación de medidas higiénico dietéticas; sin embargo, no se ha alcanzado una reducción en la incidencia de

estos casos. Además, el daño en la mucosa gastrointestinal generado por AINEs involucra la lesión del tejido *per se* e implica a una serie de mecanismo y moléculas implicados en la inflamación; por otra parte, se ha reportado recientemente la citoprotección que ofrecen los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (PUFA) en diversos tejidos, siendo particularmente de interés el ácido docosahexaenoico (DHA), del cual diversos estudios destacan sus efectos citoprotectores en sistema nervioso y recientemente la participación de resolvinas derivadas del mismo (RvDs). Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado el efecto enteroprotector del DHA en modelos de daño gastrointestinal, ni tampoco las moléculas o mecanismos por los cuales podría llevar a cabo este efecto por lo que consideramos importante determinar experimentalmente una posible vía implicada.

## **4. HIPÓTESIS**

El DHA (ácido docosahexaenoico) podría generar un efecto gastro y entero protector en el daño gastrointestinal inducido por indometacina en un modelo murino, probablemente a través de la modulación de algunas moléculas como MPO, LTB<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$ , ICAM-1, RvD1 y receptores para lípidos.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluación de los mecanismos y moléculas implicados en el efecto gastro y entero protector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gastrointestinal inducido por indometacina en un modelo murino.

## **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar el efecto gastro y entero protector del DHA en el daño gastrointestinal generado por indometacina en un modelo murino.
2. Valorar la infiltración de leucocitos después de la administración de DHA en el daño gastrointestinal generado por indometacina.
3. Determinar la participación de TNF-  $\alpha$  en tejido gástrico e intestinal y evaluar la translocación nuclear de NF $\kappa$ B en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gastrointestinal generado por indometacina.
4. Cuantificar los niveles de RvD1 en el tejido gástrico e intestinal y cuantificar los niveles de ICAM-1 e Il-1 $\beta$  en tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gástrico e intestinal generado por indometacina.
5. Identificar la expresión de los posibles receptores de membrana implicados en el efecto gastro protector del DHA en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gástrico generado por indometacina.

## 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir nuestros objetivos se ha desarrollado la siguiente metodología general (Diagrama 1): primero a través de la administración de DHA en el modelo de daño gastrointestinal inducido por indometacina en el modelo murino evaluamos el efecto gastro y entero protector del DHA, de donde se obtuvieron muestras de tejido. Posteriormente se les cuantificó los niveles de MPO, y por medio del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) los niveles de LTB<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$  y RvD1; se realizaron cortes histológicos a nivel gástrico e intestinal. Además, se cuantificaron los niveles Il-1 $\beta$ , ICAM-1 y la evaluación de la translocación nuclear de NF $\kappa$  $\beta$  a nivel gástrico. Finalmente se determinó la expresión de los posibles receptores implicados en el efecto gastroprotector del DHA como podrían ser los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) GPR40 (FFAR 1) y GPR120 a través de la técnica de Western blot en tejido gástrico para finalmente realizar un análisis, presentación y discusión de resultados que nos permitan la elaboración de conclusiones.

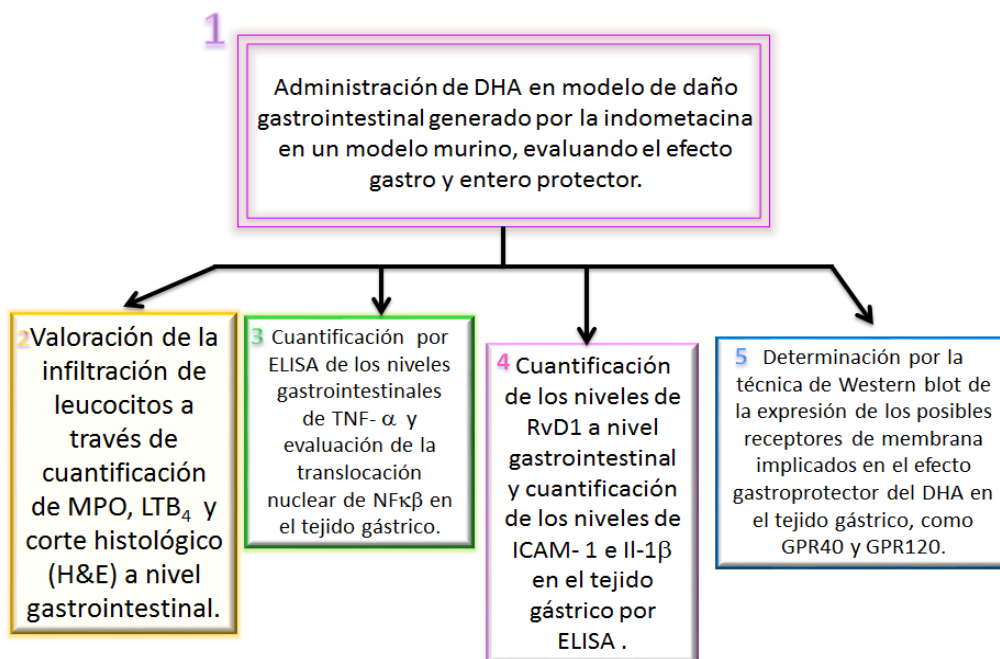


Diagrama 1. Estrategia metodológica general

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Fármacos y Reactivos

Todos los reactivos y fármacos fueron preparados momentos previos a su uso; la indometacina fue disuelta en NaHCO<sub>3</sub> al 5%, el omeprazol y pentoxifilina fueron disueltos en NaCl 0.9 % y se utilizó aceite de oliva como vehículo para el ácido docosahexaenoico. Indometacina (I7378), omeprazol (O104), ácido docosahexaenoico (D2534), ácido etildiaminotetraacético [EDTA] (E6758), acetato de sodio (S2889), ácido N-(2-hidroxi)etil piperazina-N'-2-etano-sulfónico [HEPES] (H4034), albumina sérica bovina (B4287), bisacrilamida (M7279), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (H6269), dihidrocloruro de tetrametilbenzidina (T3405), dimetilformamida (D4551), dodecil sulfato sódico (436143), fluoruro de fenilmetilsulfonilo [PMSF] (P762), fluoruro de sodio (S7920), glicerol (G5516), laemmli 2X (S3401), MgCl<sub>2</sub> (M8266), NaCl (S7653), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (S5136), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (S5011), ortovanadato de sodio (S6508), pentoxifilina (P1784), peróxido de hidrógeno (216763), ponceau S (P3504), sacarosa (50389) y Tritón X-100 (T9284) fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Albumina de suero bovino (BSA) (0332) obtenida de Amresco (Solon, OH, USA). El kit de inmunoensayo ligado a enzimas para LTB<sub>4</sub> (52011), RvD1 (500380), detección de translocación nuclear de NFκβ (10007889) y el estándar de MPO (485014) obtenidos de Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA). El kit de inmunoensayo ligado a enzimas para TNF-α (EMTNFA), ICAM-1 (EMICAM) e IL-1β (EM21L1β), así como los anticuerpos secundarios goat anti-mouse IgG (A24518) y goat anti-rabbit IgG- HRP (A24537) fueron obtenidos de Invitrogen - Thermo Fisher Scientific Inc. El Coctel inhibidor de proteasas libre de EDTA (11873580001) se obtuvo de Roche. El agua usada para el inmunoensayo fue purificada en un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Ácido fosfórico (0260-03), CH<sub>3</sub>OH (9070-03), C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O (9014-03), KCl (4001-01), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3252-01), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3246-19), NaCl (3624-19), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4062-02) y NaHCO<sub>3</sub> (3606-07) fueron obtenidos de JT. Baker Chemical Co. (Center Valley, PA, USA). Acrilamida

(1610107), azul de coomasie G 250 (1610406), glicina (1610718), membrana de nitrocelulosa (1620115), persulfato de amonio (1610700), tetra-metil- etilendiamina (TEMED) (1610800), tris [hidroximetil] aminometano (1610719), tween 20 (1706531), TBS solución (1706435), el reactivo para detección Clarity Western ECL (170-5061) y el marcador de peso molecular dual color (25002) obtenidos de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Los anticuerpos primarios para Lamina  $\beta$ 1 (20682), GAPDH (365062), GPR120 (390752), GPR40 (28416),  $\beta$ - actina (SC-1615) y los anticuerpos secundarios para GPR120 (SC-2380), para GPR40 y  $\beta$ -actina (SC-2354) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). El anticuerpo secundario para Lamina  $\beta$  (KPL 04-15-06) y el anticuerpo secundario para GAPDH (KPL 074-1806) fueron obtenidos de KPL antibodies de Sera-Care Life Sciences (Milford, MA, USA).

## *8.2. Animales*

Todos los animales experimentales fueron tratados cumpliendo con las normas internacionales y acorde a la Norma Oficial Mexicana (NOM- 062- ZOO-1999) para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio; además de ser aprobado por el Comité de Bioética de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía (número de registro: ENMH-CB-139-2015). Los experimentos se realizaron con ratones machos BALB/c (6-9 semanas de edad) obtenidos de laboratorios Harlan (Ciudad de México, México) y del bioterio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN)(Protocolo 0184-03). El tamaño de la muestra por grupo fue de cinco a siete animales. Los ratones fueron acondicionados en jaulas de policarbonato bajo condiciones de temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), con ciclos de luz-oscuridad (12 h), alimentadas con comida en pellets estándar y agua de grifo ad libitum durante 2 a 3 semanas previas al experimento. Los animales fueron privados de alimento 12 h previas al experimento, pero con libre acceso al agua. Al término de cada experimento, los animales fueron eutanizados en cámara de  $\text{CO}_2$ , o para la obtención de muestra sérica fueron anestesiados con ketamina (100 mg/kg, i.p.) y xilacina (7.5 mg/kg, i.p.) para después realizar una exanguinación por punción cardiaca.

### *8.3 Evaluación del daño gástrico e intestinal generado por la administración aguda de indometacina a diferentes dosis*

Se llevó a cabo una curva dosis-respuesta del daño gástrico e intestinal generado por indometacina a diferentes dosis, basándonos en la metodología descrita por Souza et al., en 2004, LoGuidice et al., en 2010 y Wallace et al., en 2011, con algunas modificaciones. En ambos casos, se administró por vía oral (a través de una cánula metálica) indometacina a dosis única de 1, 3, 10 y 30 mg/kg o el mismo volumen de vehículo (NaHCO<sub>3</sub> al 5%) respectivamente, a ratones machos de la cepa BALB/c (6 – 9 semanas) con ayuno previo de 12 h y con libre acceso al agua (LoGuidice et al., 2010; Wallace et al., 2011b). Cinco h después de la administración de indometacina, para el daño gástrico, los animales fueron eutanizados para extraer el estómago y este se extendió completamente; efectuando el análisis macroscópico de las lesiones, para lo cual se tomó una fotografía del estómago completamente extendido y mediante el programa ImageJ (Versión 1.45) se mide el largo y ancho de cada lesión, obteniendo la suma total del área de lesión (mm<sup>2</sup>) para cada ratón. Con el análisis de los resultados obtenidos, se eligió un tiempo de cinco horas como el adecuado para cuantificar las lesiones gástricas, ya que presentó mayor número de lesiones. Con respecto al daño intestinal, veinticuatro h después de la administración de indometacina, los animales fueron eutanizados, para la extracción y extensión del intestino, se midió y dividió en cuatro partes para efectuar el análisis macroscópico de las lesiones en la tercera y cuarta parte, obteniendo la suma total del área de lesión (mm<sup>2</sup>) para cada ratón.

### *8.4 Efecto gastro y entero protector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gastrointestinal generado por indometacina en el ratón.*

Ratones BALB/c (6 – 9 semanas) en condiciones previamente descritas fueron divididos aleatoriamente en grupos y sometidas a un ayuno previo de 12 h, se les administró por vía oral una dosis única de 3, 10, 30 y 100 mg/kg de DHA o el mismo volumen de vehículo (aceite de oliva) y 2 h después se administró indometacina (30 mg/kg, p.o.), o el mismo

volumen de vehículo (NaHCO<sub>3</sub> al 5%) en caso del grupo basal. Cinco y veinticuatro horas después de la administración de indometacina, los animales fueron sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub> extrayendo el estómago o el intestino y extendiéndolo completamente; se efectuó el análisis macroscópico de las lesiones, de acuerdo a lo descrito en el punto 8.3. El porcentaje de gastro y enteroprotección fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación: % de protección = (IUC-IUT) x 100/IUC, donde IUC es el índice de úlcera del grupo testigo (mm<sup>2</sup>) y IUT es el índice de úlcera (mm<sup>2</sup>) de los animales tratados tratado (Navarrete et al., 2005).

#### *8.5 Efecto gastro y enteroprotector del omeprazol en el daño gástrico e intestinal agudo generado por indometacina en la rata.*

Ratones BALB/c (6 – 9 semanas) en condiciones previamente descritas, fueron divididos aleatoriamente en grupos y sometidas a un ayuno previo de 12 h, se les administró por vía oral una dosis única de 30 mg/kg de omeprazol o el mismo volumen de vehículo (NaCl 0.9 %), 30 min después se administró indometacina en dosis única de 30 mg/kg por vía oral para inducir daño gástrico e intestinal, respectivamente o el mismo volumen de vehículo (NaHCO<sub>3</sub> al 5%). La evaluación del daño gástrico o intestinal se determinó de acuerdo al punto 8.3. El tiempo y las dosis de omeprazol fueron seleccionadas basándonos en la metodología descrita por Navarrete et al., en 2005 (Navarrete et al., 2005).

#### *8.6 Cuantificación de los niveles de mieloperoxidasa en tejido gástrico e intestinal de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo generado por indometacina.*

La cuantificación de los niveles de mieloperoxidasa (MPO) en tejido gástrico e intestinal de ratón, se llevó a cabo a través de la metodología descrita previamente (Jung et al., 2012; Seo et al., 2012; Yan et al., 2011). Brevemente, cada 300 miligramos de tejido gástrico fueron homogenizados por 30 s en un homogenizador de tejidos en 1 ml de una mezcla de bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0.5 % en 50 mM de buffer de fosfatos (pH 6), sonificado por 10 s, seguido de tres ciclos de congelación – descongelación, centrifugado a



18 000 g por 20 min a 4 °C; el sobrenadante recolectado se utilizó para el ensayo (Seo et al., 2012). Para el ensayo, 30 µl de sobrenadante de cada muestra se colocaron en cada pozo con 200 µl de una mezcla que contiene 100 µl de amortiguador de fosfato salino, 85 µl de amortiguador de fosfato de sodio (pH 5.4) y 15 µl de peróxido de hidrogeno 0.017 %. Posteriormente, la reacción se inició al añadir 20 µl de dihidrocloruro de tetrametilbenzidina 184 mM en 8% dimetilformamida en solución acuosa; el plato se incubó por 3 min a 37°C y luego se detiene la reacción añadiendo 30 µl de acetato de sodio 1.46 M (pH 8) a cada pozo (Jung et al., 2012; Yan et al., 2011). Midiendo la absorbancia a 620 nm y comparando los valores de las muestras con un estándar de MPO. En este ensayo, el dihidrocloruro de tetrametilbenzidina al donar electrones permite la reducción del peróxido de hidrogeno a agua y un compuesto dadimina cuyo color azul puede leerse a 620 nm.

#### *8.7 Valoración de la infiltración de leucocitos por corte histológico y tinción con hematoxilina eosina en tejido gástrico e intestinal de ratón después de la administración de indometacina.*

Se obtuvieron muestras de tejido gástrico e intestinal, los cuales se fijaron con formaldehído al 10% en amortiguador de fosfatos salino por 24 horas. Los cortes se lavaron con agua corriente, se deshidrataron en alcoholes y se embebieron en parafina. Se realizaron cortes 4-5 micras de espesor y se cubrieron con silano; cada corte se desparafinó y se rehidrató con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95% respectivamente. Se realizó tinción con hematoxilina y eosina para cada corte (Reyes-Gordillo et al., 2007). Finalmente, el análisis morfológico y las fotografías se realizaron con un microscopio óptico marca Nikon Eclipse Slog con cámara Nikon Digital Sighth DS-2mv integrada y un objetivo 10X.

#### *8.8 Cuantificación de los niveles de LTB<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$ , RvD1 en tejido gastrointestinal e Il-1 $\beta$ , ICAM-1 en tejido gástrico después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico e intestinal agudo generado indometacina.*

Se obtuvieron muestras de tejido gástrico e intestinal de ratones BALB/c (6 – 9 semanas) con los diversos tratamientos e inducción de daño gástrico e intestinal por la

administración de 30 mg/kg de indometacina, así como con el respectivo análisis macroscópico de las lesiones a las 5 ó 24 h. Las muestras de tejido gástrico e intestinal fueron colocados en un microtubo (tubo eppendorf) que contiene 1 ml de amortiguador de fosfatos ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10mM; pH 7.4); el tejido fue cortado con tijeras por 30 s, incubado en baño de agua (37 °C) con movimiento por 20 min, posteriormente la muestra fue centrifugada (13 000 rpm) por 1 min, el sobrenadante fue guardado en un microtubo y almacenado a - 70°C para la posterior cuantificación de  $\text{LTB}_4$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{RvD1}$  en tejido gastrointestinal e  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{ICAM-1}$  en tejido gástrico por el método de ELISA, de acuerdo a la metodología descrita previamente (Chávez-Piña et al., 2008; Odashima et al., 2006; Thong-Ngam et al., 2012).

La cuantificación de  $\text{LTB}_4$  y  $\text{RvD1}$ , se realizó acorde a las instrucciones del kit de inmunoensayo ligado a enzimas para  $\text{LTB}_4$  (52011),  $\text{RvD1}$  (500380) de Cayman Chemical Co.. Brevemente, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas del kit está basado en la competencia entre una cantidad constante de nuestro metabolito de interés ligado a acetilcolinesterasa (AChE), y la cantidad indeterminada de nuestro metabolito de interés en las muestras por la unión a una cantidad constante de anticuerpo anti  $\text{LTB}_4$  o  $\text{RvD1}$ . Este complejo de anticuerpo -  $\text{LTB}_4$  o  $\text{RvD1}$ , se une a un anti- IgG que esta previamente unido al pozo; después de 18 h, la micro-placa se lavó para eliminar el exceso no unido y, posteriormente se añadió un sustrato para acetilcolinesterasa. Este sustrato permite una reacción enzimática, que da como resultado una coloración amarilla que puede ser leída en un espectrofotómetro a 412 nm; la intensidad del color, es inversamente proporcional a la cantidad de metabolito libre presente en las muestras durante el tiempo de desarrollo del ensayo.

La cuantificación de  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{ICAM-1}$  se realizó acorde a las instrucciones del kit de inmunoensayo ligado a enzimas para  $\text{TNF-}\alpha$  (EMTNFA),  $\text{IL-1}\beta$  (EM2IL1 $\beta$ ) e  $\text{ICAM-1}$  (EMICAM) obtenidos de Thermo Fisher Scientific Inc. . Brevemente, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas del kit está basado en la unión de una cantidad indeterminada de nuestro metabolito deseado en las muestras con la unión a una

cantidad constante de anticuerpo anti TNF- $\alpha$ , Il-1 $\beta$  ó ICAM-1 marcado con biotina . Este complejo de anticuerpo - TNF- $\alpha$ , Il-1 $\beta$  ó ICAM-1, se une a un anti- IgG que esta previamente unido al pozo; después de 2 h, la micro-placa se lavó para eliminar el exceso no unido y, posteriormente se añadió peroxidasa conjugado con estreptavidina que se une al anticuerpo marcado con biotina, después de 30 min se lava la microplaca y se añade un sustrato denominado TMB (3, 3', 5, 5'- tetrametilbenzidina). Este sustrato permite una reacción enzimática, que da como resultado una coloración azul, esta reacción es detenida cuando se añade ácido sulfúrico y finalmente nos da una coloración amarilla que puede ser leída en un espectrofotómetro a 450 y a 550 nm; la intensidad del color, es inversamente proporcional a la cantidad de metabolito libre presente en las muestras durante el tiempo de desarrollo del ensayo.

#### *8.10 Obtención de extractos nucleares para evaluar la translocación nuclear de NF $\kappa$ B en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gástrico generado por indometacina.*

Para la obtención de los extractos nucleares de las muestras de tejido gástrico necesarios para evaluar la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B, se siguió la metodología descrita por Dimauro et al., en 2012 con algunas modificaciones (Dimauro et al., 2012). Primero, las muestras del tejido gástrico de ratones BALB/c (6 – 9 semanas) pre-tratados con DHA y con inducción de daño gástrico por la administración de 30 mg/kg de indometacina, se enjuagan con amortiguador de fosfatos salino (PBS), se elimina el fondo del estómago y se conserva el cuerpo y antro del estómago; esto debido a que son las regiones donde aparecen y cuantificaron las lesiones. Posteriormente se colocan en un volumen final de 1200  $\mu$ l de un amortiguador de Sacarosa-Tris-Magnesio (250mM Sacarosa, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub> e inhibidores de proteasas) y se homogeniza 2 min con un homogenizador de teflón a una velocidad entre 600 – 1000 rpm (motor marca Glas-Con) y se mantiene en hielo por 30 min; posteriormente se mezcla en un vortex a máxima velocidad por 15 s y se centrifuga a 800 g por 15 min a 4°C, se obtiene el Pellet (P0) y el sobrenadante (S0) (con porción citosólica y mitocondrias) el cual se centrifuga a 500 g por 15 min a 4°C y el sobrenadante obtenido se aparta como porción citosólica. El Pellet (P0)

se resuspende en 1200  $\mu$ l amortiguador de Sacarosa-Tris-Magnesio, se mezcla en un vortex a máxima velocidad por 15 segundos y centrifugándolo a 500 g por 15 min a 4°C, obteniendo el nuevo Pellet (P1) y se descartan los “debris celulares”. El Pellet (P1) se resuspende en 1000  $\mu$ l amortiguador de Sacarosa-Tris-Magnesio, mezclándolo en un vortex a máxima velocidad por 15 s y centrifugándolo a 500 g por 15 min a 4°C, obteniendo un nuevo Pellet (P2). Posteriormente, el Pellet (P2) se resuspende en 1000  $\mu$ l de Sacarosa-Tris-Magnesio y se analiza al microscopio para observar la limpieza de los núcleos. Una vez verificado que el Pellet (P2) no contiene debris celulares se mezcla en un vortex a máxima velocidad por 15 segundos y centrifuga a 1000 g por 15 minutos a 4°C obteniendo un nuevo Pellet (P3). Esta pastilla (P3) se resuspende en 250  $\mu$ l amortiguador nuclear (20mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 NaCl, 0.2mM EDTA, 20% Glycerol, 1% Tritón X-100 e inhibidores de proteasas), se mezcla en un vortex a máxima velocidad por 15 segundos y se incuba en hielo por 30 minutos (ya que esta fracción contiene los núcleos). Finalmente los núcleos se lisan por sonicación (15s-10s-15s-10s-15s al 60%) y posteriormente se pasan 20 veces a través de una aguja calibre 18 g, después se centrifuga a 9000 g por 30 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido (S3) es la que contiene la fracción nuclear, se realizan alícuotas y se almacenan a -70°C. Con la finalidad de evidenciar la pureza de nuestros extractos se realizó la cuantificación proteica, electroforesis, transferencia a membrana e inmuno detección de lamina  $\beta$ 1 y después GAPDH.

#### *8.11 Cuantificación de proteínas por método de BCA (ácido bicinconínico)*

Se determinó la concentración de proteínas de los extractos citosólicos y extractos nucleares para las diferentes inmuno detecciones por el método del ácido bicinconínico (BCA) mediante la comparación de una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA), H<sub>2</sub>O 39  $\mu$ l y reactivo de Bradford 20  $\mu$ l. Las muestras fueron leídas a dilución 1:10 debido a la alta concentración proteica de las mismas y se leyeron a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro nanodrop 1000 de la marca Thermo Scientific; después se

determinó la concentración proteica interpolando el valor de las muestras en la curva estándar de albúmina sérica bovina.

#### *8.12 Electroforesis en gel de poliacrilamida*

A partir de los extractos totales, extractos citosólicos y extractos nucleares para las diferentes inmunodetecciones obtenidos en los procedimientos descritos en los puntos 8.10 y 8.12, se continuó con la preparación de las muestras agregando un amortiguador de carga (Laemmli 2x) en una proporción 1:1, y calentado a 90 °C por 5 min en baño María. Las proteínas fueron separadas por el método SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) en un gel al 12%. Se usó una carga de 30 µg de proteína para la detección lamina β1 y GAPDH. Se corrió la electroforesis a 120 mV por 90 min, usando el sistema de electroforesis MiniPROTEAN 3 (Bio- Rad). Al término de la misma se efectuó la tinción de los geles con azul de Coomassie para verificar la integridad de proteínas y en su caso se continuó con la transferencia a membrana de nitrocelulosa.

#### *8.13 Transferencia a membrana de nitrocelulosa.*

Para efectuar la transferencia a la membrana de nitrocelulosa, esta fue hidratada en el amortiguador de transferencia, junto con el papel filtro y esponjas. Se preparó el “sándwich” típico de transferencia con el siguiente orden del ánodo hacia el cátodo: esponja, papel filtro, gel de acrilamida con las proteínas de interés, membrana de nitrocelulosa, papel filtro y esponja. La transferencia húmeda fue llevada a cabo con el sistema mini transblot Cell System (biorad) durante 80 min a 310 mA a 4 °C para ambas proteínas. Al término de la transferencia se colocó la membrana en rojo ponceu para verificar la eficiencia de la transferencia, dejándose por algunos min, y posteriormente se lavó la membrana con H<sub>2</sub>O bidestilada hasta eliminar por completo el colorante.

#### *8.14 Bloqueo e incubación de la membrana con anticuerpos de interés*

El bloqueo de las membranas se llevó a cabo colocando las membranas en TBS-Tween 0.05% con 15% de leche libre de grasa por 1h a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente se efectúan 3 lavados con TBS-Tween 0.05% 5, 10 y 15 min cada uno; al

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

Anticuerpo Primario	Dilución	Incubación
Lamina $\beta$ 1 policlonal (SC-20682)	dilución 1:1000	toda la noche a 4°C
GAPDH policlonal (SC- 365062)	dilución 1:500	toda la noche a 4°C

El anticuerpo para lamina  $\beta$ 1 es un anticuerpo policlonal dirigido a los aminoácidos 401-490 del C terminal de lamina  $\beta$ 1 obtenido de conejo y purificado por afinidad, esta proteína es esencial para la estructura y funcionalidad de la célula expresada constitutivamente en núcleo (Camps et al., 2015), tiene un peso molecular de 67 kDa; mientras que el anticuerpo para GAPDH es un anticuerpo policlonal dirigido a todos los aminoácidos 1-333 del GAPDH, obtenido de ratón y purificado por afinidad, esta proteína constitutiva suele utilizarse como control de la fracción citosólica debido a la abundancia de la misma en la región mitocondrial, tiene peso molecular de 37 kDa, se ha reportado que en musculo de ratón es más frecuente encontrar el dímero (banda de aproximadamente 75kDa) (Sirover, 2014). Se utilizó la misma membrana para incubar las proteínas de interés primero lamina  $\beta$ 1 y después GAPDH, con la finalidad de evidenciar la pureza de nuestros extractos nucleares.

Posteriormente se efectúan 3 lavados con TBS-Tween 0.05% 5, 10 y 15 min cada uno; al término de los lavados se realizó la incubación con el anticuerpo secundario respectivo con las siguientes condiciones:

Anticuerpo Secundario	Dilución	Incubación
Anticuerpo secundario para lamina $\beta$ 1 (KPL 04-15-06)	dilución 1:6000 con leche 1 %	1 h a temperatura ambiente en agitación
Anticuerpo secundario para GAPDH (KPL 074-1806)	dilución 1:6000 con leche 1 %	1 h a temperatura ambiente en agitación

Se realizan 3 lavados con TBS-Tween 0.05% 5, 10 y 15 min cada uno y se procede al revelado. El anticuerpo secundario para lamina  $\beta$ 1 es un anticuerpo policlonal de conejo

dirigido a IgG y conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) obtenido de cabra y purificado por afinidad. El anticuerpo secundario para GAPDH es un anticuerpo policlonal de ratón dirigido a IgG y conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) obtenido de cabra y purificado por afinidad. Se utilizó la misma membrana para incubar las proteínas de interés primero lamina  $\beta$ 1 y después GAPDH, con la finalidad de evidenciar la pureza de nuestros extractos nucleares.

#### ***8.15 Revelado***

Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia, utilizando luminol en presencia de peróxido de hidrógeno en una relación 1:1, procurando cubrir la membrana en su totalidad y colocándolas en un casete de revelado exponiéndola a una placa radiográfica del mismo tamaño. Finalmente, se cerró el casete para detectar la quimioluminiscencia por tiempos de exposición desde 30 s a 5 min. La mezcla de luminol y peróxido sirvió como sustrato para la peroxidasa de rábano (HRP) que esta conjugada con el anticuerpo secundario, lo que permite una la quimioluminiscencia que se puede detectar al exponerla membrana a la placa radiográfica del mismo tamaño de la membrana.

#### ***8.16 Determinación de la translocación nuclear de NF $\kappa$ B en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gástrico generado por indometacina.***

Los extractos nucleares obtenidos fueron empleados para la determinación de la translocación nuclear de NF $\kappa$ B utilizando el kit comercial NF $\kappa$ B (p65) Transcription Factor Assay Kit (10007889) de Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA). La técnica utilizada en este kit combina el ensayo de movilidad eletroforética (EMSA) con el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En este kit se utiliza una sonda que contiene la secuencia específica de DNA de doble cadena (dsDNA) que contiene un el elemento de respuesta a NF $\kappa$ B, el cual viene fijado en los pozos de la placa que provee el kit, cuando se incuba el extracto nuclear de nuestras muestras, la forma activa de NF $\kappa$ B se une a este elemento de respuesta y luego es detectado mediante la adición del anticuerpo primario específico dirigido contra NF $\kappa$ B (p65) y finalmente mediante a un anticuerpo secundario

conjugado con HRP se obtiene una lectura colorimétrica sensible a 450 nm. Como control positivo se utilizó extracto total de células Hela tratadas con TNF- $\alpha$ .

#### *8.17 Obtención de extractos totales para determinar la expresión de GPR120 (FFAR 4) y GPR40 (FFAR 1) en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gástrico generado por indometacina*

Para determinar la expresión de las proteínas GPR120 (FFAR 4) y GPR40 (FFAR 1) con la finalidad de evaluar su posible participación en el efecto gastroprotector del DHA, una muestra del cuerpo del estómago de los grupos tratados con DHA, así como en condiciones basales y los respectivos vehículos, fueron colocados en microtubos, pesados y congelados en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -70°C (Martin et al., 2008). Para la obtención de extractos proteicos totales, se llevó a cabo la metodología descrita por Martin et al., en 2008, con ligeras modificaciones brevemente, se colocó la muestra en un amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, 0.1 mMol PMSF, TritonX-100 al 1%, NaF 10 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM) a proporción 1:3 al cual se le incorporó un cocktail de inhibidor de proteasas (Complete Roche). Las muestras fueron homogenizadas en un homogenizador de tejido por 1 mina 19 mil rpm, previa escisión con tijeras por 30 s, posteriormente se incubó en hielo por 10 min y luego se coloca durante 1 min en el vortex. Las muestras se centrifugan 13 mil rpm por 16 min a 4 °C, el sobrenadante se recolecta y se almacena a -70°C. Se realizó la cuantificación de proteínas totales acorde a la metodología descrita en el punto 8.11.

#### *8.18 Inmunodetección de GPR120 (FFAR 4) y GPR40 (FFAR 1) en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gástrico generado por indometacina*

Para llevar a cabo la inmuno detección de las moléculas de GPR120 (FFAR 4) y GPR40 (FFAR 1), se llevó a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con una carga de 30  $\mu$ g de proteína para la detección de GPR120 (FFAR 4) y 50  $\mu$ g de proteína para la detección de GPR40 (FFAR 1) por muestra. Se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa acorde a lo descrito en el punto 8.13. Para el bloqueo con los respectivos anticuerpos se utilizó la metodología descrita anteriormente en el punto 8.14 , modificada solamente la solución de bloqueo para GPR120 (FFAR 4) que fue TBS-Tween 0.05% con



15% de leche libre de grasa y 2% de albumina sérica bovina (BSA) por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Mientras que para el bloqueo con el anticuerpo primario y secundario respectivos, se utilizaron las siguientes condiciones:

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Incubación</b>
<b>GPR120 monoclonal (SC-390752)</b>	dilución 1:2000	1 hr a temperatura ambiente
<b>GPR40 policlonal (SC-28416)</b>	dilución 1:500	Toda la noche a 4°C
<b>Actina policlonal (SC- 1615)</b>	dilución 1:500	3 hr a temperatura ambiente
<b>Anticuerpo secundario para GPR120 (SC-2380)</b>	dilución 1:10,000	1 h a temperatura ambiente en agitación
<b>Anticuerpo secundario para GPR40 y <math>\beta</math>-actina (SC-2354)</b>	dilución 1:10,000	1 h a temperatura ambiente en agitación

El anticuerpo para GPR120 un anticuerpo monoclonal de ratón IgG<sub>1</sub> dirigido a los aminoácidos 78-232 localizados en el C-terminal obtenido de humano y purificado por afinidad, esta proteína es un receptor acoplado a proteína G, recientemente en humano se ha reportado como parte de la familia de receptores de los ácidos grasos libres de ahí que es conocido como receptor de ácidos grasos libres 4 ó FFAR 4 por sus siglas en inglés (Moniri, 2016) y tiene un peso molecular reportado en humanos de 52 kDa. El anticuerpo para GPR40 es un anticuerpo policlonal de cabra IgG dirigido a los aminoácidos del dominio citoplásmico interno del GPR40 de origen humano, se ha reportado que esta proteína es un receptor acoplado a proteína G, recientemente en humano se ha reportado como parte de la familia de receptores de los ácidos grasos libres de ahí que es conocido como receptor de ácidos grasos libres 1 ó FFAR 1 por sus siglas en inglés (Calder, 2013; Moniri, 2016) con un peso de 31 kDa. Mientras que el anticuerpo  $\beta$  actina es un anticuerpo policlonal IgG dirigido a un epítipo específico del extremo C terminal de  $\beta$  actina, obtenido de cabra y purificado por afinidad, es una proteína constitutiva que tiene peso molecular de 43 kDa, aunque se ha reportado que en músculo de ratón es más frecuente encontrar el dímero (banda de aproximadamente 75kDa) (Sirover, 2014). Se utilizó la misma membrana para incubar las proteínas de interés primero GPR120 (FFAR 4) ó GPR40 (FFAR 1) y después actina, con la finalidad de poder analizar posteriormente nuestras muestras por medio de densitometría.

El anticuerpo secundario para GPR120 es un anticuerpo policlonal dirigido a IgG de ratón y conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) obtenido de bovino y purificado por afinidad; el anticuerpo para GPR40 y para  $\beta$ -actina es un anticuerpo es un anticuerpo policlonal dirigido a IgG de cabra y conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) obtenido de ratón y purificado por afinidad. Finalmente el revelado se hizo acorde a lo descrito en el punto 8.15; el análisis densitómetro para GPR40 y GPR120 se efectuó con el programa Image Studio Digit 4.0.21.

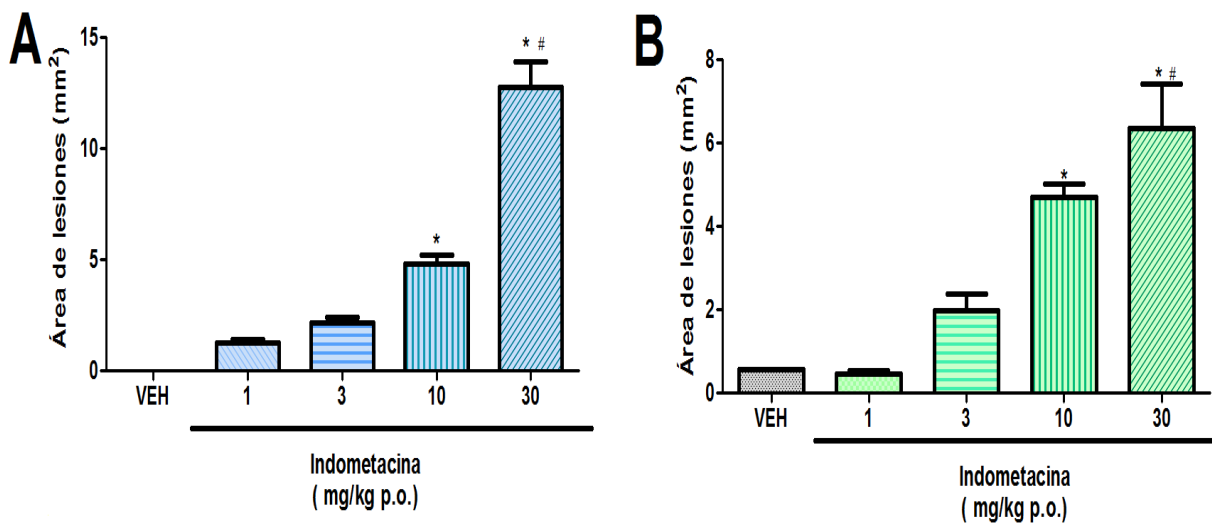
#### *8.15 Análisis estadístico*

Todos los resultados fueron analizados por medio de la prueba estadística del análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de comparación múltiple Newman-Keuls realizados en el programa GraphPad Prism 5. La significancia estadística fue considerada cuando P fue  $< 0.05$ .

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Evaluación del daño gástrico e intestinal generado por la administración aguda de indometacina

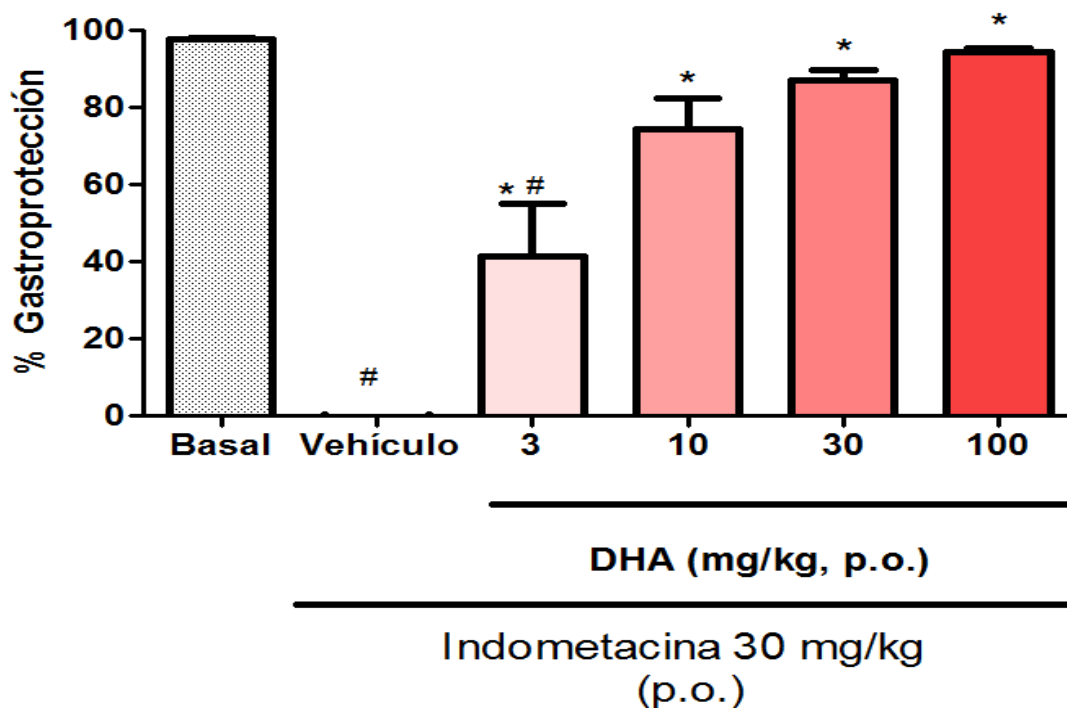
La administración por vía oral de una dosis única de indometacina, causa un área de daño ( $\text{mm}^2$ ) tanto gástrico e intestinal de manera dosis dependiente, siendo la dosis de 10 y 30 mg/kg las que presentaron una mayor área de daño en comparación con su vehículo ( $\text{NaHCO}_3$  al 5 %) ( $4.77 \pm 0.42 \text{ mm}^2$ ,  $12.74 \pm 1.47 \text{ mm}^2$  y  $0 \text{ mm}^2$  para las dosis de 10, 30 y vehículo, p.o. a nivel gástrico y  $4.67 \pm 0.31$ ,  $6.34 \pm 1.06$  y  $0.55 \pm 0 \text{ mm}^2$  para las dosis de 10, 30 y vehículo, p.o. a nivel intestinal); se elige la dosis de 30 mg/kg como la ulcerogénica tanto en nivel gástrico como intestinal, debido a que es la que genera el mayor área de daño en ambos tejidos (Gráfica 1).



Gráfica 1. Daño gástrico generado por la administración aguda de indometacina (1, 3, 10 y 30 mg/kg, p.o.) en estómago (A) e intestino (B). Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar (n=5). \*P < 0.05 vs Vehículo ( $\text{NaHCO}_3$  al 0.5 %), #P < 0.05 vs indometacina 10 mg/kg.

## 9.2 Efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gástrico generado por indometacina en el ratón.

El pre-tratamiento por vía oral de DHA (3, 10, 30 y 100 mg/kg) presenta un incremento en la gastroprotección ( $41.32 \pm 13.71$  %,  $74.35 \pm 8.08$  %,  $87.10 \pm 2.62$  mm<sup>2</sup> y  $94.33 \pm 1.01$  %, respectivamente) en el modelo de daño gástrico generado por la administración de indometacina en dosis única (30 mg/kg p.o.); siendo esta gastroprotección estadísticamente significativa en cada una de sus dosis, en comparación con el grupo dañado (aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg) ( $-1.5 \times 10^{-6} \pm 17.33$  %) y solo el grupo pre-tratado con DHA a dosis de 3 mg/kg y el grupo de daño presentaron diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo basal ( $97.63 \pm 0.53$  %)(aceite de oliva + NaHCO<sub>3</sub> 5%) (Gráfica 2).



Gráfica 2. Efecto del DHA (3, 10, 30 y 100 mg/ kg, p.o.) en el daño gástrico inducido por la administración aguda de indometacina (30 mg/kg, p.o.). Los ratones fueron pre tratados con vehículo (aceite de oliva) o DHA, 2 h antes de la administración de indometacina. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar (n= 6). \*P < 0.05 vs Vehículo (aceite de oliva). #P < 0.05 vs Vehículo (aceite de oliva).

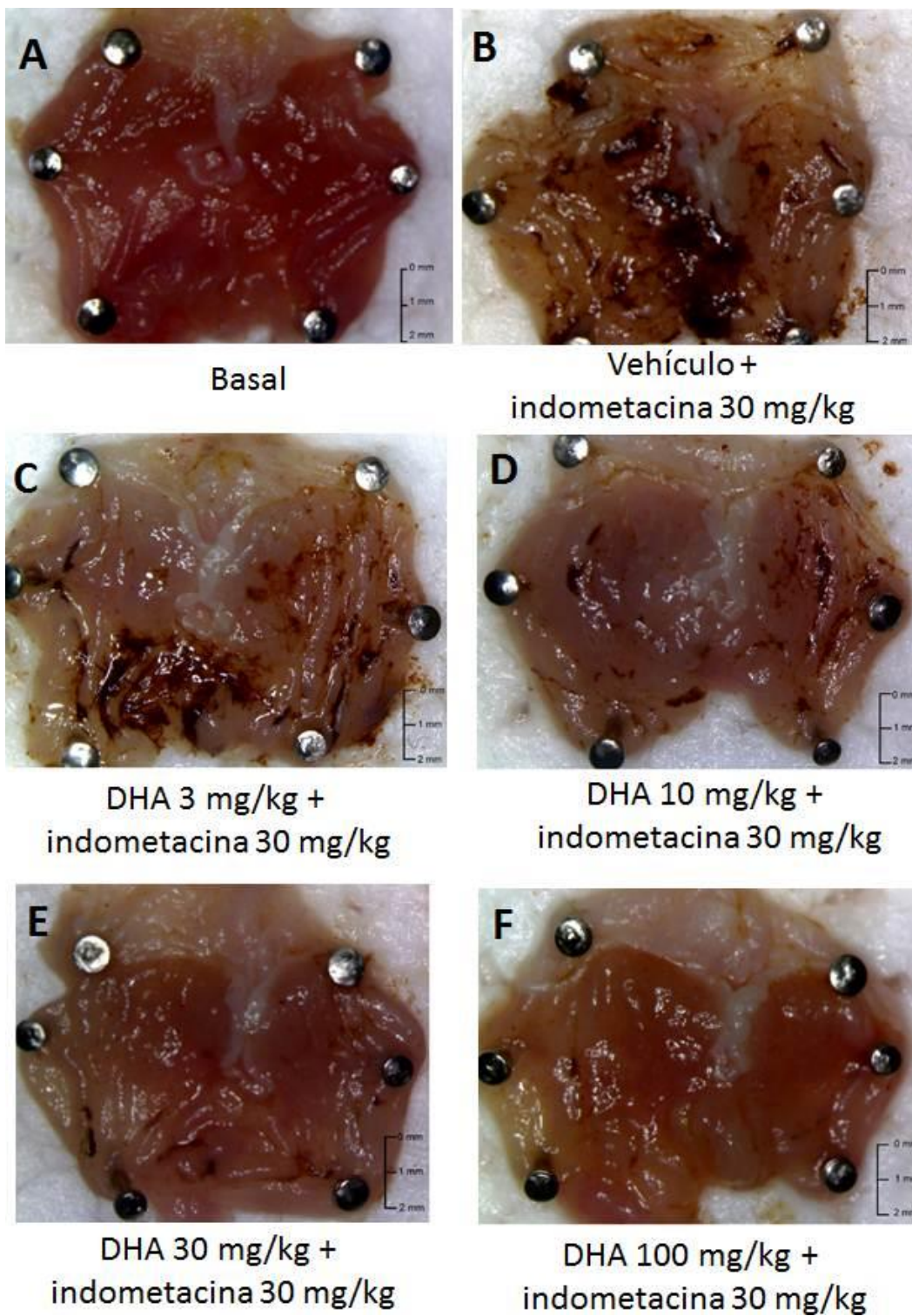
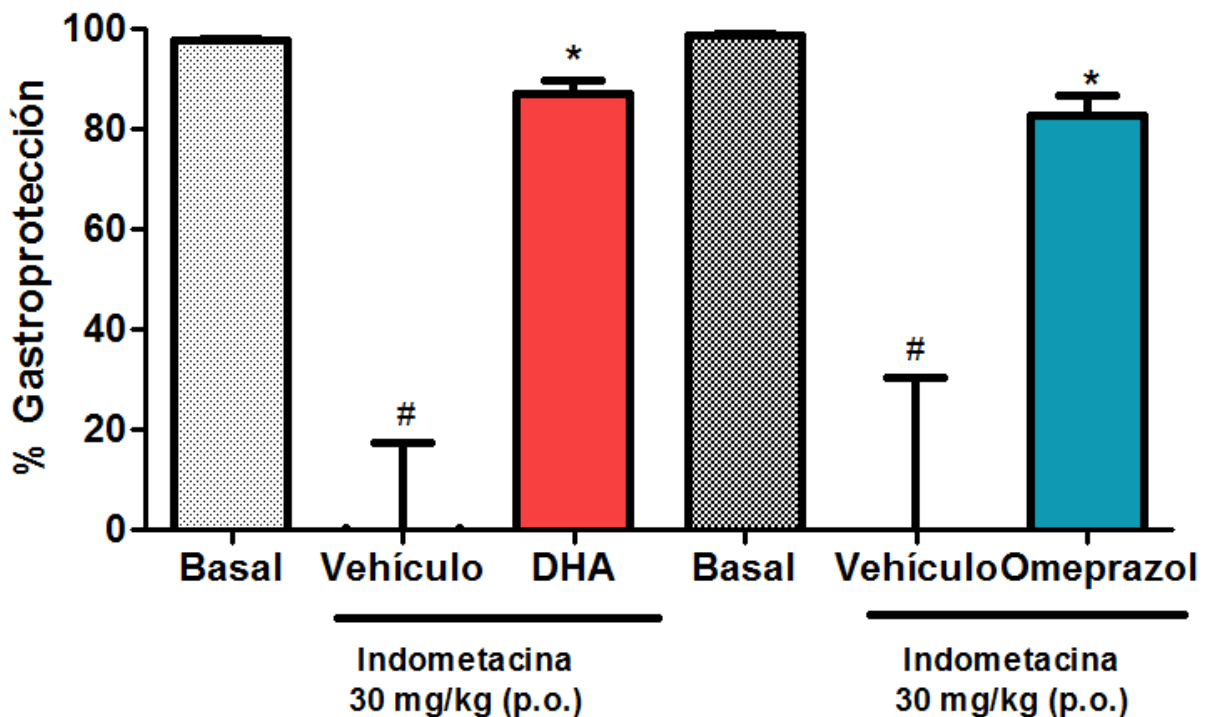


Figura 4. Imágenes representativas de las lesiones en cuerpo del estómago después de los diversos tratamientos. (A) Basal, (B) aceite de oliva + indometacina 30 mg/kg, (C) DHA 3 mg/kg + indometacina 30 mg/kg, (D) DHA 10 mg/kg + indometacina 30 mg/kg, (E) DHA 30 mg/kg + indometacina 30 mg/kg y (F) DHA 100 mg/kg + indometacina 30 mg/kg.

### 9.3 Efecto gastroprotector del DHA frente al efecto gastroprotector de omeprazol en el daño gástrico generado por indometacina en el ratón

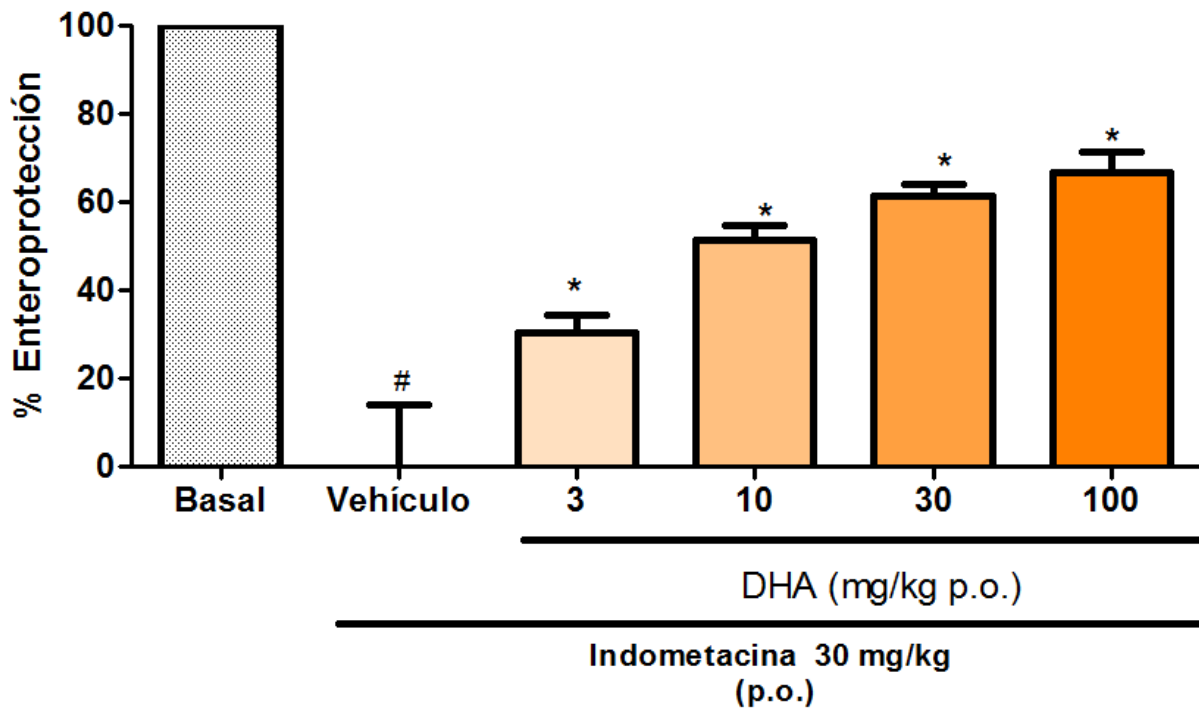
El pre-tratamiento por vía oral de DHA (30 mg/kg) y omeprazol (30 mg/kg) mostró en ambos un incremento en la gastroprotección en el modelo de daño gástrico generado por la administración de indometacina en dosis única (30 mg/kg p.o.) ( $87.10 \pm 2.62\%$  y  $82.59 \pm 3.97\%$ , respectivamente); siendo estos efectos estadísticamente significativos en comparación con el efecto producido por sus respectivos grupos de daño ( $-1.510 \times 10^{-6} \pm 17.33\%$  y  $1.90 \times 10^{-6} \pm 30.24\%$ , respectivamente) y no presentando diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Gráfica 3).



Gráfica 3. Comparación del efecto del DHA (30 mg/kg, p.o.) y omeprazol (30 mg/kg, p.o.) en el daño gástrico inducido por la administración aguda de indometacina (30 mg/kg p.o.) en porcentaje de gastroprotección. Los ratones fueron pre tratados con DHA o su vehículo (aceite de oliva) 2 h y con omeprazol o su vehículo (NaCl 0.9 %) 30 min antes de la administración de indometacina. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar (n = 6). \*P < 0.05 vs su respectivo Vehículo. #P < 0.05 vs Basal.

*9.4 Efecto entero protector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño intestinal generado por indometacina en el ratón.*

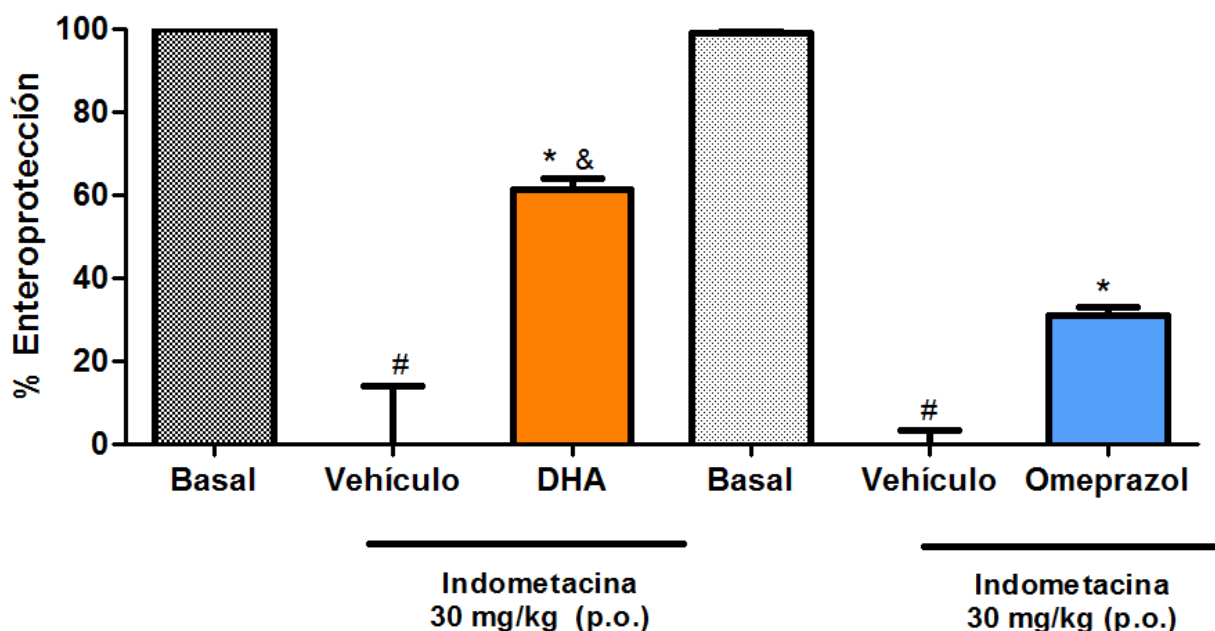
El pre-tratamiento por vía oral de DHA (3, 10, 30 y 100 mg/kg) presenta un incremento en la enteroprotección de forma dosis dependiente ( $30.31 \pm 4.10 \%$ ,  $51.34 \pm 3.09 \%$ ,  $61.32 \pm 2.73 \%$  y  $66.66 \pm 4.42\%$ , respectivamente) en el modelo de daño intestinal generado por la administración de indometacina en dosis única (30 mg/kg p.o.); siendo esta enteroprotección estadísticamente significativa en cada una de sus dosis, en comparación con el grupo dañado (aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg) ( $1.05 \times 10^{-6} \pm 13.93 \%$ ) y siendo este grupo a su vez estadísticamente significativo con respecto al grupo basal ( $100 \pm 0 \%$ ) (aceite de oliva +  $\text{NaHCO}_3$  5%) (Gráfica 4).



Grafica 4. Efecto del DHA (3, 10, 30 y 100 mg/ kg, p.o.) en el daño intestinal generado por la administración aguda de indometacina (30 mg/kg, p.o.) en porcentaje de enteroprotección. Los ratones fueron pre tratados con vehículo (aceite de oliva) o DHA, 2 h antes de la administración de indometacina. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar (n= 6). \*P < 0.05 vs Vehículo (aceite de oliva). #P < 0.05 vs Basal.

### 9.5 Efecto del DHA frente al efecto del omeprazol en el daño intestinal generado por indometacina en el ratón

El pre-tratamiento por vía oral de DHA (30 mg/kg) y omeprazol (30 mg/kg) mostró en ambos un incremento en la enteroprotección en el modelo de daño intestinal generado por la administración de indometacina en dosis única (30 mg/kg, p.o.) ( $61.32 \pm 2.73$  % para DHA y  $30.86 \pm 1.91$  % para omeprazol); siendo estos efectos estadísticamente significativos en comparación con el efecto producido por los grupos de daño con indometacina ( $1.05 \times 10^{-6} \pm 13.93$  % y  $1.11 \times 10^{-7} \pm 33.37$ %, respectivamente) y presentando diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Gráfica 5).

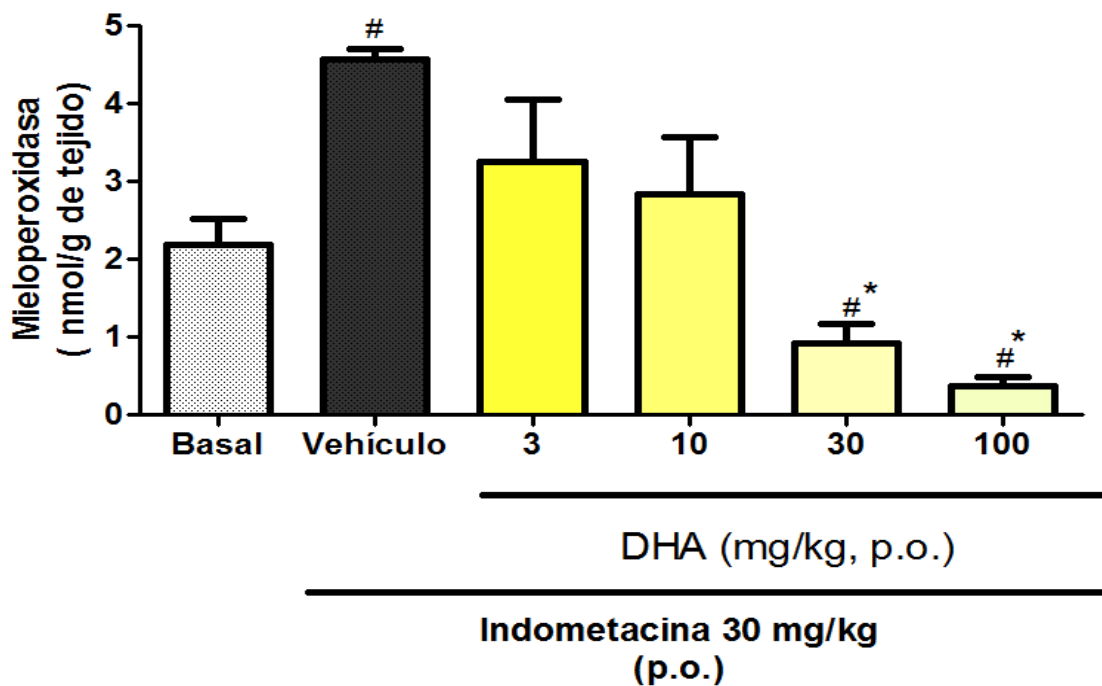


Gráfica 5. Comparación del efecto del DHA (30 mg/kg, p.o.) y omeprazol (30 mg/kg, p.o.) en el daño intestinal generado por la administración aguda de indometacina (30 mg/kg p.o.) en porcentaje de gastroprotección. Los ratones fueron pre tratados con DHA o su vehículo (aceite de oliva) 2 h y con omeprazol o su vehículo (NaCl 0.9 %) 30 min antes de la administración de indometacina. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar (n = 6). \*P < 0.05 vs su respectivo Vehículo. #P < 0.05 vs Basal. & P < 0.05 vs omeprazol 30 mg/kg + indometacina 30 mg/kg.



### 9.6 Cuantificación de los niveles de mieloperoxidasa en tejido gástrico de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo generado por indometacina.

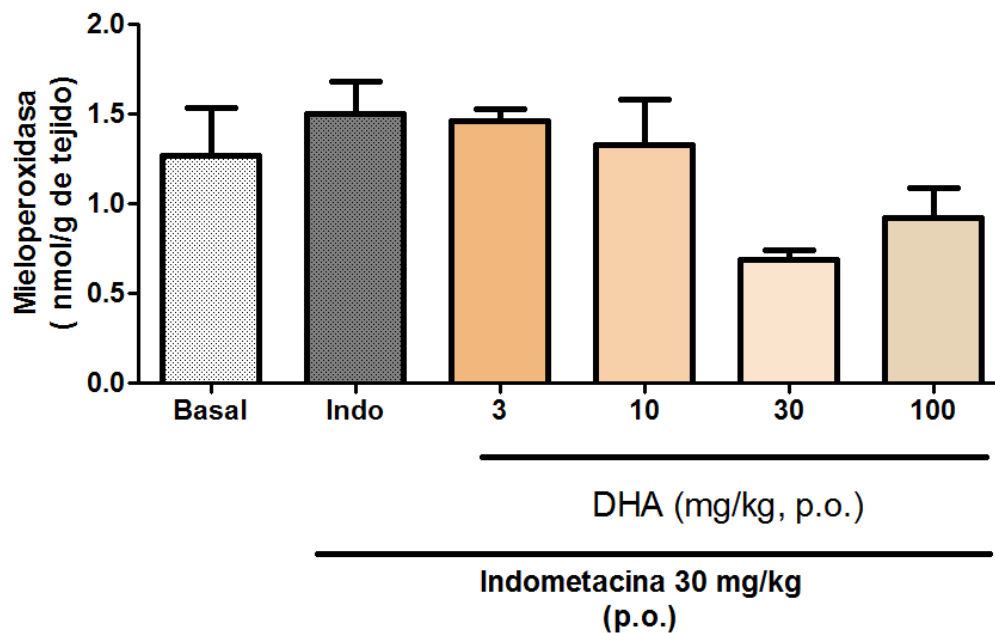
Todos los grupos pre-tratados con DHA mostraron una disminución en los niveles de mieloperoxidasa ( $3.24 \pm 0.80$  nmol/g tejido,  $2.82 \pm 0.74$  nmol/g tejido,  $0.91 \pm 0.25$  nmol/g tejido y  $0.35 \pm 0.11$  nmol/g tejido para las dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o., respectivamente), en comparación con el grupo dañado (aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg) ( $4.56 \pm 0.12$  nmol/g tejido) e incluso las dosis de 30 y 100 mg/Kg de DHA presentan una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo basal (aceite de oliva +  $\text{NaHCO}_3$  5%) ( $2.29 \pm 0.50$  nmol/g tejido) (Gráfica 6).



Gráfica 6. Niveles gástricos de mieloperoxidasa en nmol/g tejido, después del pre-tratamiento con DHA (3, 10, 30 y 100 mg/ kg, p.o.) en el daño gástrico generado por la administración aguda de indometacina (30 mg/kg, p.o.) Los ratones fueron pre tratados con vehículo (aceite de oliva) o DHA, 2 h antes de la administración de indometacina. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar (n= 6). \*P < 0.05 vs Vehículo (aceite de oliva). #P < 0.05 vs Basal.

**9.6.1 Cuantificación de los niveles de mieloperoxidasa en tejido intestinal de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño intestinal agudo generado por indometacina.**

Ninguno los grupos pre-tratados con DHA mostraron diferencia estadísticamente significativa en los niveles de mieloperoxidasa ( $1.45 \pm 0.06$  nmol/g tejido,  $1.32 \pm 0.25$  nmol/g tejido,  $0.68 \pm 0.05$  nmol/g tejido y  $0.92 \pm 0.16$  nmol/g tejido para las dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o., respectivamente), en comparación con los niveles de mieloperoxidasa del grupo dañado (aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg) ( $1.50 \pm 0.17$  nmol/g tejido) y este último tampoco tuvo diferencia estadísticamente significativa con el grupo basal (aceite de oliva +  $\text{NaHCO}_3$  5%) ( $1.267 \pm 0.2623$  nmol/g tejido) (Gráfica 7).



Gráfica 7. Niveles intestinales de mieloperoxidasa en nmol/g tejido, después del pre-tratamiento con DHA (3, 10, 30 y 100 mg/ kg, p.o.) en el daño gástrico generado por la administración aguda de indometacina (30 mg/kg, p.o.) Los ratones fueron pre tratados con vehículo (aceite de oliva) o DHA, 2 h antes de la administración de indometacina. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar (n= 6). \*P < 0.05 vs Vehículo (aceite de oliva). #P < 0.05 vs Basal.

*9.7.1 Valoración de la infiltración de leucocitos por corte histológico y tinción con hematoxilina eosina en tejido gástrico de ratón después de la administración de indometacina.*

El estudio histopatológico confirmó que la administración de indometacina a dosis de 30 mg/kg ocasiona una interrupción de la región superficial de las glándulas de la mucosa gástrica (número 1 figura 5B) que viene acompañada de congestión e infiltrado celular (número 2 figura 5B) en comparación con el grupo tratado solo con vehículo en el que se puede observar una mucosa íntegra con pliegues gástricos y foveolas bien definidas sin presencia de congestión o infiltrado celular (figura 5A). El pre-tratamiento con DHA a dosis de 3 mg/kg e inducción del daño con indometacina continúa presentando interrupción de la región superficial de la mucosa, congestión e infiltrado celular (número 2 figura 5C), mientras que el pre-tratamiento con DHA a dosis de 10 mg/kg e inducción del daño con indometacina ya no presenta la interrupción de la mucosa pero continúa con congestión e infiltrado (número 2 figura 5D), siendo importante observar que en los pre-tratamientos con DHA a dosis de 30 y 100 mg/kg, prácticamente no presentan lesiones en mucosa, infiltrado o congestión mostrando de esta forma una mucosa gástrica sana a pesar de inducirles el daño con indometacina (Figura 5D y 5F).

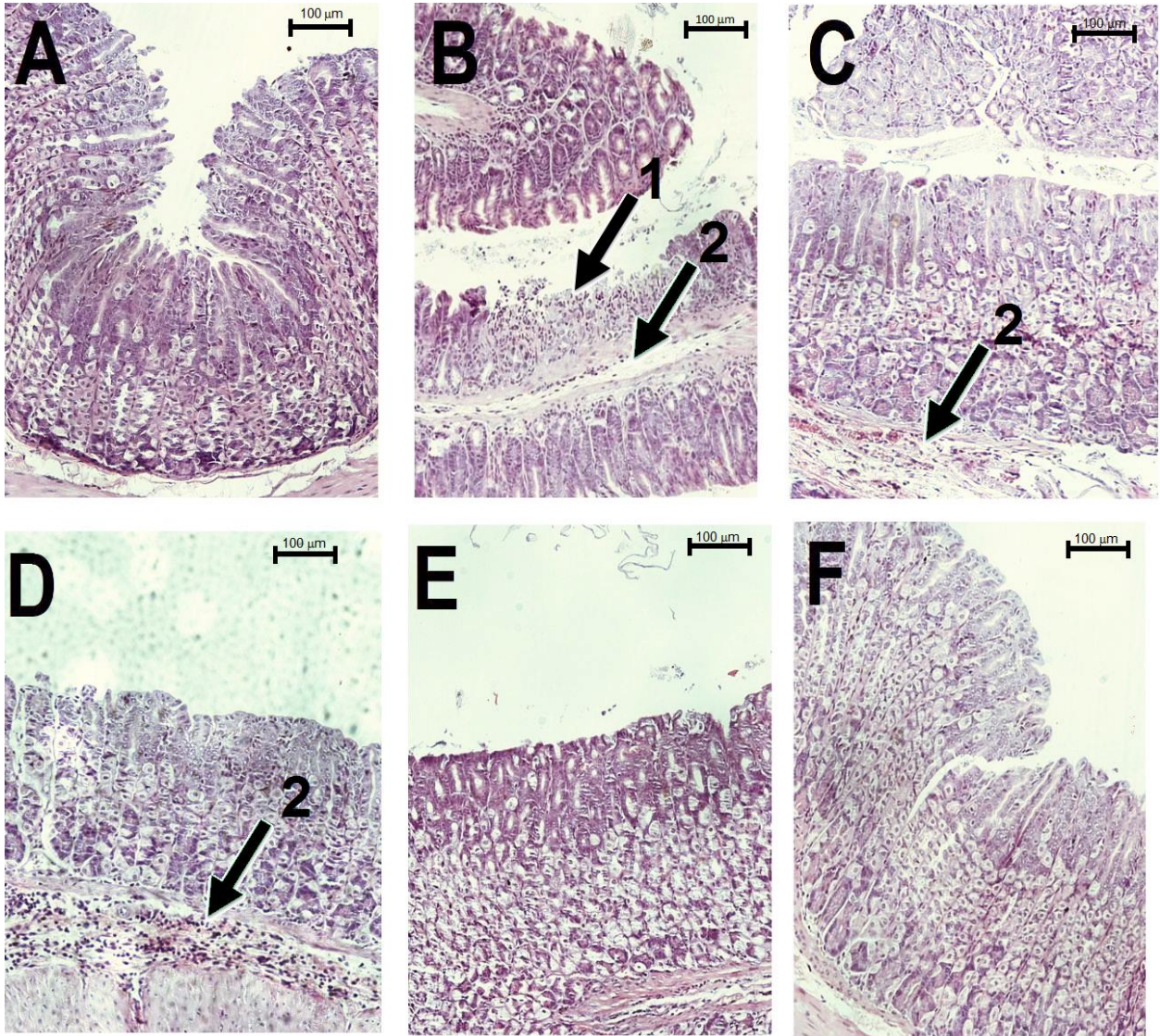


Figura 5. Imágenes representativas de cortes histológicos (10X) de las lesiones en el cuerpo del estómago después de los diversos tratamientos. (A) Basal, (B) indometacina 30 mg/kg, (C) DHA 3 mg/kg + indometacina 30 mg/kg, (D) DHA 10 mg/kg + indometacina 30 mg/kg, (E) DHA 30 mg/kg + indometacina 30 mg/kg y (F) DHA 100 mg/kg + indometacina 30 mg/kg.

*9.7.2 Valoración de la infiltración de leucocitos por corte histológico y tinción con hematoxilina eosina en tejido intestinal de ratón después de la administración de indometacina.*

El estudio histopatológico en intestino demuestra que la administración de indometacina a dosis de 30 mg/kg genera un daño evidente a la mucosa caracterizado por una erosión profunda de las glándulas de la mucosa intestinal (número 1 figura 6B) que viene acompañada de pérdida de células epiteliales o la estratificación de las mismas, degeneración de la lámina basal acompañada de congestión celular e infiltrado de polimorfonucleares (número 2 figura 6B), en comparación con el grupo tratado solo con vehículo el cual presenta vellosidades, microvellosidades y lamina basal integra con núcleos basales en su epitelio simple cilíndrico (figura 6A). El pre-tratamiento con DHA a dosis de 3 mg/kg e inducción del daño con indometacina continua presentando daño en el epitelio intestinal, con disrupción de lámina basal, marcada congestión y presencia de infiltrado celular (número 1, figura 6C), mientras que los pre-tratamientos con DHA a dosis de 10 ,30 y 100 mg/kg e inducción del daño con indometacina no presentan la interrupción de la mucosa, infiltrado o congestión mostrando de esta forma una mucosa gástrica sana a pesar la inducción el daño con indometacina (Figura 6D, 6E y 6F).

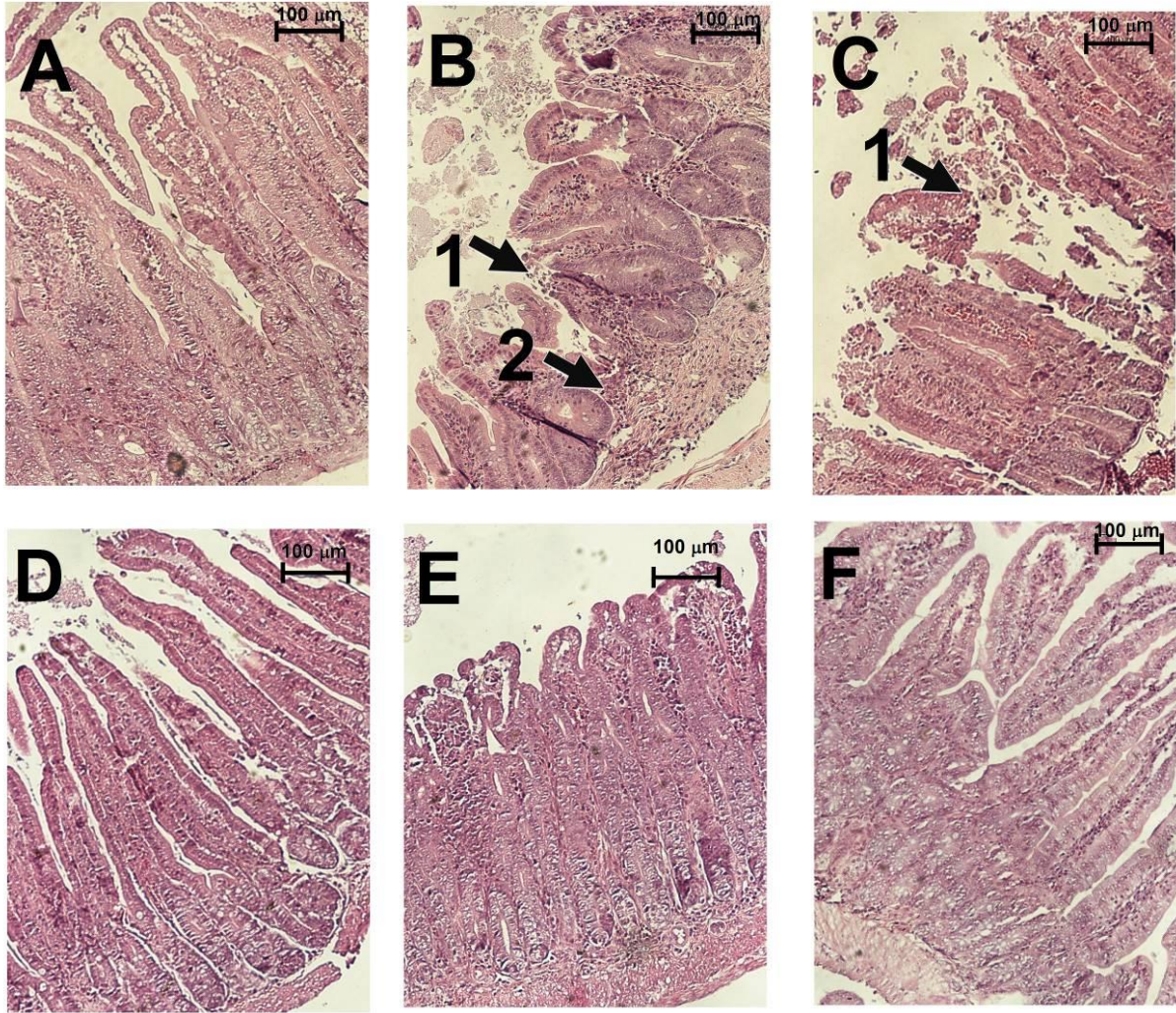
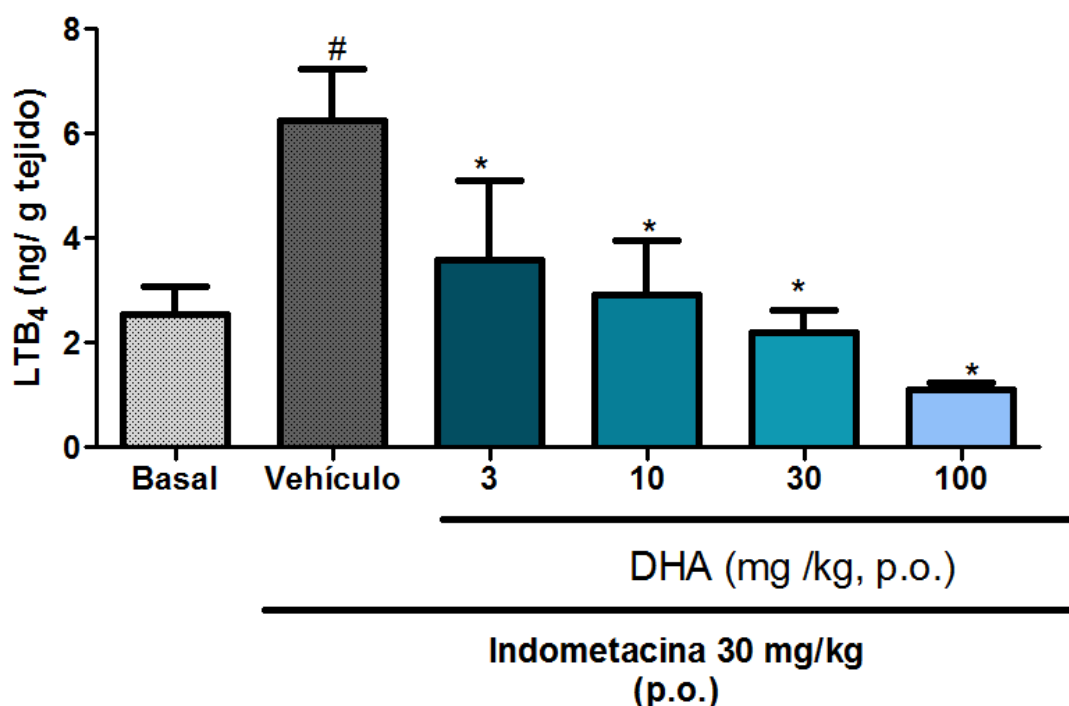


Figura 6. Imágenes representativas de corte histológico (10x) de las lesiones en intestino después de los diversos tratamientos. . (A) Basal, (B) indometacina 30 mg/kg, (C) DHA 3 mg/kg + indometacina 30 mg/kg, (D) DHA 10 mg/kg + indometacina 30 mg/kg, (E) DHA 30 mg/kg + indometacina 30 mg/kg y (F) DHA 100 mg/kg + indometacina 30 mg/kg.

### 9.8.1 Cuantificación de los niveles de LTB<sub>4</sub> en tejido gástrico de raón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido por indometacina.

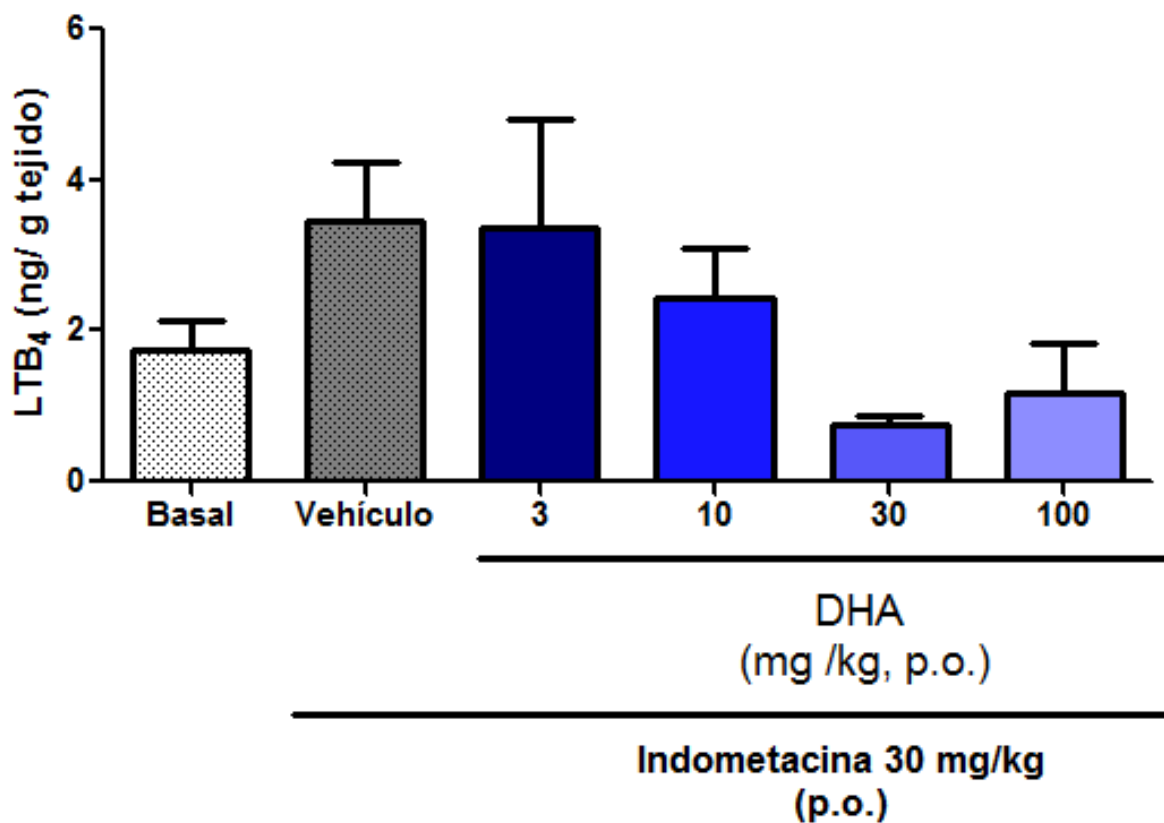
Los grupos pre-tratados con DHA mostraron una disminución en los niveles de LTB<sub>4</sub> ( $3.59 \pm 1.51$  ng/g tejido,  $2.91 \pm 1.02$  ng/g tejido,  $2.20 \pm 0.41$  ng/g tejido y  $1.104 \pm 0.12$  ng/g tejido para las dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o., respectivamente), en comparación con el grupo dañado (aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg) ( $6.25 \pm 0.96$  ng/g tejido) el cual incrementa dichos niveles con respecto al grupo basal (aceite de oliva + NaHCO<sub>3</sub> 5%) ( $2.53 \pm 0.52$  ng/ g tejido) (Gráfica 8).



Gráfica 8. Niveles gástricos de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) en ng/g tejido, después del pre-tratamiento con DHA (3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o.) en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina (30 mg/kg p.o.) en ratones. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar (n = 6). \*P < 0.05 vs Vehículo. #P < 0.05 vs Basal.

9.8.2 Cuantificación de los niveles de LTB<sub>4</sub> en tejido intestinal de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño intestinal agudo inducido por indometacina.

Los grupos pre-tratados con DHA no presentaron diferencia estadísticamente significativa en sus niveles de LTB<sub>4</sub> ( $3.59 \pm 1.43$  ng/ g tejido,  $2.43 \pm 0.65$  ng/g tejido,  $0.7406 \pm 0.11$  ng/g tejido y  $1.187 \pm 0.64$  ng/g tejido para las dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o., respectivamente), con respecto al grupo dañado (aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg) ( $3.45 \pm 1.43$  ng/g tejido) y este último tampoco presentó diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo basal (aceite de oliva + NaHCO<sub>3</sub> 5%)( $1.73 \pm 0.40$  ng/g tejido) (Gráfica 9).

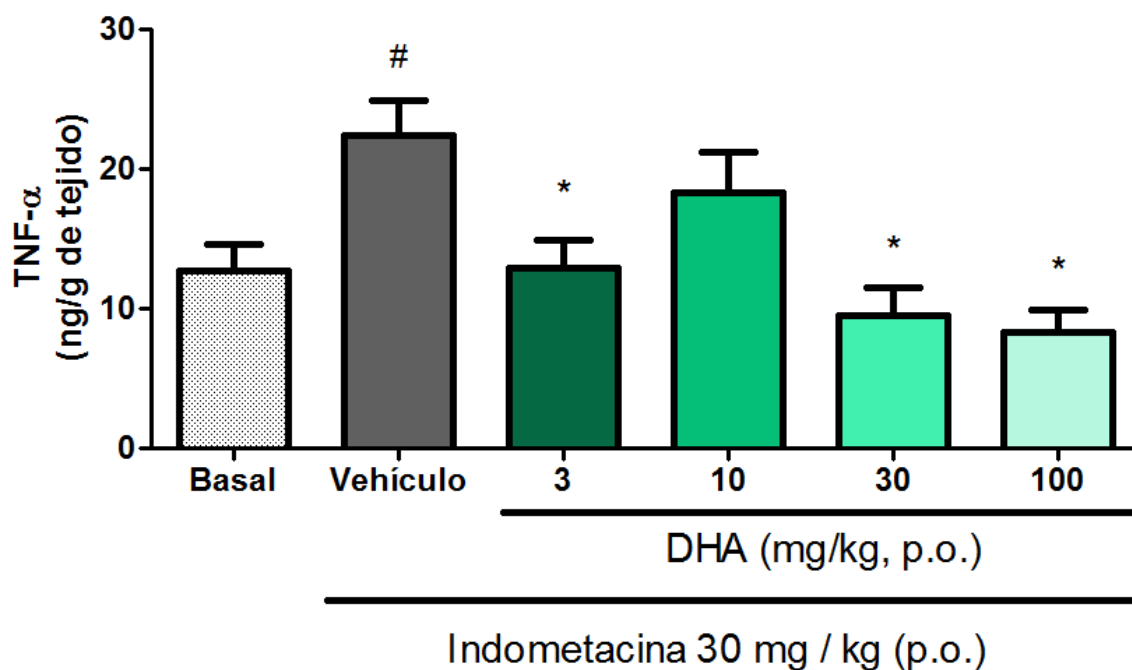


Gráfica 9. Niveles intestinales de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) en ng/g tejido, después del pre-tratamiento con DHA (3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o.) en el modelo de daño intestinal inducido por la administración de indometacina (30 mg/kg p.o.) en ratones. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar (n = 6). \*P < 0.05 vs Vehículo. #P < 0.05 vs Basal.



9.9.1 Cuantificación de los niveles de TNF- $\alpha$  en tejido gástrico de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido por indometacina.

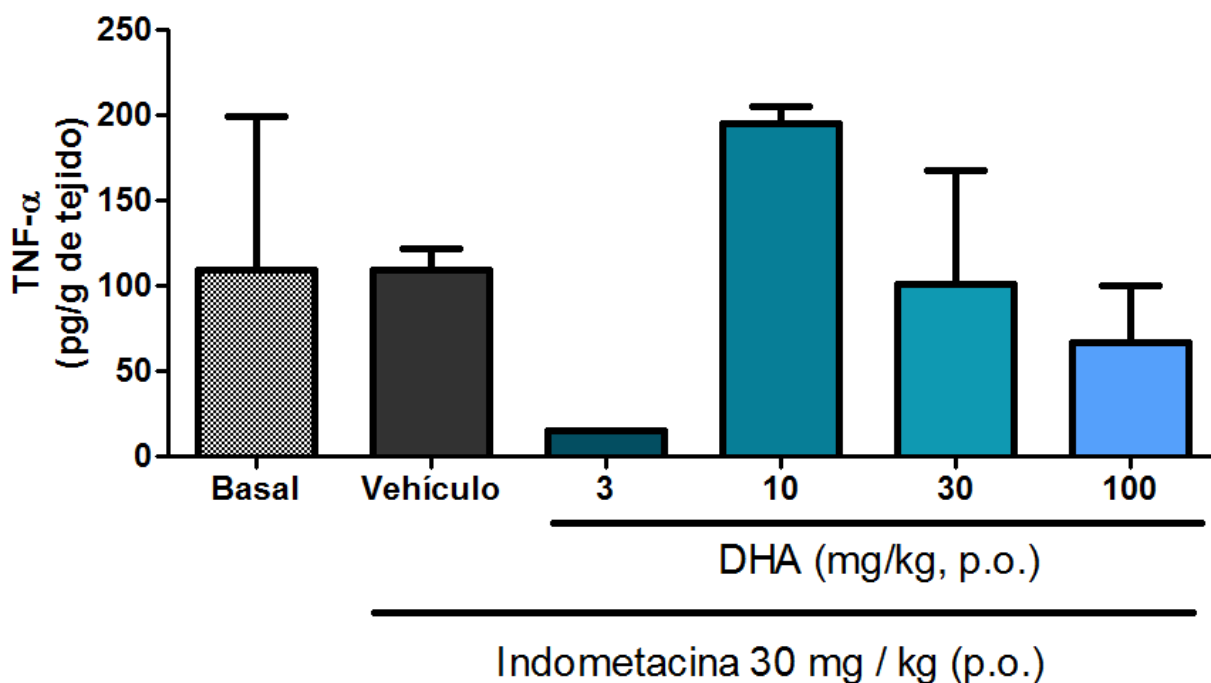
Los grupos pre-tratados con DHA logran mantener los niveles basales de TNF- $\alpha$  ( $12.90 \pm 2.02$  ng/g tejido,  $18.29 \pm 2.84$  ng/g tejido,  $9.45 \pm 1.97$  ng/g tejido y  $8.30 \pm 1.53$  ng/g tejido para las dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o., respectivamente), en comparación con el grupo dañado (aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg) ( $20.67 \pm 2.55$  ng/g tejido) y este grupo presenta un incremento de los niveles de TNF- $\alpha$  con respecto al grupo basal (aceite de oliva + NaHCO<sub>3</sub> 5%) ( $12.64 \pm 1.90$  ng/g tejido) (Gráfica 10).



Gráfica 10. Niveles gástricos de TNF- $\alpha$ , en ng/g tejido, después del pre-tratamiento con DHA (3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o.) en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina (30 mg/kg p.o.) en ratones. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar (n = 6). \*P < 0.05 vs Vehículo. #P < 0.05 vs Basal.

9.9.2 Cuantificación de los niveles de TNF- $\alpha$  en tejido intestinal de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño intestinal agudo inducido por indometacina.

Ninguno de los grupos pre-tratados con DHA mostraron una disminución en los niveles de TNF- $\alpha$  ( $14.89 \pm 1.50 \times 10^{-6}$  pg/g tejido,  $194.7 \pm 10.69$  pg/g tejido,  $100.5 \pm 67.05$  pg/g tejido y  $66.96 \pm 33.25$  pg/g tejido, para las dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o., respectivamente), en comparación con el grupo dañado (aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg) ( $109.2 \pm 12.86$  pg/g tejido) este grupo tampoco presenta diferencia estadísticamente significativa con los niveles de TNF- $\alpha$  en el grupo basal (AO+NaHCO<sub>3</sub> 5%) ( $109.6 \pm 89.40$  pg / g tejido) (Gráfica 11).



Gráfica 11. Niveles intestinales de TNF- $\alpha$ , en pg/g tejido, después del pre-tratamiento con DHA (3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o.) en el modelo de daño intestinal inducido por la administración de indometacina (30 mg/kg p.o.) en ratones. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar (n = 6). \* P < 0.05 vs Vehículo. #P < 0.05 vs Basal.

*9.10 Obtención de extractos nucleares para evaluar la translocación nuclear de  $NF\kappa\beta$  en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gastrointestinal generado por indometacina.*

Después de la obtención de extractos nucleares se comprobó la integridad de las proteínas que se obtuvieron de las muestras de tejido gástrico de ratas pre tratadas con DHA vía oral (3, 10, 30 y 100 mg/kg) y con inducción de daño gástrico por la administración de indometacina (30 mg/kg), para ello se corrieron geles de acrilamida – SDS al 12 % en el que se colocaron 30  $\mu$ g de cada extracto y se realizó Tinción de Coomasie. En la Figura 7 se muestran una imagen representativa de la calidad de los extractos utilizados tanto citosólicos como nucleares, en donde se observa que hay una plena integridad de los mismos y no hay degradación.

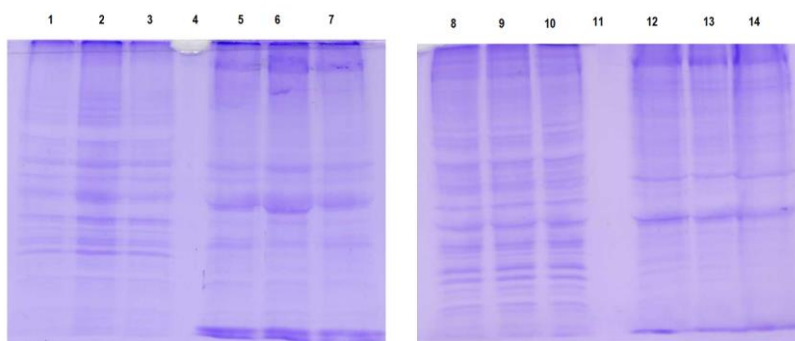


Figura 7. Imagen representativa de la integridad del extracto de proteínas nucleares y citosólicas del tejido gástrico del ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina en gel de acrilamida- SDS al 12% con Tinción de Coomasie. Carril 1 extracto citosólico de ratón en condiciones basales, Carril 2 extracto citosólico de ratón con indometacina 30 mg/kg, Carril 3 extracto citosólico de ratón con pre-tratamiento DHA 3 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 4 y 11 Marcador de peso, Carril 5 extracto nuclear de ratón en condiciones basales, Carril 6 extracto nuclear de ratón con indometacina 30 mg/kg, Carril 7 extracto nuclear de ratón con pre-tratamiento DHA 3 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 8 extracto citosólico de ratón con pre-tratamiento DHA 10 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 9 extracto citosólico de ratón con pre-tratamiento DHA 30 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 10 extracto citosólico de ratón con pre-tratamiento DHA 100 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 12 extracto nuclear de ratón con pre-tratamiento DHA 10 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 13 extracto nuclear de ratón con pre-tratamiento DHA 30 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 14 extracto nuclear de ratón con pre-tratamiento DHA 100 mg/kg e indometacina 30 mg/kg.

Posteriormente, se determinó la presencia de extractos nucleares a través de la inmunodetección por la técnica de Western blot de la proteína lamina  $\beta$ 1 de 67 kDa (Figura 8) y se determinó la pureza de los extractos nucleares a través de la inmunodetección de la proteína GAPDH de 37 kDa (Figura 9).

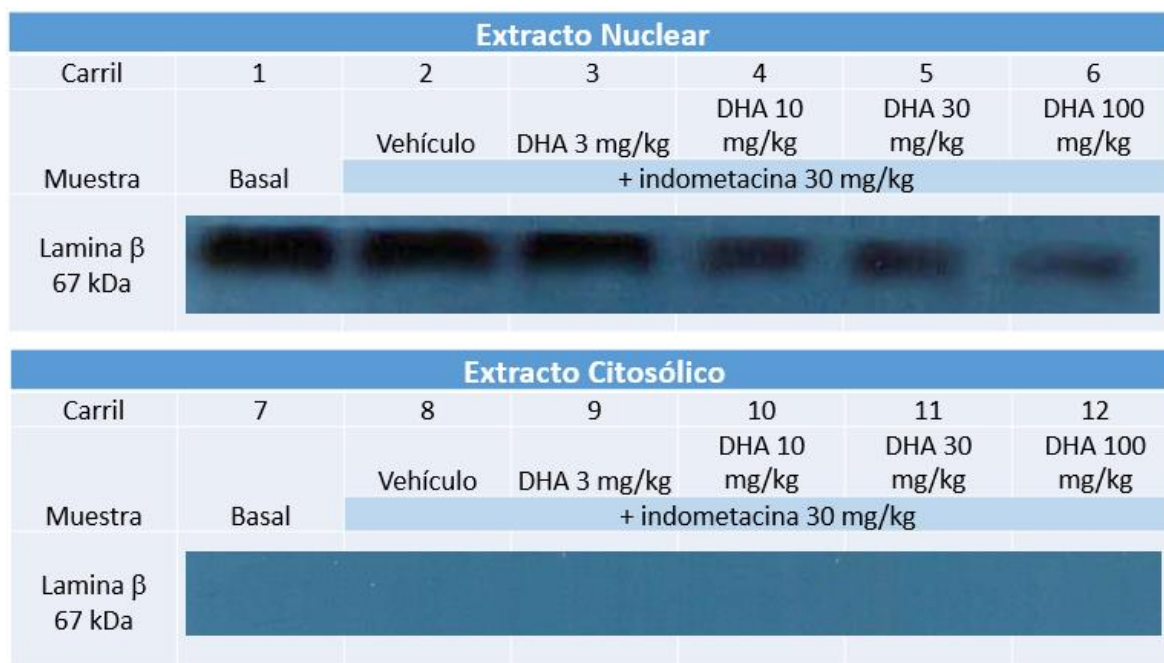


Figura 8. Imagen representativa de la integridad del extracto de proteínas nucleares con proteína lamina  $\beta$  de 67 kDa del tejido gástrico del ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina en gel de acrilamida- SDS al 12%. Carril 1 extracto nuclear de estómago de ratón en condiciones basales, Carril 2 extracto nuclear de estómago de ratón con aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg, Carril 3 extracto nuclear de estómago de ratón pre-tratamiento DHA 3 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 4 extracto nuclear de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 10 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 5 extracto nuclear de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 30 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 6 extracto nuclear de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 100 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 7 extracto citosólico de estómago de ratón en condiciones basales, Carril 8 extracto citosólico de estómago de ratón con aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg, Carril 9 extracto citosólico de estómago de ratón pre-tratamiento DHA 3 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 10 extracto citosólico de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 10 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 11 extracto citosólico de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 30 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 12 extracto citosólico de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 100 mg/kg e indometacina 30 mg/kg.

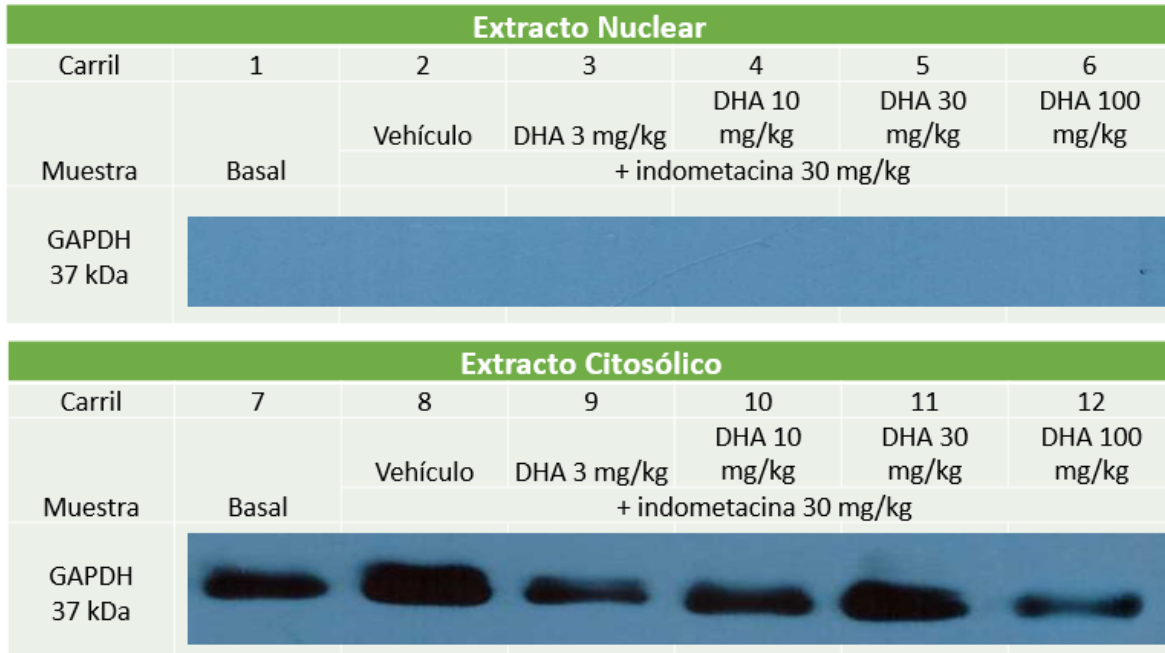
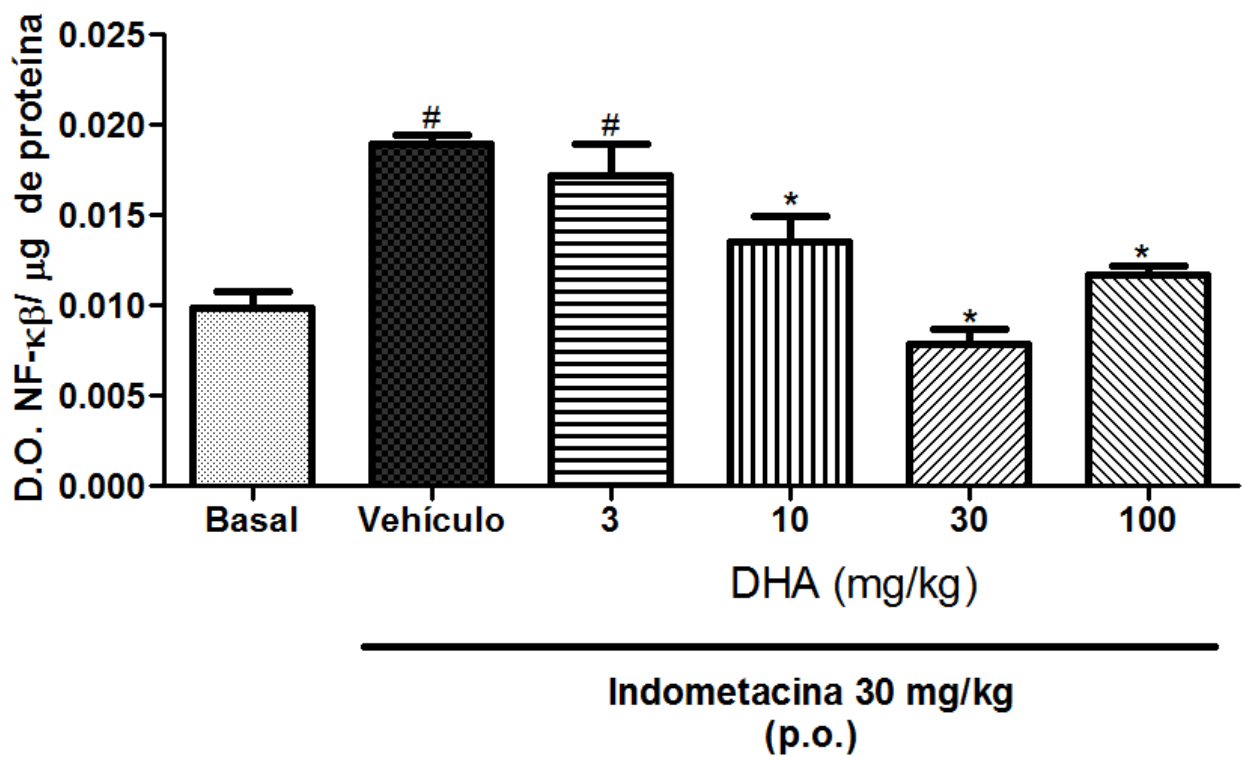


Figura 9. Imagen representativa de la integridad del extracto de proteínas citosólica con proteína GAPDH de 37 kDa del tejido gástrico del ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina en gel de acrilamida- SDS al 12%. Carril 1 extracto nuclear de estómago de ratón en condiciones basales, Carril 2 extracto nuclear de estómago de ratón con aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg , Carril 3 extracto nuclear de estómago de ratón pre-tratamiento DHA 3 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 4 extracto nuclear de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 10 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 5 extracto nuclear de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 30 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 6 extracto nuclear de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 100 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 7 extracto citosólico de estómago de ratón en condiciones basales, Carril 8 extracto citosólico de estómago de ratón con aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg , Carril 9 extracto citosólico de estómago de ratón pre-tratamiento DHA 3 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 10 extracto citosólico de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 10 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 11 extracto citosólico de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 30 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 12 extracto citosólico de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 100 mg/kg e indometacina 30 mg/kg.

### *9.11 Determinación de la translocación nuclear de NFκβ en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gástrico generado por indometacina.*

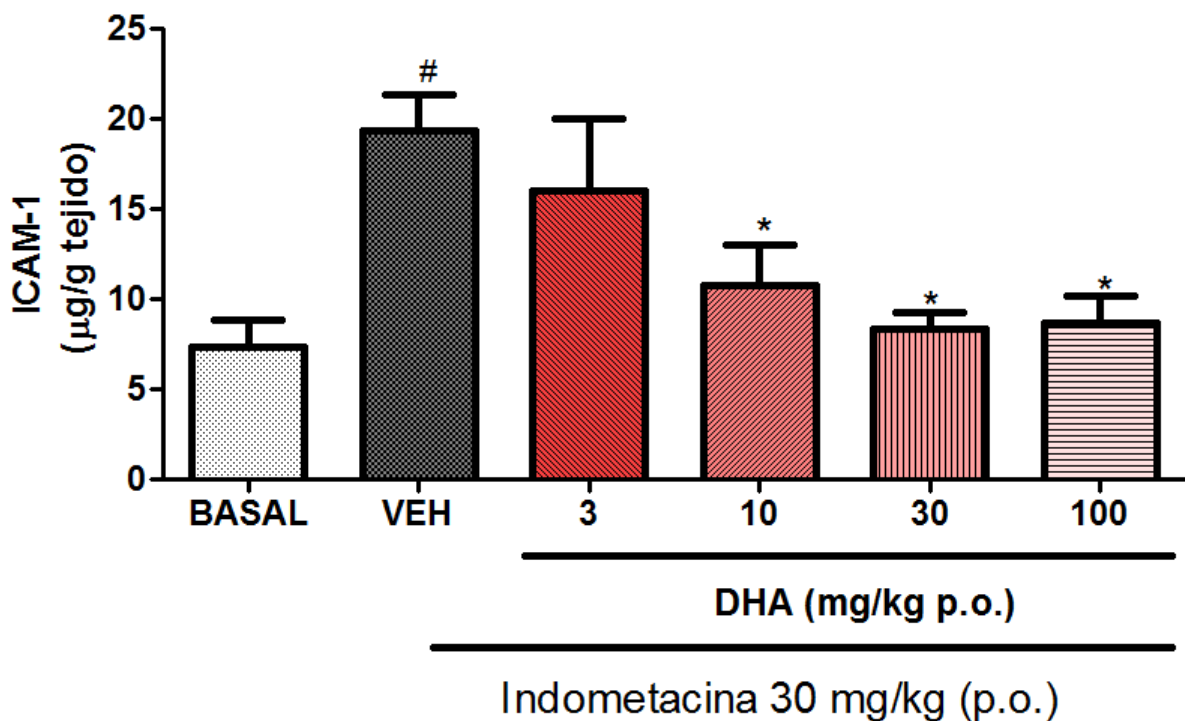
El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκβ) participa activamente en las vías de señalización que involucran la producción de citocinas pro-inflamatorias (Liao et al., 2012; Reyes-Gordillo et al., 2007). Se ha reportado que NFκβ se transloca al núcleo después de la administración de indometacina en tejido gástrico (Bindu et al., 2013), por ello decidimos determinar si el efecto gastroprotector del DHA es mediado por la inhibición de la translocación nuclear de NFκB. El extracto nuclear del tejido gástrico dañado con indometacina (30 mg/kg, p.o.) incrementa la translocación nuclear de NFκβ en comparación con el grupo basal (aceite de oliva + NaHCO<sub>3</sub> 5%) (0.01892 ± 0.0005310 D.O. NFκβ/μg de proteína y 0.009849 ± 0.0009240 D.O. NFκβ/μg de proteína, respectivamente) (Gráfica 14). Por otra parte, el pre-tratamiento con DHA demostró una disminución en la translocación de NFκβ (0.01349 ± 0.001479 D.O. NFκβ/μg de proteína, 0.007818 ± 0.0008380 D.O. NFκβ/μg de proteína y 0.01172 ± 0.0004749 D.O. NFκβ/μg de proteína, para las dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o., respectivamente) en comparación con el grupo de daño con indometacina de manera estadísticamente significativa (Gráfica 12), por lo tanto, logran mantener los niveles basales de NFκβ.



Gráfica 12. Cuantificación de la unión del NFκB al DNA en extractos nucleares de tejido gástrico de las ratas tratadas con DHA (3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o.) en el daño gástrico generado por indometacina. Los resultados son expresados como la densidad óptica relativa (D.O.) por μg de proteína obtenidos por análisis espectrofotométrico. Los datos son expresados como la media ± el error estándar (n = 6). \*P < 0.05 vs Vehículo. # P < 0.05 vs Basal.

9.12 Cuantificación de los niveles de ICAM-1 en tejido gástrico de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido por indometacina.

Los grupos pre-tratados con DHA mostraron una disminución en los niveles de ICAM-1 ( $10.72 \pm 2.26 \mu\text{g/g}$  tejido,  $8.34 \pm .84 \mu\text{g/g}$  tejido y  $8.61 \pm 1.54 \mu\text{g/g}$  tejido para las dosis de 10, 30 y 100 mg/kg, p.o., respectivamente), en comparación con el grupo dañado (aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg) y el grupo con DHA a dosis de 3 mg/kg ( $19.31 \pm 1.97 \mu\text{g/g}$  tejido y  $15.96 \pm 4.01 \mu\text{g/g}$  tejido ) este grupo presenta un incremento de los niveles de ICAM-1 con respecto al grupo basal (aceite de oliva +  $\text{NaHCO}_3$  5%) ( $7.32 \pm 1.50 \mu\text{g/g}$  tejido) (Gráfica 13).

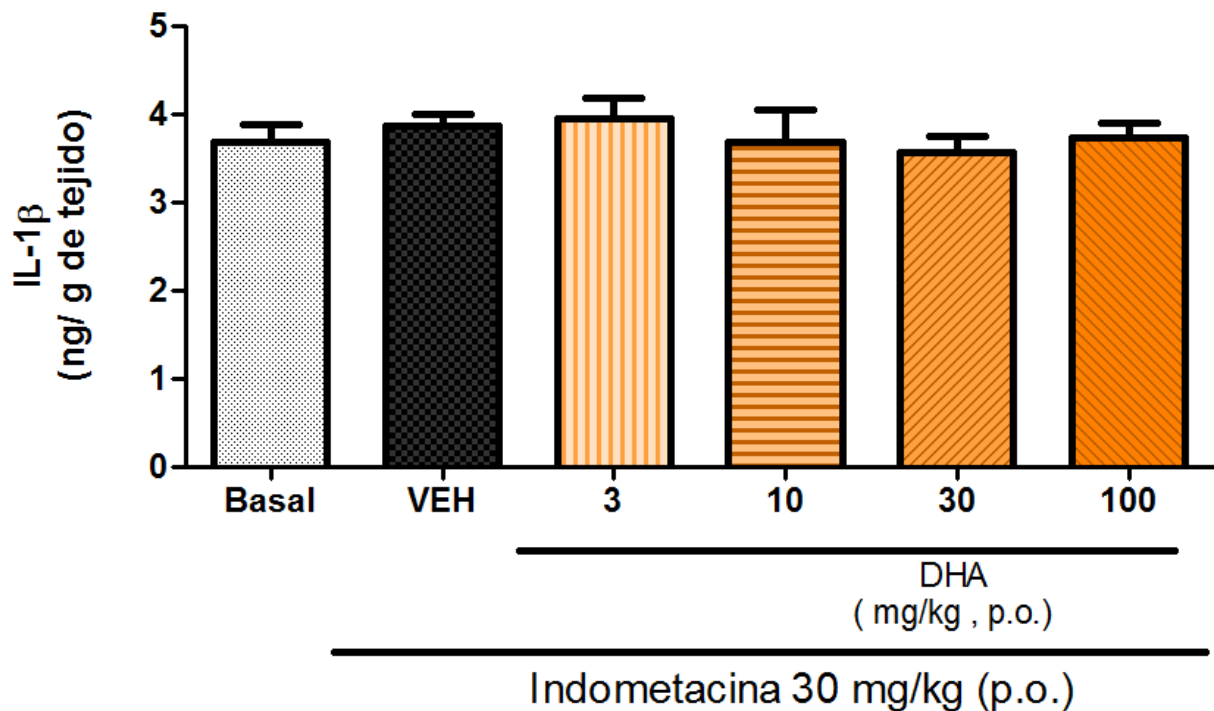


Gráfica 13. Niveles gástricos de ICAM-1, en  $\mu\text{g/g}$  tejido, después del pre-tratamiento con DHA (3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o.) en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina (30 mg/kg p.o.) en ratones. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar ( $n = 6$ ). \* $P < 0.05$  vs Vehículo. # $P < 0.05$  vs Basal.



*9.13 Cuantificación de los niveles de IL-1 $\beta$  en tejido gástrico de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido por indometacina.*

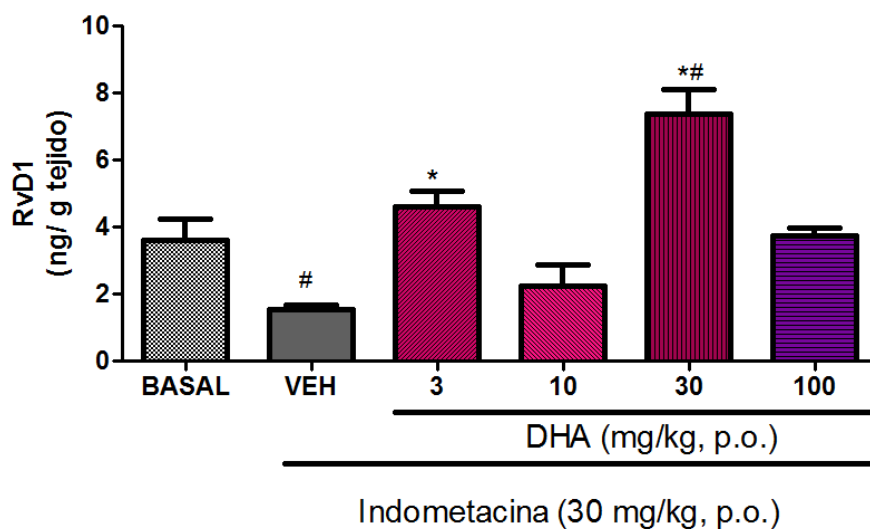
Tanto el grupo tratado con vehículo y dañado con indometacina, como los grupos pretratados con DHA y dañados con indometacina no reportaron una diferencia en los niveles de IL-1 $\beta$  (3868  $\pm$  128.7 ng/g, 3955  $\pm$  226.3 ng/g, 3680  $\pm$  376.6 ng/g, 3562  $\pm$  191.3 ng/g y 3728  $\pm$  172.8 ng/g de tejido para las dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o., respectivamente) ni presentó diferencia significativa entre ellos; además, ninguno de los grupos presenta una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo basal (aceite de oliva + NaHCO<sub>3</sub> 5%) (3690  $\pm$  186.4 ng/g) (Gráfica 14).



Gráfica 14. Niveles gástricos de IL-1 $\beta$ , en ng/ml, después del pre-tratamiento con DHA (3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o.) en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina (30 mg/kg p.o.) en ratones. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar (n = 6). \*P < 0.05 vs Vehículo. #P < 0.05 vs Basal.

#### 9.14 Cuantificación de los niveles de RvD1 en tejido gástrico de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico agudo inducido por indometacina.

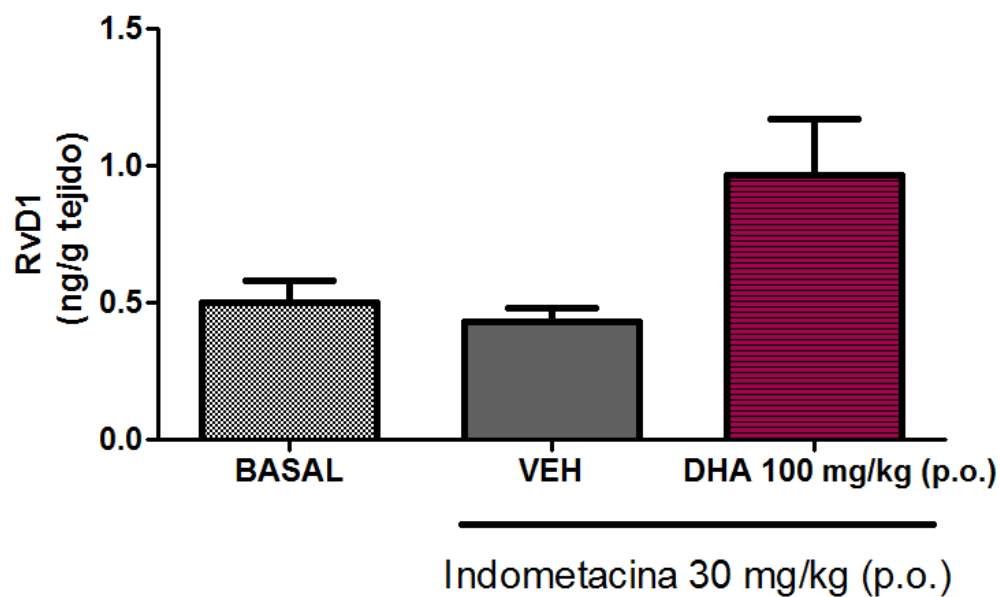
Los grupos pre-tratados con DHA a dosis de 10 y 100 mg/kg no mostraron un incremento de RvD1 estadísticamente significativo ( $2.21 \pm 0.64$  ng/g tejido y  $3.72 \pm 0.23$  ng/g tejido, respectivamente) en comparación con el grupo basal (aceite de oliva +  $\text{NaHCO}_3$  5%) ( $3.58 \pm 0.62$  ng/g tejido); mientras que los grupos pre-tratados con DHA a dosis de 3 y 30 mg/kg mostraron un incremento en los niveles de RvD1 ( $4.59 \pm 0.45$  ng/g tejido y  $7.35 \pm 0.75$  ng/g tejido, respectivamente), en comparación con el grupo dañado (aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg) ( $1.52 \pm 0.11$  ng/g tejido), además de que el grupo dañado presenta una disminución de los niveles de RvD1 en comparación con el grupo basal (AO+ $\text{NaHCO}_3$  5%) ( $3.58 \pm 0.62$  ng/g tejido) (Gráfica 15).



Gráfica 15. Niveles gástricos de RvD1, en ng/g tejido, después del pre-tratamiento con DHA (3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o.) en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina (30 mg/kg p.o.) en ratones. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar ( $n = 6$ ). \* $P < 0.05$  vs Vehículo. # $P < 0.05$  vs Basal.

9.15 Cuantificación de los niveles de RvD1 en tejido intestinal de ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño intestinal agudo inducido por indometacina.

El grupo pre-tratado con DHA a dosis de 100mg/kg no mostró una disminución en los niveles de RvD1 ( $0.96 \pm 0.20$  ng/g tejido), en comparación con el grupo dañado (aceite de oliva e indometacina 30 mg/kg) ( $0.42 \pm 0.05$  ng/g tejido) este grupo tampoco presenta diferencia estadísticamente significativa con los niveles de RvD1 en el grupo basal (aceite de oliva +  $\text{NaHCO}_3$  5%) ( $0.50 \pm 0.07$  ng/g tejido) (Gráfica 16).



Gráfica 16. Niveles intestinales de RvD1, en ng/g tejido, después del pre-tratamiento con DHA (100 mg/kg, p.o.) en el modelo de daño intestinal inducido por la administración de indometacina (30 mg/kg p.o.) en ratones. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar (n = 6). \*P < 0.05 vs Vehículo. #P < 0.05 vs Basal.

### 9.16 Expresión de GPR120 y GPR40 en el tejido gástrico después de la administración de DHA en el daño gastrointestinal generado por indometacina

Después de la obtención de extractos totales de las muestras del cuerpo del estómago de los grupos tratados con DHA vía oral (3, 10, 30 y 100 mg/kg) y con inducción de daño gástrico por la administración de indometacina (30 mg/kg), así como en condiciones basales y los respectivos vehículos, se comprobó la integridad de las proteínas obtenidas. Para ello se corrieron geles de acrilamida –SDS al 10 % en el que se colocaron 30 µg de cada extracto y se realizó Tinción de Coomasie. En la Figura 10 se muestran una imagen representativa de la calidad de los extractos totales, en donde se observa que hay una plena integridad de los mismos y no hay degradación.

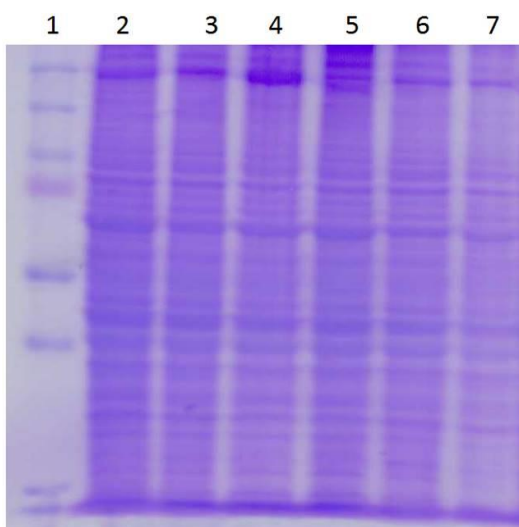


Figura 10. Imagen representativa de la integridad del extracto de proteínas totales del tejido gástrico del ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina en gel de acrilamida- SDS al 10% con Tinción de Coomasie. Carril 1 marcador de peso Carril 2 extracto total de estómago de ratón en condiciones basales, Carril 3 extracto total de estómago de ratón con indometacina 30 mg/kg, Carril 4 extracto total de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 3 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 5 extracto total de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 10 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 6 extracto total de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 30 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 7 extracto total de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 100 mg/kg e indometacina 30 mg/kg.

Posteriormente, se determinó en los extractos totales a través de la inmunodetección por la técnica de Western blot de la proteína GPR120 (FFAR 4) de 52 kDa; se realizó el análisis densitométrico con el programa image studio digits (Versión 4.0.21) y normalizando el nivel de proteína de actina en cada muestra (Figura 11).

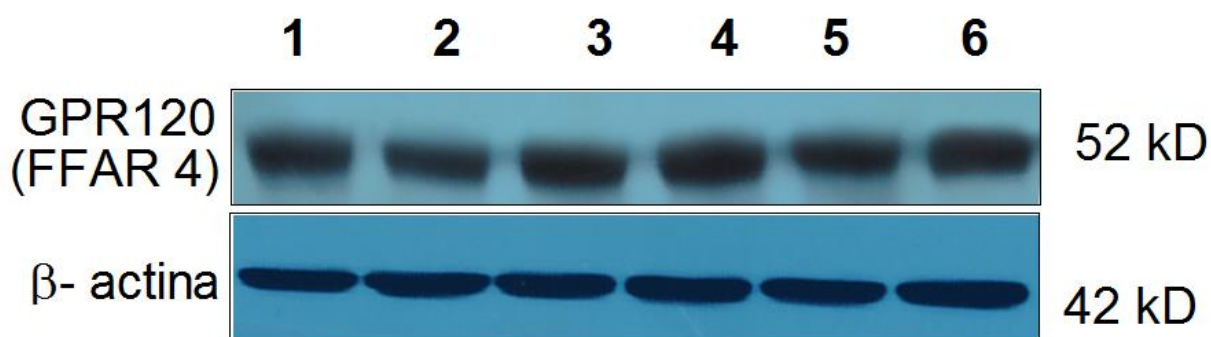
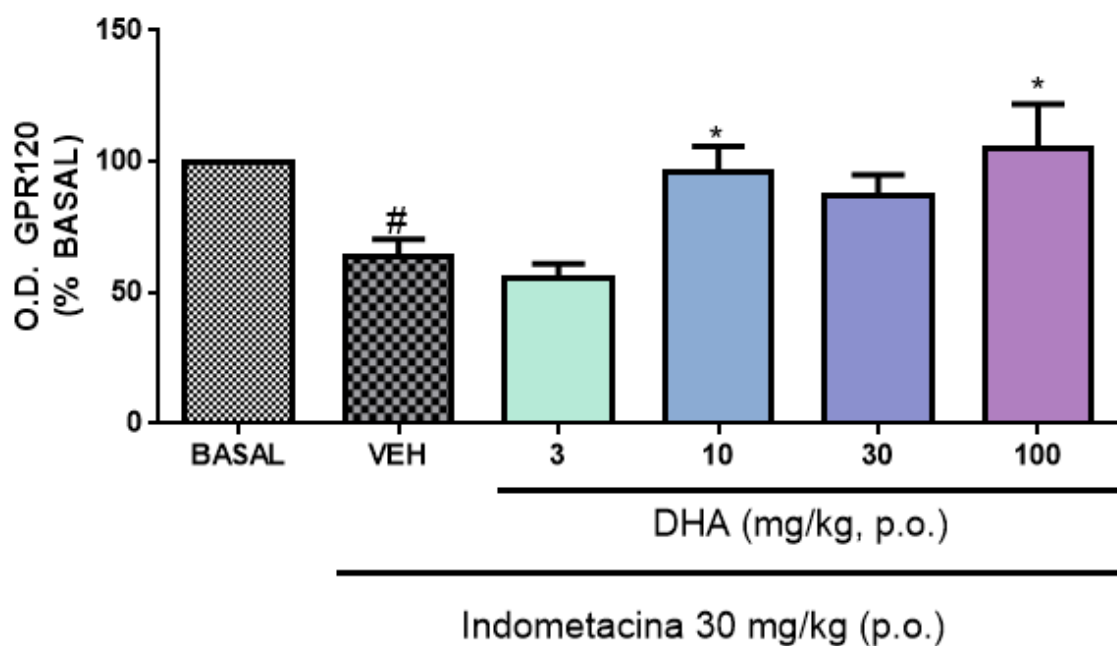


Figura 11. Imagen representativa de la expresión de GPR120 (FFAR 4) en tejido gástrico del ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina. Carril 1 extracto total de estómago de ratón en condiciones basales, Carril 2 extracto total de estómago de ratón con indometacina 30 mg/kg, Carril 3 extracto total de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 3 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 4 extracto total de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 10 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 5 extracto total de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 30 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 6 extracto total de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 100 mg/kg e indometacina 30 mg/kg.

En el análisis densitométrico de la expresión de GPR120 (FFAR 4) en tejido gástrico de ratones pre tratados con DHA vía oral (3, 10, 30 y 100 mg/kg) y con inducción de daño gástrico por la administración de indometacina en dosis única (30 mg/kg). Se observó una disminución estadísticamente significativa en la expresión de GPR120 (FFAR 4) en el grupo dañado con indometacina ( $64.08 \pm 6.34$  O.D. GPR120 en % de Basal) con respecto al grupo basal ( $100 \pm 6.34$  O.D. GPR120 en % de Basal). Además los grupos pre-tratados con DHA a dosis de 10 y 100 mg/kg mantienen los niveles basales de la expresión de GPR120 (FFAR 4) ( $96.05 \pm 9.79$  O.D. GPR120 en % de Basal y  $105.2 \pm 16.69$  O.D. GPR120 en % de Basal, respectivamente) siendo estadísticamente significativo en comparación con el grupo de daño (Gráfica 17).



Gráfica 17. Densitometría de los niveles de expresión de GPR120 (FFAR4) en densidad óptica (O.D.) en % de Basal, en tejido gástrico después del pre-tratamiento con DHA (3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o.) en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina (30 mg/kg p.o.) en ratones. Los datos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar (n = 6). \*P < 0.05 vs Vehículo. #P < 0.05 vs Basal.

Adicionalmente, se determinó en los extractos totales a través de la inmunodetección por la técnica de Western blot de la proteína GPR40 (FFAR 1) de 31 kDa y se realizó el análisis densitométrico con el programa image studio digits (Versión 4.0.21) normalizando con el nivel de proteína de actina en cada muestra (Figura 12).

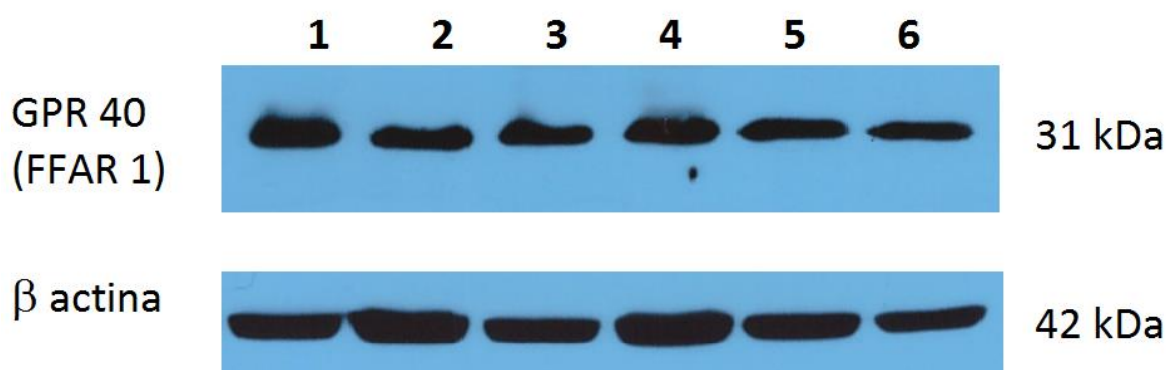
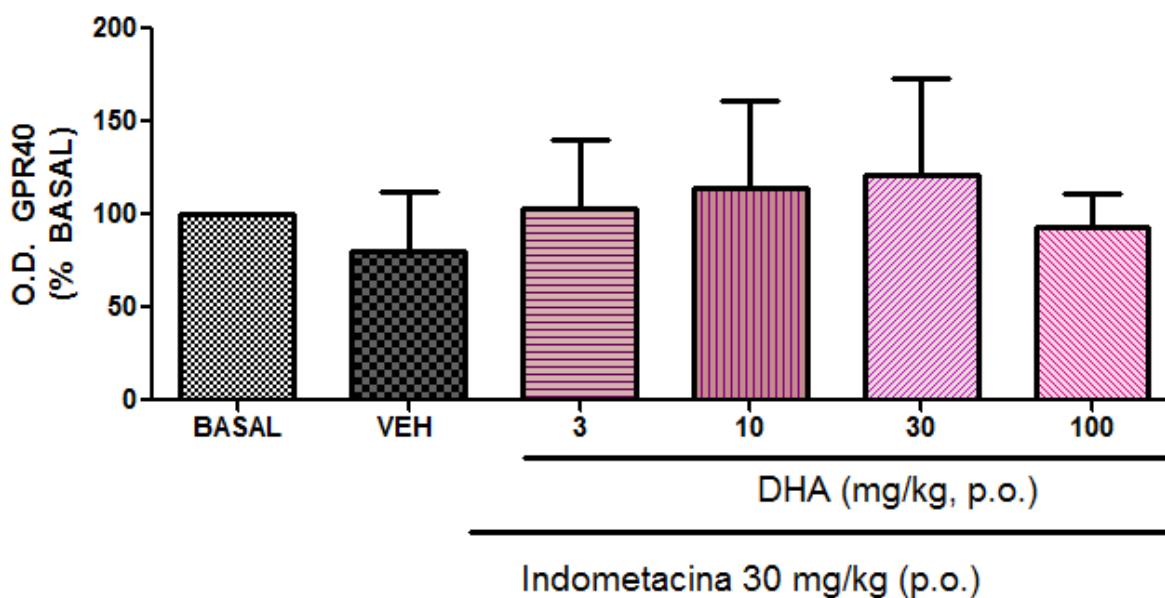


Figura 12. Imagen representativa de la expresión de FFAR1 (GPR40) en tejido gástrico del ratón después de la administración de DHA en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina. Carril 1 extracto total de estómago de ratón en condiciones basales, Carril 2 extracto total de estómago de ratón con indometacina 30 mg/kg, Carril 3 extracto total de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 3 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 4 extracto total de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 10 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 5 extracto total de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 30 mg/kg e indometacina 30 mg/kg, Carril 6 extracto total de estómago de ratón con pre-tratamiento DHA 100 mg/kg e indometacina 30 mg/kg.

En el análisis densitométrico de la expresión de GPR40 (FFAR 1) en tejido gástrico de ratones pre tratados con DHA vía oral y con inducción de daño gástrico por la administración de indometacina en dosis única (30 mg/kg). Tanto el grupo tratado con vehículo y dañado con indometacina, como los grupos pretratados con DHA y dañados con indometacina (63.69 ± 7.67 O.D. GPR40 en % de basal, 74.87 ± 18.56 O.D. GPR40 en % de basal, 87.31 ± 35.27 O.D. GPR40 en % de basal, 88.88 ± 20.53 O.D. GPR40 en % de basal y 100 ± 12.57 O.D. GPR40 en % de basal, para las dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o., respectivamente), no reportaron una diferencia en la expresión de GPR40 (FFAR 1) con respecto al grupo basal (aceite de oliva+ NaHCO<sub>3</sub> 5%)(100 ± 0.0 O.D. GPR40 en % de basal) (Gráfica 18).



Gráfica 18. Densitometría de los niveles de expresión de GPR40 (FFAR 1) en densidad óptica (O.D.) en % de Basal, en tejido gástrico después del pre-tratamiento con DHA (3, 10, 30 y 100 mg/kg, p.o.) en el modelo de daño gástrico inducido por la administración de indometacina (30 mg/kg p.o.) en ratones. Los datos son expresados como la media ± el error estándar (n = 6). \*P < 0.05 vs Vehículo. #P < 0.05 vs Basal.



## 10.- DISCUSIÓN

La toxicidad gastrointestinal asociada al consumo de los fármacos anti inflamatorios no esteroideos es considerada "epidemia silenciosa" que enfatiza la urgente necesidad de desarrollar nuevas terapias que mejoren la tolerabilidad de los AINEs sin comprometer su eficacia terapéutica (Abramson and Weaver, 2005; Davies and Wallace, 1997). El presente estudio demuestra que la administración oral de indometacina, uno de los AINEs más representativo de este grupo de fármacos (Chanudom and Tangpong, 2015; Souza et al., 2004; Wallace et al., 2011a), genera un área de daño gástrico de manera dosis dependiente como se comprobó en el curso temporal de la administración aguda de indometacina; diversos reportes mencionan, que la alta tasa metabólica de las ratas en comparación con los ratones, hace que la dosis ulcerogénica de indometacina pueda alcanzarse con un tiempo más prolongado en el ratón, en lugar de las 3 h para rata (Burdge, 2004; Wallace et al., 2011b; Yadav et al., 2012). Por ello, el tiempo empleado (5 horas) después de la administración de indometacina utilizado en este estudio, suele ser suficiente para la expresión y participación de todas las moléculas implicadas en el daño, así como el desarrollo de lesiones de características hemorrágicas y puntuales en ratón (Souza et al., 2004; Wallace et al., 2011b).

Nuestra investigación, además de concordar con estudios previos sobre el efecto gastroprotector que poseen los ácidos grasos poliinsaturados (Al-Harbi et al., 1995; Bhattacharya et al., 2006; Connor, 2000; Manjari and Das, 2000); demuestra que la administración de DHA como compuesto puro, ejerce efecto gastro y enteroprotector ante el daño generado por AINEs como la indometacina; destacando que dicho efecto, es generado en un esquema de una sola administración, ya que la vía de administración empleada en nuestra metodología (vía oral por medio de una cánula orogástrica) asegura que la totalidad del compuesto administrado llegue a estómago. Además, en este estudio demostramos que el efecto gastro y enteroprotector del DHA fue comparable con el efecto que posee el omeprazol a nivel gástrico y más efectivo que este a nivel intestinal. Lo anterior es muy importante, tomando en consideración que hasta la fecha, no se han

reportado efectos tóxicos o adversos de algún tipo asociados a la administración de DHA, al contrario de los efectos adversos reportados por el uso crónico con omeprazol como el caso de la disbiosis (Wallace et al., 2011a) y a la posibilidad de efectos adversos tales como fracturas de cadera, deficiencia de hierro y cobalamina entre otros (Thomson et al., 2010). Recientemente, la co-administración de un inhibidor de la bomba de protones en combinación con un AINE de manera crónica se ha propuesto como un modelo experimental para evidenciar el daño intestinal generado por la terapéutica más comúnmente empleada ante el daño gástrico por AINEs (Singh et al., 2016). Los resultados obtenidos en nuestro estudio destacan que el efecto gastroprotector del DHA no tuvo una diferencia estadísticamente significativa con el efecto gastroprotector generado por el omeprazol; e incluso fue mejor que este a nivel intestinal. Por ello, nuestros resultados apoyan la idea de utilizar al DHA como una potencial alternativa terapéutica para la prevención de las lesiones gástricas e intestinales inducida por AINEs, sin que esto comprometa la acción terapéutica de los mismos, ya que estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han reportado la interacción sinérgica y seguridad gástrica en el efecto antinociceptivo de la indometacina (Arroyo-Lira et al., 2014).

Diversos estudios han identificado otros mecanismos de daño gástrico generado por AINEs que son independientes a la inhibición de las COXs y prostaglandinas (Appleyard et al., 1996; Bindu et al., 2013; Wallace, 2008). Recientemente, se ha reportado que el daño gástrico generado por AINEs está asociado a una respuesta inflamatoria (Bindu et al., 2013; Odashima et al., 2006; Watanabe et al., 2004), donde la infiltración de neutrófilos juega un papel crucial en las primeras etapas del daño gástrico generado por indometacina (Asako et al., 1992; Morise et al., 1999), por ello en este estudio se decidió analizar a varias moléculas pro-inflamatorias implicadas en la infiltración de leucocitos y su dinámica en presencia del pre-tratamiento con DHA.

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima liberada por los neutrófilos en el sitio de lesión, de manera que su cuantificación nos permite de forma indirecta medir la infiltración y activación de neutrófilos (Bindu et al., 2013; Jung et al., 2012; Martin and Wallace, 2006).

Se ha reportado un incremento en los niveles de MPO en tejido gástrico tras la administración de indometacina (Santos et al., 2005; Yan et al., 2011). Los resultados de nuestra investigación corroboran el incremento en los niveles gástricos de MPO tras la administración de indometacina reportado con anterioridad (Santos et al., 2005), correlacionando este incremento de MPO con la presencia de neutrófilos ya sea por adherencia o infiltración (Santana et al., 2015); resaltando que el pre-tratamiento con DHA (a dosis de 30 y 100 mg/kg) disminuye los niveles de la MPO inclusive más que los niveles basales. Se ha reportado que el neutrófilo contiene al menos cuatro tipos de gránulos, que se diferencian en función de su contenido proteico (Pechous, 2017); las vesículas secretoras son las primeras en liberarse y dan como resultado activación de un mecanismo de defensa ante agentes patógenos muy sutil como por ejemplo una vasodilatación que permita disipar sustancias nocivas; en caso de fallar, su interacción con el patógeno da como resultado la liberación de los gránulos terciarios (gelatinasas), secundario (proteasas) y finalmente los primarios, considerados la respuesta final y letal de un neutrófilo (Futosi and Mócsai, 2016; Grommes and Soehnlein, 2011; Mantovani et al., 2011; Pechous, 2017). Sin embargo, en nuestra investigación solo se miden los niveles de MPO liberados en la respuesta citotóxica final del neutrófilo; por lo tanto nuestra investigación revela que probablemente el DHA es capaz de permitir la menor respuesta inflamatoria eficaz, sin comprometer el tejido cercano. Aunque, hasta el momento no hay reportes de los efectos de los omega-3 sobre la MPO en tejido gástrico en modelos experimentales y existen estudios como el de Andersen et al., en 2010, efectuado en humanos sanos en el que se indica que después de 12 semanas de ingesta de omega-3 no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los niveles basales de MPO (Andersen et al., 2010). Por otra parte tenemos estudios como Raederstorff et al., 1996 donde una dieta rica en Omega-3 modifica la actividad de la MPO en un modelo murino de inflamación (Raederstorff et al., 1996); también estudios como el de Liu et al., en 2014 que demuestra in vitro que uno de los productos del DHA (denominado PDX) disminuye los niveles de MPO y ROS en neutrófilos (Liu et al., 2014); y finalmente estudios como el de Norling et al., 2012 donde la resolvina D1 derivada del DHA reduce la

infiltración de neutrófilos en un modelo *in vitro*, en el cual la reducción fue estadísticamente significativa con respecto a los niveles basales e (Norling et al., 2012). Por ello, nuestros resultados permiten sugerir la capacidad que posee el DHA para reducir la adherencia de los neutrófilos en el daño gástrico generado por indometacina en este modelo, lo cual se ve reflejado en la disminución de la MPO.

El daño gástrico generado por AINEs involucra entre sus mecanismos, la adherencia de leucocitos al endotelio vascular y su reclutamiento al sitio de lesión, mediado principalmente por el LTB<sub>4</sub> (Wallace and Ma, 2001). Al respecto, nuestro estudio histopatológico confirmó que la administración de indometacina (30 mg/kg, p.o.) daña la capa superficial de la mucosa gástrica, y genera una interrupción considerablemente profunda de las glándulas de la mucosa gástrica que se acompaña de congestión celular, en comparación con el grupo en condiciones basales (Chen et al., 2016; Wallace and Ma, 2001); lo que se correlaciona con el daño gástrico generado y los niveles de mieloperoxidasa cuantificada en este estudio. Se ha reportado que existe un incremento del LTB<sub>4</sub> tras la administración de indometacina (Chavez-Pina et al., 2009; Choi et al., 2014) y que una disminución en estos niveles correlaciona con el efecto gastroprotector de diversos agentes (Choi et al., 2014; Wallace et al., 2011a; Wallace and Ma, 2001); nuestros resultados a nivel gástrico mostraron un incremento de LTB<sub>4</sub> en el grupo dañado con indometacina y una disminución de los niveles de LTB<sub>4</sub> en los grupos pre-tratados con DHA, indicando una respuesta inflamatoria mínima. Este resultado, concuerda con estudios como el de Norling et al., 2012 donde la resolvina D1 derivada del DHA limita la infiltración de neutrófilos en un estudio *in vitro* y en el cual se sugiere que las resolvinas reducen la producción de potentes prostanoides pro-inflamatorios derivados de las ciclooxigenasas como LTB<sub>4</sub> (Norling et al., 2012). Se ha reportado que el DHA reduce la producción de LTB<sub>4</sub> en un estudio *in vivo* de una enfermedad crónica de carácter inflamatorio como la dermatitis atópica (Yoshida et al., 2016), estos datos sugieren que la disminución del LTB<sub>4</sub> mediada por el DHA en procesos inflamatorios es un punto clave en el mecanismo de acción de los omega-3.

Para desencadenar la adherencia de los neutrófilos desde la microcirculación al endotelio vascular del tejido gástrico, uno de los pasos cruciales es la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 (Caterina et al., 2000; Cook-Mills et al., 2011; Wallace and McKnight, 1993), ya que esta molécula es el principal responsable de proporcionar un enlace estable entre los neutrófilos y el endotelio (Okada et al., 1998). En nuestros experimentos se observó un incremento en la expresión gástrica de ICAM-1 después de la administración de indometacina tal como se ha reportado con anterioridad (McCafferty et al., 1995; Yadav et al., 2012; Yan et al., 2011); pero más importante aún es que también demostramos que el pre-tratamiento con DHA logra prevenir el incremento en la expresión de ICAM-1 en el tejido gástrico; este resultado coincide con estudios que indican que los omega-3 o los mediadores derivados de estos, reducen la expresión de ICAM-1 en modelos de daño tisular (Brooks et al., 2013; Huang et al., 2015; Nordgren et al., 2014). Es importante mencionar que, la reducción en la infiltración de neutrófilos en el pre-tratamiento con DHA en el tejido gástrico que se observó en los cortes histológicos, es consistente con la reducción en los niveles de MPO, LTB<sub>4</sub> e ICAM-1 y proporcional con el efecto gastroprotector que presentó el pre-tratamiento con DHA a nivel gástrico. Asimismo, este es el primer reporte que indentifica una disminución de ICAM-1 después de la administración de DHA en un modelo de daño gástrico.

Además de las moléculas de adhesión en el endotelio y los receptores de estas moléculas presentes en los leucocitos, la especificidad de las acciones de los leucocitos en el tejido es regulado por las citocinas presentes en el microambiente (Cook-Mills et al., 2011). IL-1 $\beta$  es una de las citocinas proinflamatorias más importantes que usualmente está involucrada en el reclutamiento de neutrófilos al sitio de lesión, activación de moléculas de adhesión, así como la inducción de otras citocinas (Sahoo et al., 2011). Los resultados obtenidos revelan que ni la administración oral de indometacina ni la administración oral de DHA modifican los niveles gástricos de IL-1 $\beta$ . Sin embargo, es importante mencionar que aunque se ha evidenciado la participación de IL-1 $\beta$  en el daño generado por AINEs (Martin and Wallace, 2006); hasta el momento no se habían medido los niveles de IL-1 $\beta$  por ELISA

en este modelo de daño. La cuantificación por esta técnica, se reportó recientemente en el daño gástrico generado por estrés (Ohta et al., 2017) y etanol (Al-Quraishy et al., 2017; Wang et al., 2015) donde existe un ligero incremento en el tejido gástrico dañado y al igual que nuestro estudio las concentraciones reportadas son en magnitud de picogramo por gramo de tejido (Wang et al., 2015). Al respecto, se ha documentado que tras una administración en bolo de  $Il-1\beta$  (100 mg/kg, i.v) en ratas de la cepa SD (Kudo et al., 1990) tuvo una vida media de eliminación de 1.59 h; además se conoce que se distribuye y puede llegar a actuar en tejidos diferentes a los que fue producida (Lopez-Castejon and Brough, 2011b) teniendo predilección por riñón en donde se ha sugerido es su principal sitio de degradación metabólica (Kudo et al., 1990). Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado y que además existe bibliografía que reporta que la  $Il-1\beta$  incrementa la resistencia al daño gástrico en diversos modelos, esto debido a su habilidad de estimular la liberación de óxido nítrico y prostaglandinas (Perretti et al., 1992; Wallace and Ma, 2001). Los resultados obtenidos en esta investigación nos permiten concluir que la activación de la vía inflamatoria, es debido a la participación de otras moléculas pro-inflamatorias distintas a  $Il-1\beta$ .

Por otro lado, se ha identificado a  $TNF-\alpha$  como una de las moléculas más activas en el daño gástrico generado por AINEs, ya que además de promover la secreción de otras moléculas pro inflamatorias, el  $TNF-\alpha$  también está encargado del reclutamiento de leucocitos al endotelio vascular (Martin and Wallace, 2006; Wallace and Granger, 1996). En consecuencia, decidimos determinar si el DHA desempeña un papel importante en la modulación de los niveles gástricos de  $TNF-\alpha$  y, por lo tanto su papel indirecto en la disminución del reclutamiento de neutrófilos. Estudios previos han reportado un incremento en los niveles gástricos de  $TNF-\alpha$  después de la administración de indometacina (Zhang et al., 2008). Al cuantificar los niveles de  $TNF-\alpha$  en tejido gástrico, se obtuvo que el pre-tratamiento con DHA logra mantener los niveles basales de  $TNF-\alpha$  mientras que se encontró un incremento de dichos niveles tras la administración de indometacina, sugiriendo que el DHA podría modular el  $TNF-\alpha$ , aunque el mecanismo

preciso por el cual esto ocurre no ha sido reportado hasta el momento. Los resultados obtenidos sobre el DHA y sus efectos en el TNF- $\alpha$ , son consistentes con la disminución del reclutamiento de neutrófilos y los niveles de MPO, LTB<sub>4</sub> e ICAM-1 en tejido gástrico que el pre-tratamiento con DHA generó en el tejido gástrico inclusive ante la administración de indometacina. Al respecto, diversos estudios sugieren que la administración crónica de aceite de pescado en ratones, disminuye la producción de TNF- $\alpha$ , Il-1 $\beta$  e Il-6 en macrófagos que inclusive han sido estimulados con endotoxina (Renier, Skamene, DeSanctis, & Radzioch, 1993; Yaqoob & Calder, 1995); por lo que nuestros resultados apoyan la idea de que los omega-3 como el DHA logran la modulación de citocinas pro-inflamatorias.

Adicionalmente se ha reportado que el TNF- $\alpha$  tiene la capacidad de facilitar la activación del factor nuclear NF $\kappa$ B, en una acción mediada por alguna de las vías activadas por los receptores tipo Toll (TLRs)(Baud and Karin, 2001; Kawai and Akira, 2007; Lee et al., 2003); e incluso se ha reportado en el daño gástrico generado por indometacina que la activación del NF $\kappa$ B está relacionada con la respuesta inflamatoria subsecuente y el reclutamiento de neutrófilos (Bindu et al., 2013; Yadav et al., 2012). Por ello, se decidió investigar si la activación del NF $\kappa$ B es el punto clave que asocia al pre-tratamiento con DHA y la prevención del incremento de los niveles de TNF- $\alpha$ . Se ha reportado que NF $\kappa$ B es inhibido en citoplasma por un complejo inhibitorio de  $\kappa$ B (I $\kappa$ Bs), el cual al fosforilarse permite la translocación de NF $\kappa$ B a núcleo (Ghosh and Dass, 2016; Oh et al., 2010); por ello, se llevó a cabo la purificación de nuestros extractos para asegurarnos de obtener solamente el NF $\kappa$ B que se encuentra activo en núcleo. Nuestros resultados demuestran que existe un incremento de la translocación nuclear del NF $\kappa$ B en tejido gástrico tras la administración oral de indometacina que además de concordar con algunos reportes previos (Bindu et al., 2013; Martin and Wallace, 2006) se correlaciona con el incremento en la infiltración de neutrófilos observado en la mucosa gástrica. Resaltando que el pretratamiento con DHA logró mantener en niveles basales la actividad de NF $\kappa$ B aun en presencia del daño por indometacina; siendo muy importante destacar que este resultado concuerda con los

recientes reportes que indican que el DHA puede inhibir la actividad o la expresión del NFκB en macrófagos derivados de la médula ósea estimulados con lipopolisacáridos (BMDMs), células dendríticas, macrófagos TPH-1 y macrófagos derivados de célula ósea con un cebador de LPS (Calder, 2015; Harvey et al., 2015; Yang et al., 2014). Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que el efecto gastroprotector del DHA, se lleva a cabo por la modulación de la infiltración de neutrófilos y esta acción es mediada por la regulación de una vía que involucra la expresión de LBT<sub>4</sub>, TNF-α, ICAM-1 y la activación de NFκB.

Por otra parte, se ha reportado la presencia de compuestos denominados resolvinas mediante el análisis lipídico de exudados inflamatorio en fase resolutive, los cuales derivan de ácidos grasos omega-3 y que son denominados mediadores especializados pro-resolutivos (SPMs) (Fredman and Serhan, 2011; García Rodríguez and Barreales Tolosa, 2007), entre los que se encuentran al menos 4 tipos de resolvinas de la serie D (RvD)(Serhan et al., 2007; Serhan and Chiang, 2009). Estas resolvinas son mediadores de carácter lipídico que diversas investigaciones reportan como los responsables de la mayoría de las propiedades benéficas de los omega-3, entre ellas sus propiedades pro-resolutivas y la limitación de la infiltración de polimorfonucleares en modelos de inflamación (Seki et al., 2010). Esto a través de acciones que regulan la expresión de genes implicados en la regulación del proceso inflamatorio como lo serian la regulación de factores nucleares, vías del Adenosín monofosfato cíclico (AMPC) así como de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (Buckley et al., 2014; Calder, 2013). Debido a lo anterior se consideró importante cuantificar los niveles de RvD1 en el tejido gástrico después del pre-tratamiento con DHA y la inducción de daño con indometacina; obteniendo que el pre-tratamiento con DHA genera un incremento en los niveles de RvD1 en las dosis de 3 y 30 mg/kg de DHA incluso ante el daño generado por indometacina, mientras que el grupo dañado con indometacina presenta una disminución de los niveles de RvD1 en comparación con el grupo basal. Al respecto, podemos decir que la resolvina D1 derivada del DHA sería parcialmente responsable del efecto gastroprotector del DHA; ya que diversos autores como Serhan et al., en 2010 y Weylandt et al., en 2012,



mencionan que se ha identificado que las resolvinas interactúan con los receptores AXL y ChemR23 en la superficie del neutrófilo, por lo que este podría ser un posible mecanismo por el cual el DHA ejerce su efecto gastroprotector (Serhan, 2010; Weylandt et al., 2012). Por otra parte se ha reportado que las resolvinas tienen remarcables acciones anti-inflamatorias y pro-resolutivas en diversos modelos inflamatorios como artritis (Lima-Garcia et al., 2011), colitis (Arita et al., 2005) y asma (Zambalde et al., 2016); lo que involucra una variedad de tipos celulares incluyendo neutrófilos, macrófagos, monocitos y células T (Calder, 2015; Fiorucci et al., 2001). Además, se ha reportado que la resolvina D1 (RvD1) participa en antinocicepción (Bang et al., 2012; Nakamoto et al., 2010), citoprotección en modelos de daño por isquemia-reperfusión (Kang and Lee, 2016), e incluso en mejorar condiciones como obesidad (Rius et al., 2014) y diabetes mellitus tipo 2 (Tang et al., 2013); pero cabe mencionar que hasta el momento no se había relacionado a esta molécula con el efecto gastroprotector.

Nuestros resultados demuestran por primera vez que la administración de indometacina puede reducir los niveles gástricos de RvD1 de manera significativa y más importante aún que el pre-tratamiento con DHA logra prevenir esta disminución de los niveles de RvD1; por lo que podríamos concluir incluso que el DHA es un precursor de la producción de RvD1, al menos en tejido gástrico. Aunque los mecanismos por los cuales ocurre la biosíntesis de los SPMs como RvD1 e inclusive sus mecanismos regulatorios no se han elucidado en su totalidad (Lehmann et al., 2015). Se conoce que la síntesis de resolvinas involucra las vías de las COXs y Lipoxigenasas (LOX) (Calder, 2015, 2013), estas vías se activan gracias a el contacto transcelular; por lo tanto, la biosíntesis de resolvinas depende de la disponibilidad enzimática e incluso la presencia de ciertos tipos celulares por ejemplo los neutrófilos (Calder, 2015; Chiurchiù et al., 2016; Fiorucci et al., 2001). Esto último explicaría que el incremento en los niveles de RvD1 después del tratamiento con DHA no tuviera un comportamiento dosis-dependiente, ya que todas las dosis probadas indujeron un incremento de los niveles de RvD1. Al respecto, se ha reportado que existen al menos 5 resolvinas importantes en la serie D (RvD1, RvD2, RvD3, RvD4 y RvD5), donde cada una tiene un tiempo de producción único dependiendo del contexto tisular en el que

se encuentren (Serhan, 2014) que suele depender del tiempo inflamatorio en el que se encuentre dicho tejido (Dalli et al., 2013). Sin embargo, consideramos que es necesaria una mayor comprensión de sus mecanismos de acción para poder asociarlo definitivamente a dicho efecto; para ello la producción de resolvinas necesitaría ser estudiada con métodos más especializados que permitieran establecer los tiempos exactos de producción en el contexto inflamatorio, así como la acción específica de cada una de las resolvinas en procesos inflamatorios in vivo (Dalli et al., 2013), ya que se ha reportado la acción de dosis nanomolares en la resolución de la inflamación (Calder, 2015; Fiorucci et al., 2001). Así mismo, nuestros resultados respaldan diversos estudios que indican la habilidad de la RvD1 para reducir la expresión de LTB<sub>4</sub> (Nauroth et al., 2010), liberación de TNF- $\alpha$  (Abdelmoaty et al., 2013; Seki et al., 2010), expresión de ICAM-1 (Bento et al., 2011; Lee et al., 2013), translocación nuclear de NF $\kappa$ B (Eickmeier et al., 2013) y en consecuencia la reducción de la infiltración de neutrófilos (Abdelmoaty et al., 2013; Seki et al., 2010) como ha sido reportado en modelos de inflamación como peritonitis (Norling et al., 2012), colitis (Bento et al., 2011; Lee et al., 2013) e inflamación inducida por hipersensibilidad mecánica (Abdelmoaty et al., 2013).

Recientemente se ha sugerido que los receptores de ácidos grasos libres (FFAR, por sus siglas en inglés) son los blancos moleculares para los efectos anti-inflamatorios de los ácidos grasos omega 3, esta nueva familia de receptores pertenece a los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (Calder, 2015; Im, 2012), los cuales incluyen a FFAR 1 (conocido también como GPR40) y FFAR 4 (conocido como GPR120) (Calder, 2015). Se conoce que FFAR 1 (GPR40), un receptor de dominio transmembranal acoplado a proteína G, es expresado en diversos tejidos, pero principalmente en sistema nervioso central y células  $\beta$  del páncreas (Mancini et al., 2015; Yamashima, 2015). En la actualidad los estudios evidencian que FFAR 1 (GPR40) permite la regulación de diversas sustancias como insulina (Burant 2013; Sartorius et al. 2015), noradrenalina (Aizawa et al. 2016) e incretinas (Hauge et al. 2015); además, está involucrado en procesos como osteogénesis (Gao et al. 2015), regulación de la transmisión nociceptiva espinal (Kurihara and Miyata, 2015; Nakamoto and Tokuyama, 2015), plasticidad neuronal (Yamashima, 2015), control

del dolor (Nakamoto and Tokuyama, 2015) y metabolismo de la glucosa (Huang et al., 2014; Mancini et al., 2015; Tang et al., 2013). Las vías de señalización por las cuales se llevan a cabo estos procesos no han sido explicados, sin embargo, las acciones de FFAR 1 se han relacionado con su activación por ácidos grasos omega-3 (Ma et al., 2010; Milligan et al., 2015). Nuestros resultados demuestran que FFAR 1 (GPR40) no está involucrado en el efecto gastroprotector del DHA (Gráfica 20), aunque existen diversos estudios que indican su posible participación en la disminución de procesos inflamatorios en otros tejidos (Nakamoto et al., 2013; Yan et al., 2013).

Es importante señalar que FFAR 1 y FFAR 4 son expresados en el tracto gastrointestinal (Mobraten et al., 2013); sin embargo, solo FFAR 4 (GPR120) se expresa ampliamente en los macrófagos durante la inflamación (Calder, 2015). Estudios in vitro han propuesto que el efecto inhibidor del DHA sobre la actividad del NFκB ocurre a través de una vía mediada por FFAR 4 (Calder, 2013; Mobraten et al., 2013; Oh and Olefsky, 2012), donde ocurre la inhibición de la cinasa 1 activadora del factor transformador del crecimiento transformante beta (TAK1); esto debido a que la activación de TAK1 estimula al receptor tipo Toll 4 (TLR4) y la vía de señalización de TNF-α así como al complejo inhibitorio de κB (IκBs), la activación de cualquiera de estas vías permite la translocación nuclear y activación de NFκB (Ghosh and Dass, 2016; Oh et al., 2010). Dichos estudios in vitro demuestran los mecanismos por los cuales ocurre la inhibición de NFκB y TNF-α mediante la acción de los omega-3 sobre el receptor FFAR4 (GPR120) (Im, 2012; Mobraten et al., 2013; Oh et al., 2010). Lo anterior nos permite explicar la inhibición de NFκB y la disminución de los niveles TNF-α en el tejido gástrico generado por el pre- tratamiento con DHA que se observó en nuestros resultados y correlacionarlo con el incremento de la expresión de FFAR 4 (GPR120) que observamos en nuestra investigación (Gráfica 19). En cuanto al DHA, los estudios recientes ha demostrado que la inhibición de la infiltración de neutrófilos y su acumulación en los tejidos durante la inflamación se debe a la incorporación del DHA a las membranas (Calder, 2013; Nordgren et al., 2014; Sorensen et al., 2014), esto en consecuencia modifica la fluidez de la membrana que altera la

interacción del leucocito con las células endoteliales y probablemente de otras células que participan en el proceso inflamatorio (Healy et al., 2000; Martins de Lima et al., 2007; Rodrigues et al., 2016). Más importante aún, se ha propuesto que algunos ácidos grasos incluido el DHA, podrían regular la actividad de las vías intracelulares mediante diversos mecanismos (Martins de Lima et al., 2007); en los que estarían involucrados los receptores acoplados a proteína G para ácidos grasos (FFAR) (Buckley et al., 2014; Calder, 2015, 2013). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el efecto gastroprotector del DHA se lleva a cabo mediante mecanismos que modulan el reclutamiento de leucocitos e inclusive su actividad, donde muy probablemente la producción y participación de resolvinas estén estrechamente relacionadas con las vías reguladas por los receptores acoplados a proteína G identificados para los ácidos grasos libres como FFAR 4 (GPR120), sin embargo la finalidad de este estudio es identificar a las moléculas implicadas en la cascada inflamatoria que son excretadas al intersticio, mas no discernir cuáles son las vías de señalización específicas que son modificadas tras el tratamiento con DHA, ya que para ese fin se necesitarían emplear metodologías *in vitro*.

Existen compuestos naturales que no comparten similitudes con la estructura química del DHA, y de los cuales se ha reportado su efecto gastroprotector en el daño gástrico generado por indometacina como son Trigonelina (Antonisamy et al., 2015), Cochinchina momordica (Lim et al., 2014), Buddleja scordiodes (Díaz-Rivas et al., 2015) y Curcumina (Thong-Ngam et al., 2012); donde los principales mecanismos gastroprotectores incluyen acciones anti-inflamatorias en las cuales se modulan los niveles de MPO (Lim et al., 2014), LTB<sub>4</sub> (Antonisamy et al., 2015), TNF- $\alpha$  (Díaz-Rivas et al., 2015) y la expresión de ICAM-1 (Thong-Ngam et al., 2012) e inclusive la regulación de NF $\kappa$ B (Carrasco-Pozo et al., 2016). Evidenciando así que el efecto gastroprotector de cualquier agente debe involucrar la modulación de la moléculas que participan en la actividad inflamatoria. También es importante mencionar que aunque la regulación de la respuesta inflamatoria del DHA está bien documentada en modelos neuropatológicos (Ajami et al., 2013; Harvey et al., 2015; Mayurasakorn et al., 2011b), hasta el momento solo existe un reporte relacionado

con la administración crónica de PUFAs n-3 en el daño gástrico generado por indometacina efectuado en ratones transgénicos *fat-1* (Han et al., 2016). Sin embargo, en dicho estudio solo se reportaron los mecanismos del EPA; además se ha documentado que el DHA y el EPA pueden tener efectos independientes cuando se prueban por separado en un mismo modelo (Anderson and Ma, 2009; Mayurasakorn et al., 2011b; Mozaffarian and Wu, 2012; Sublette et al., 2011). Por lo tanto consideramos que el presente estudio proporciona una mayor comprensión de los efectos individuales del DHA ante el daño gástrico generado por indometacina.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el mecanismo por el cual el DHA genera un efecto gastroprotector se lleva a cabo a diferentes niveles. Primero, podría servir como un sustrato alternativo al ácido araquidónico generando eicosanoides menos potentes y por lo tanto reduciendo la producción de LTB<sub>4</sub>; también podría inhibir la activación de moléculas pro-inflamatorias o la transcripción de genes pro-inflamatorios como en el caso de TNF- $\alpha$ , además el DHA puede servir como sustrato para la producción de mediadores especializados pro-resolutivos (SPMs) como las resolvinas que finalmente podrían alterar la interacción endotelio-vascular que permite la adherencia entre los leucocitos y las células endoteliales reduciendo la infiltración de leucocitos, en conjunto con la disminución de ICAM-1 y LTB<sub>4</sub>. Todos estos mecanismos podrían ser mediados en parte por GPR120 (FFAR 4) un receptor acoplado a proteína G que al ser activado por el DHA o las resolvinas permitirían una vía de señalización que modifique y reduzca la activación o expresión de las moléculas involucradas en la infiltración de leucocitos. Considerando los resultados obtenidos en esta investigación y la extensa literatura consultada acerca del tema, hemos propuesto un esquema que intenta explicar el mecanismo gastroprotector del DHA de una forma lógica (Figura 13) donde la producción de Resolvina D1 y la participación del receptor para ácidos grasos libres FFAR 4 nos permiten integrar los resultados obtenidos.

Recientemente, se ha reconocido que además del proceso inflamatorio, existe la posibilidad de que la producción de radicales libres y el estrés oxidativo subsecuente,

estén asociados con la activación del proceso inflamatorio en el tejido gastrointestinal dañado (Bindu et al., 2013). Debido a que se ha asociado al DHA con la disminución de malondialdehído (MDA) en hígado, así como un incremento de la expresión de superóxido dismutasa (SOD) en riñón (Ajami et al., 2013), catalasa (CAT) en corazón (Jahangiri et al., 2006) y glutatión (GSH) en cerebro (Hossain et al., 1999). Al respecto, en nuestro grupo de trabajo Martínez - Pérez en 2015 reporta que el pre-tratamiento con DHA (100mg/kg, p.o.) logra modificar los marcadores de estrés oxidativo como SOD y GSH, así como los niveles de marcadores de peroxidación lipídica como MDA y grupos carbonilo con respecto a ratones tratados con indometacina (30 mg/kg, p.o.). Por ello, dichos resultados junto con los resultados obtenidos en esta investigación, son los primeros en reportar y proponer mecanismos implicados en el efecto gastroprotector del DHA.

Por otra parte, es importante mencionar existen reportes que indican que el aceite de pescado o una dieta suplementada con ácidos grasos omega-3 tienen un efecto citoprotector en intestino en modelos murinos de isquemia-repercusión, (Brahmbhatt et al., 2013), colitis inducida por 5-fluorouracil (Generoso et al., 2015), colitis infecciosa (Ghosh et al., 2013) e inclusive se ha reportado que humanos que consumen de aceite de pescado reducen significativamente riesgos intestinales (Kantha, 1987); debido a lo anterior se decidió investigar si el efecto citoprotector del DHA como compuesto puro podría llevarse a cabo en intestino de la misma manera que se produce en estómago. Para ello se decidió emplear una metodología de daño intestinal generado por la administración de una dosis única de indometacina (30 mg/kg, p.o.) que se ha sido reportada y utilizada ampliamente (LoGuidice et al., 2010; Wallace, 2013; Wallace et al., 2011a). Nuestros resultados mostraron que efectivamente el DHA genera un efecto entero protector el cual es estadísticamente significativo con respecto al grupo de daño (Gráfica 4) e inclusive con respecto al grupo tratado con la misma dosis de omeprazol (Gráfica 5) que hasta el momento es el medicamento más empleado en la coterapia ante el daño gastrointestinal por AINEs (Nagata et al., 2015); destacando las ventajas de la administración de DHA como compuesto puro además la gran posibilidad que

representaría como tratamiento para prevenir el daño por AINEs a nivel intestinal ya que como se ha mencionado, hasta el momento no existen efectos adversos ligados al uso del DHA, en comparación con las que posee el omeprazol (Thomson et al., 2010; Wallace et al., 2011a). Sin embargo, al realizar cuantificación de los niveles de ciertas moléculas implicadas en el proceso inflamatorio del daño por AINEs que suelen ser atribuibles también a intestino como el caso de LTB<sub>4</sub>, MPO y TNF- $\alpha$  (Wallace, 2013; Wallace et al., 2011a), nuestros resultados mostraron que estas moléculas no participan en el daño intestinal generado por AINEs; donde ninguno de nuestros grupos presentó una diferencia estadísticamente significativa entre sí, aunque interesantemente los cortes histológicos correspondientes indican una disminución en el infiltrado leucocitario.

En la actualidad, el daño intestinal por AINEs y sus mecanismos específicos no se han identificado por completo, nuestro estudio decidió investigar si el proceso inflamatorio era modulado por el DHA. Sin embargo los resultados obtenidos demostraron que el mecanismo por el cual el DHA genera su efecto enteroprotector no involucra la modulación de moléculas participantes en la infiltración de leucocitos. En consecuencia, otros mecanismos de daño intestinal recientemente reportados como la susceptibilidad de la microbiota intestinal (Mayo et al., 2016), la composición de la secreción biliar (Gemici et al., 2015) o los efectos del estrés oxidativo (Niu et al., 2014) e inclusive la estabilidad de las uniones intestinales sobre la mucosa intestinal (Han et al., 2016), deberían ser estudiados. Por ejemplo, se ha evidenciado que la administración de ácidos grasos omega-3 permiten el enriquecimiento de *Lactobacillus* y *Bifidobacteria* en colitis infecciosa evitando la disbiosis intestinal protegiendo el intestino (Ghosh et al., 2013) y que la administración de EPA-DHA logra mantener la integridad de la barrera intestinal en el daño intestinal por estrés térmico (Xiao et al., 2015). Sin embargo, diversos estudios concuerdan en que el efecto del estrés oxidativo podría ser el mecanismo determinante en el daño intestinal por AINEs, ya que al incrementar las especies reactivas de oxígeno genera lesión en los enterocitos desencadenando el daño intestinal por AINEs (Handa et al., 2014; Lazzaroni and Bianchi Porro, 2004). Además, existen reportes que indican que

los omega-3 pueden mediar el daño por ROS en el daño intestinal en el modelo de isquemia-repercusión y que la administración crónica de ácidos grasos omega-3 incrementa los niveles de SOD y CAT (Brahmbhatt et al., 2013), e incluso estudios en modelos murinos de colitis experimental con una dieta rica en ácidos grasos omega-3 reportan una disminución de GSH e IL-8 (Reddy and Naidu, 2016).

Al respecto, la capacidad antioxidante asociada al efecto enteroprotector de diversos compuestos y fármacos, está siendo estudiada recientemente; por ejemplo existen reportes sobre el efecto antioxidante del fármaco rifaximin y su capacidad para mantener la microbiota normal del intestino (Fornai et al., 2016), la capacidad de colchicina para generar un efecto enteroprotector por interferir con la activación de pro-caspasa 1 (Otani et al., 2016). Aunque también, se investigan otros posibles mecanismos implicados en el efecto intestinal, donde se ha reportado que rebamipide ejerce un efecto protector en los enterocitos a través de la modulación de la microbiota intestinal (Kurata et al., 2015) e inclusive se ha reportado que un derivado del extracto de Artemisia (DA-6034) reduce la permeabilidad intestinal protegiendo del daño por indometacina (Kwak et al., 2016). Sin embargo, en estos estudios utilizaron modelos de administración crónica.

Con los resultados obtenidos en este proyecto, debemos considerar el potencial de estudiar otros mecanismos propuestos para el daño intestinal por AINEs como son el daño mitocondrial por contacto directo, formación de aductos y el aumento de la permeabilidad celular (Abimosleh et al., 2013; Atchison et al., 2000; Matsui et al., 2011; Somasundaram et al., 2000; Wallace, 2013; Wallace and Devchand, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos por Martínez - Pérez en 2015 sobre el efecto antioxidante del DHA en el modelo de daño gástrico por indometacina, pone en manifiesto la posibilidad de evaluar el efecto antioxidante del DHA en el modelo de daño intestinal por indometacina. Por lo tanto, aunque en este trabajo no se logró identificar el mecanismo de acción del efecto enteroprotector, es el primer trabajo que identifica la protección que genera el DHA como compuesto puro a nivel de intestino.



Finalmente, los resultados obtenidos con respecto a la producción de resolvinas (Rvs) en los cuales el DHA no es capaz de restablecer los niveles basales de RvD1 a nivel intestinal, podrían indicar que se está llevando a cabo la síntesis de otras resolvinas e incluso de otros mediadores especializados pro-resolutivos SPMs como las maresinas. Se ha reportado que el tratamiento con Maresina 1 (MaR 1) otro SPMs derivado del DHA, protege de la colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS), potenciando el fenotipo M2 de los macrófagos, lo que nos indica la posible participación de los diversos SPMs en los procesos inflamatorios intestinales, sin embargo no existe más literatura relacionada con la producción de RvD1 u otros SPMs a nivel intestinal ni en el daño intestinal generado por AINEs. En cuanto a la participación de los receptores acoplados a proteína G identificados para los ácidos grasos libres (FFAR), solo se había reportado a GPR120 (FFAR 4) en intestino, mientras que GPR40 (FFAR 1) se reportaba en el sistema nervioso central y colon (Nakamoto et al., 2012). Sin embargo, durante el desarrollo de este trabajo otros autores reportaron la expresión de GPR40 y GPR120 (Christensen et al., 2015; Moberaten et al., 2013; Moniri, 2016) en intestino. Aunque, se ha reportado que estos FFAR están implicados en el efecto hipoglucemiante generado por la delfinida (una antocianina) en yeyuno de ratón y células HT-29 (Hidalgo et al., 2017); también que GPR120 (FFAR 4) puede modular al péptido tipo glucagón 1 (GLP-1) (Hirasawa et al., 2005) e inhibir la activación de caspasa-3 de células enteroendócrinas STC-1 tratadas con DHA (Katsuma et al., 2005). Por lo que se debe considerar evaluar en un futuro, la posible participación de estos FFAR en efecto enteroprotector del DHA, a través del uso de otras técnicas moleculares como RT-PCR, microarreglos e inclusive pruebas competitivas con análogos recién sintetizados para FFAR como el ácido fenilpropiónico 4-(3-fenoxibenzilamino) (GW9508) o el ácido 4-{4-[2[(fenil-2-piridinilamino)etoxi]fenil]}butírico (NCG21) (Moniri, 2016b). Si bien se había reportado la síntesis de antagonistas de FFAR (Tikhonova et al., 2008), después de una búsqueda exhaustiva no se encontraron antagonistas disponibles de manera comercial e inclusive los kits de ELISA recientemente disponibles el mercado solo sirven para la búsqueda de agonistas o antagonistas de FFAR 1 (GPR40) y FFAR 4 (GPR120) en cultivos celulares (FFAR1 Reporter Assay 601190 y FFAR4

Reporter Assay 601200). Cabe mencionar que el trabajo realizado a nivel intestinal llevado a cabo en esta investigación, puede servir para marcar la dirección de futuros trabajos con respecto al efecto enteroprotector del DHA; pues reportamos que no es la modulación de la respuesta inflamatoria el mecanismo por el cual se ejerce dicho efecto, con lo cual se deja abierta la posibilidad de investigar otros mecanismos recién atribuidos al daño intestinal por AINEs y que posiblemente sean modulados por el DHA.

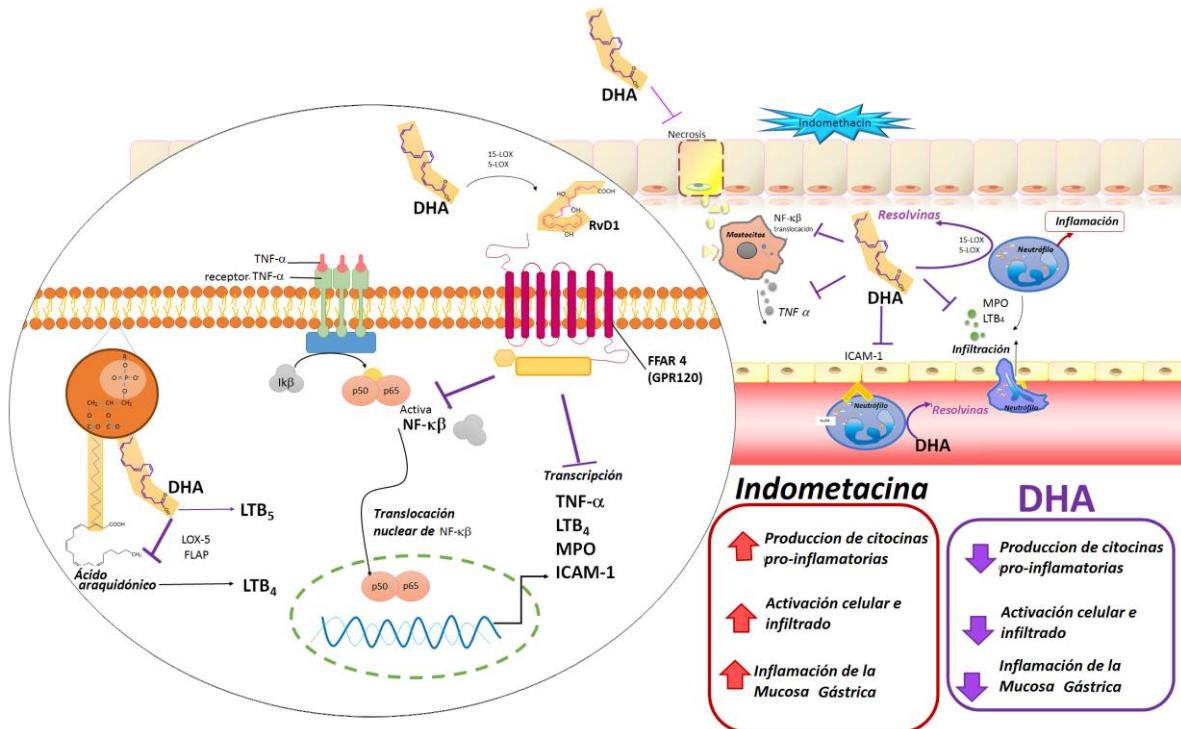


Figura 13. Esquema representativo del posible mecanismo gastroprotector del DHA ante el daño generado por indometacina.

## 11. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación, nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- El DHA (ácido docosahexaenoico) ejerce efecto gastroprotector y enteroprotector.
- El efecto gastro y enteroprotector ejercido por el DHA a dosis de 30 mg/kg, es comparable con el efecto que posee el omeprazol a nivel gástrico y más efectivo que este a nivel intestinal.
- Aunque el DHA (ácido docosahexaenoico) no modula los niveles de  $IL-1\beta$  ni la expresión de FFAR 1, ejerce su efecto gastroprotector a través de la modulación de MPO,  $LTB_4$ , ICAM-1 y  $TNF-\alpha$ , así como la inhibición de la activación de  $NF-\kappa B$ ; lo que nos indica que participa en la disminución de la infiltración de leucocitos en el modelo de daño generado por indometacina.
- El pre-tratamiento con DHA promueve la producción de RvD1 y restablece los niveles de FFAR 4, indicando su probable participación en el mecanismo gastroprotector del DHA.
- Sin embargo, el DHA (ácido docosahexaenoico) no modula MPO,  $LTB_4$ , RvD1 ni  $TNF-\alpha$  en intestino, aunque presenta efecto enteroprotector lo que indica la participación de otros mecanismos a nivel intestinal.

## 12. PERSPECTIVAS

Los beneficios del DHA en numerosos modelos experimentales apenas están siendo investigados, por lo cual consideramos que para expandir esta línea de investigación sería prudente que:

- Se llevara a cabo la evaluación de los efectos sobre la microbiota intestinal, permeabilidad celular y los efectos anti-oxidantes del DHA en el daño por indometacina.
- Consideramos que sería útil realizar la evaluación del efecto gastroprotector del DHA ante otros AINEs ya que se podría reforzar la evidencia obtenida en este estudio, sobre el papel gastroprotector del DHA frente a los AINEs.
- Finalmente, la posibilidad de evaluar los efectos del DHA en el proceso de cicatrización del tejido gastrointestinal esto a través de técnicas como inmunohistoquímica, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima, microarreglos e inclusive técnicas de lipidómica.

## 13.- REFERENCIAS

- Abdelmoaty, S., Wigerblad, G., Bas, D.B., Codeluppi, S., Fernandez-Zafra, T., El-Awady, E.-S., Moustafa, Y., Abdelhamid, A.E.S., Brodin, E., Svensson, C.I., 2013. Spinal actions of lipoxin A4 and 17(R)-resolvin D1 attenuate inflammation-induced mechanical hypersensitivity and spinal TNF release. *PLoS One* 8, e75543. doi:10.1371/journal.pone.0075543
- Abimosleh, S.M., Tran, C.D., Howarth, G.S., 2013. Emu oil reduces small intestinal inflammation in the absence of clinical improvement in a rat model of indomethacin-induced enteropathy. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2013. doi:10.1155/2013/429706
- Abramson, S.B., Weaver, A.L., 2005. Current state of therapy for pain and inflammation. *Arthritis Res. Ther.* 7 Suppl 4, S1–S6. doi:10.1186/ar1792
- Ajami, M., Davoodi, S.H., Habibey, R., Namazi, N., Soleimani, M., Pazoki-Toroudi, H., 2013. Effect of DHA+EPA on oxidative stress and apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rat kidneys. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 27, 593–602. doi:10.1111/j.1472-8206.2012.01066.x
- Al-Harbi, M.M., Islam, M.W., Al-Shabanah, O.A., Al-Gharably, N.M., 1995. Effect of acute administration of fish oil (omega-3 marine triglyceride) on gastric ulceration and secretion induced by various ulcerogenic and necrotizing agents in rats. *Food Chem. Toxicol.* 33, 553–8. doi:10.1016/S0278-6915(97)00046-X
- Al-Quraishy, S., Othman, M.S., Dkhil, M.A., Abdel Moneim, A.E., 2017. Olive (*Olea europaea*) leaf methanolic extract prevents HCl/ethanol-induced gastritis in rats by attenuating inflammation and augmenting antioxidant enzyme activities. *Biomed. Pharmacother.* 91, 338–349. doi:10.1016/j.biopha.2017.04.069
- Allen, A., Flemström, G., 2005. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, C1–C19. doi:10.1152/ajpcell.00102.2004
- Alqahtani, S., Kaddoumi, A., 2015. Development of Physiologically Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model for Indomethacin Disposition in Pregnancy. *PLoS One* 10, e0139762. doi:10.1371/journal.pone.0139762
- Andersen, V.L., Vogt, J., Obel, T., Christensen, J.H., Schmidt, E.B., 2010. The effect of N-3 fatty acids on plasma myeloperoxidase levels in healthy adults. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 56, 3–9.
- Anderson, B.M., Ma, D.W.L., 2009. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? *Lipids Health Dis.* 8, 33. doi:10.1186/1476-511X-8-33
- Antonisamy, P., Arasu, M.V., Dhanasekaran, M., Choi, K.C., Aravinthan, A., Kim, N.S., Kang, C.-W., Kim, J.-H., 2015. Protective effects of trigonelline against indomethacin-induced gastric ulcer in rats and potential underlying mechanisms. *Food Funct.* 398–

408. doi:10.1039/c5fo00403a

- Applegate, K.R., Glomset, J. a, 1986. Computer-based modeling of the conformation and packing properties of docosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.* 27, 658–680.
- Appleyard, C.B., McCafferty, D.M., Tigley, A.W., Swain, M.G., Wallace, J.L., 1996. Tumor necrosis factor mediation of NSAID-induced gastric damage: Role of leukocyte adherence. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 33, G42–G48.
- Arita, M., Yoshida, M., Hong, S., Tjonahen, E., Glickman, J.N., Petasis, N.A., Blumberg, R.S., Serhan, C.N., 2005. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7671–6. doi:10.1073/pnas.0409271102
- Arroyo-Lira, A.G., Rodríguez-Ramos, F., Chávez-Piña, A.E., 2014. Synergistic antinociceptive effect and gastric safety of the combination of docosahexaenoic acid and indomethacin in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 122, 74–81. doi:10.1016/j.pbb.2014.03.015
- 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–G908.
- Atay, S., Tarnawski, A.S., Dubois, A., 2000. Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 61, 105–124. doi:10.1016/S0090-6980(00)00067-8
- Atchison, C.R., West, A.B., Balakumaran, A., Hargus, S.J., Pohl, L.R., Daiker, D.H., Aronson, J.F., Hoffmann, W.E., Shipp, B.K., Treinen-Moslen, M., 2000. Drug enterocyte adducts: possible causal factor for diclofenac enteropathy in rats. *Gastroenterology* 119, 1537–1547. doi:10.1053/gast.2000.20186
- Babb, R.R., Alto, P., 1992. Conferences and reviews gastrointestinal complications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs 444–447.
- Bang, S., Yoo, S., Yang, T.J., Cho, H., Hwang, S., 2012. 17(R)-resolvin D1 specifically inhibits transient receptor potential ion channel vanilloid 3 leading to peripheral antinociception. *Br. J. Pharmacol.* 165, 683–692. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01568.x
- Bastaki, S.M.A., Wallace, J.L., 1999. Pathogenesis of nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy: Clues to preventative therapy. *Can. J. Gastroenterol.* 13, 123–127.
- Baud, V., Karin, M., 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11, 372–377. doi:10.1016/S0962-8924(01)02064-5
- Becker, J.C., Domschke, W., Pohle, T., 2004. Current approaches to prevent NSAID-induced gastropathy - COX selectivity and beyond. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 58, 587–600. doi:10.1111/j.1365-2125.2004.02198.x
- Bento, A.F., Claudino, R.F., Dutra, R.C., Marcon, R., Calixto, J.B., 2011. Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1

- and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J. Immunol.* 187, 1957–1969. doi:10.4049/jimmunol.1101305
- Bhattacharya, A., Ghosal, S., Bhattacharya, S.K., 2006. Effect of fish oil on offensive and defensive factors in gastric ulceration in rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 74, 109–116. doi:10.1016/j.plefa.2005.11.001
- Bhattacharya, A., Sun, D., Rahman, M., Fernandes, G., 2007. Different ratios of eicosapentaenoic and docosahexaenoic omega-3 fatty acids in commercial fish oils differentially alter pro-inflammatory cytokines in peritoneal macrophages from C57BL/6 female mice. *J. Nutr. Biochem.* 18, 23–30. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.02.005
- Bindu, S., Mazumder, S., Dey, S., Pal, C., Goyal, M., Alam, A., Iqbal, M.S., Sarkar, S., Azhar Siddiqui, A., Banerjee, C., Bandyopadhyay, U., 2013. Nonsteroidal anti-inflammatory drug induces proinflammatory damage in gastric mucosa through NF- $\kappa$ B activation and neutrophil infiltration: anti-inflammatory role of heme oxygenase-1 against nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 456–67. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.027
- Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Chattopadhyay, I., Varadaraj, A., Ali, E., Banerjee, R.K., 2003. A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. *J. Biol. Chem.* 278, 10993–11001. doi:10.1074/jbc.M210328200
- Bjarnason, I., Williams, P., Smethurst, P., Peters, T.J., Levi, a J., 1986. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on the permeability of the human small intestine. *Gut* 27, 1292–1297. doi:10.1136/gut.27.11.1292
- Boegh, M., Nielsen, H.M., 2015. Mucus as a barrier to drug delivery - Understanding and mimicking the barrier properties. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 116, 179–186. doi:10.1111/bcpt.12342
- Bonizzi, G., Karin, M., 2004. The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25, 280–288. doi:10.1016/j.it.2004.03.008
- Bradbury, J., 2011. Docosahexaenoic acid (DHA): An ancient nutrient for the modern human brain. *Nutrients* 3, 529–554. doi:10.3390/nu3050529
- Brahmbhatt, V., Oliveira, M., Briand, M., Perrisseau, G., Bastic Schmid, V., Destailats, F., Pace-Asciak, C., Benyacoub, J., Bosco, N., 2013. Protective effects of dietary EPA and DHA on ischemia–reperfusion-induced intestinal stress. *J. Nutr. Biochem.* 24, 104–111. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.02.014
- Briscoe, C.P., Tadayyon, M., Andrews, J.L., Benson, W.G., Chambers, J.K., Eilert, M.M., Ellis, C., Elshourbagy, N.A., Goetz, A.S., Minnick, D.T., Murdock, P.R., Sauls, H.R., Shabon, U., Spinage, L.D., Strum, J.C., Szekeres, P.G., Tan, K.B., Way, J.M., Ignar, D.M., Wilson, S., Muir, A.I., 2003. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* 278, 11303–11311. doi:10.1074/jbc.M211495200

- Brooks, J., Warburton, R., Beales, I.L.P., 2013. Prevention of upper gastrointestinal haemorrhage: Current controversies and clinical guidance. *Ther. Adv. Chronic Dis.* 4, 206–22. doi:10.1177/2040622313492188
- Brunton L.L., Chabner B.A., K.B.C., 2012. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica (12a. ed.) - Brunton, Laurence L. - Google Libros, 12°. ed. McGraw-Hill.
- Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Serhan, C.N., 2014. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity* 40, 315–27. doi:10.1016/j.immuni.2014.02.009
- Burdge, G., 2004. Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 7, 137–44.
- Burke, M.D., Falzon, M., Milton, A.S., 1983. Decreased hepatic microsomal cytochrome P450 due to indomethacin: Protective roles of 16,16-dimethylprostaglandin F<sub>2</sub>α and inducing agents. *Biochem. Pharmacol.* 32, 389–397. doi:10.1016/0006-2952(83)90516-6
- Calder, P.C., 2015. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance☆ *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 469–484. doi:10.1016/j.bbalip.2014.08.010
- Calder, P.C., 2013. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: Nutrition or pharmacology? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75, 645–662. doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x
- Calder, P.C., 2012. The role of marine omega-3 (*n*-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 1073–1080. doi:10.1002/mnfr.201100710
- Calder, P.C., 2009. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* 91, 791–795. doi:10.1016/j.biochi.2009.01.008
- Camps, J., Erdos, M.R., Ried, T., 2015. The role of lamin B1 for the maintenance of nuclear structure and function. *Nucleus* 6, 8–14. doi:10.1080/19491034.2014.1003510
- Camuesco, D., Comalada, M., Concha, A., Nieto, A., Sierra, S., Xaus, J., Zarzuelo, A., Gálvez, J., 2006. Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (*n*-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. *Clin. Nutr.* 25, 466–476. doi:10.1016/j.clnu.2005.12.009
- Camussi, G., Albano, E., Tetta, C., Bussolino, F., 1991. The molecular action of tumor necrosis factor-α. *Eur. J. Biochem.* 202, 3–14.
- Carrasco-Pozo, C., Castillo, R.L., Beltrán, C., Miranda, A., Fuentes, J., Gotteland, M., 2016. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: role of NF-κB and Nrf2. *J. Nutr. Biochem.* 27, 289–98. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.09.016



- Caterina, R. De, Liao, J.K., Libby, P., 2000. Fatty acid modulation of endothelial activation 1 – 3. *Am. J. Clin. Nutr.* 48743.
- Cavallini, M.E., Andreollo, N.A., Metze, K., Araújo, M.R., 2006. Omeprazole and misoprostol for preventing gastric mucosa effects caused by indomethacin and celecoxib in rats. *Acta Cir. Bras.* 21, 168–76. doi:/S0102-86502006000300009
- Chanudom, L., Tangpong, J., 2015. Anti-inflammation property of syzygium cumini (L.) skeels on indomethacin-induced acute gastric ulceration. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2015, 343642. doi:10.1155/2015/343642
- Chavez-Pina, A.E., Favari, L., Castaneda-Hernandez, G., 2009. Pharmacokinetics of acetaminophen and its active metabolite indomethacin in rats during acute hepatic damage and liver regeneration. *Ann Hepatol* 8, 141–147. doi:887584 [pii]
- Chávez-Piña, a E., Vong, L., McKnight, W., Dicay, M., Zanardo, R.C.O., Ortiz, M.I., Castañeda-Hernández, G., Wallace, J.L., 2008. Lack of effects of acetaminophen on signalling pathways for leukocyte adherence may explain its gastrointestinal safety. *Br. J. Pharmacol.* 155, 857–864. doi:10.1038/bjp.2008.316
- Chen, X.-Y., Chen, H.-M., Liu, Y.-H., Zhang, Z.-B., Zheng, Y.-F., Su, Z.-Q., Zhang, X., Xie, J.-H., Liang, Y.-Z., Fu, L.-D., Lai, X.-P., Su, Z.-R., Huang, X.-Q., 2016. The gastroprotective effect of pogostone from *Pogostemonis Herba* against indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Exp. Biol. Med.* 241, 193–204. doi:10.1177/1535370215600099
- Chiurchiù, V., Leuti, A., Dalli, J., Jacobsson, A., Battistini, L., Maccarrone, M., Serhan, C.N., 2016. Proresolving lipid mediators resolvin D1, resolvin D2, and maresin 1 are critical in modulating T cell responses. *Sci. Transl. Med.* 8, 353ra111. doi:10.1126/scitranslmed.aaf7483
- Choi, Y.J., Kim, N., Lee, J.Y., Nam, R.H., Chang, H., Seo, J.H., Kang, K.K., Kim, H.J., Choi, Y.J., Lee, H.S., Lee, D.H., 2014. Protective effects of garlic extract, PMK-S005, against nonsteroidal anti-inflammatory drugs-induced acute gastric damage in rats. *Dig. Dis. Sci.* 59, 2927–2934. doi:10.1007/s10620-014-3370-5
- Connor, W.E., 2000. Importance of n -3 fatty acids in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 171–175.
- Cook-Mills, J.M., Marchese, M.E., Abdala-Valencia, H., 2011. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1607–38. doi:10.1089/ars.2010.3522
- Cruvinel, W. de M., Mesquita, D., Araújo, J.A.P., Catelan, T.T.T., de Souza, A.W.S., da Silva, N.P., Andrade, L.E.C., 2010. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev. Bras. Reumatol.* 50, 434–61.
- Dalli, J., Serhan, C., 2016. Macrophage proresolving mediators-the when and where. *Microbiol. Spectr.* 4, 1–23. doi:10.1128/microbiolspec.MCHD-0001-2014

- Dalli, J., Winkler, J.W., Colas, R.A., Arnardottir, H., Cheng, C.-Y.C., Chiang, N., Petasis, N.A., Serhan, C.N., 2013. Resolvin D3 and aspirin-triggered resolvin D3 are potent immunoresolvents. *Chem. Biol.* 20, 188–201. doi:10.1016/j.chembiol.2012.11.010
- Davies, D., Larbi, K., Allen, A., Sanz, M.J., Weg, V.B., Haskard, D.O., Lobb, R.R., Nourshargh, S., 1999. VCAM-1 contributes to rapid eosinophil accumulation induced by the chemoattractants PAF and LTB4: Evidence for basal expression of functional VCAM-1 in rat skin. *Immunology* 97, 150–158. doi:10.1046/j.1365-2567.1999.00766.x
- Davies, N.M., Wallace, J.L., 1997. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal toxicity: New insights into an old problem. *J. Gastroenterol.* 32, 127–33.
- Díaz-Rivas, J.O., Herrera-Carrera, E., Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzmán, N.E., González-Laredo, R.F., Moreno-Jiménez, M.R., Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R., Larrosa-Pérez, M., Gallegos-Corona, M.A., 2015. Gastroprotective potential of *Buddleja scordioides* Kunth Scrophulariaceae infusions; effects into the modulation of antioxidant enzymes and inflammation markers in an in vivo model. *J. Ethnopharmacol.* 169, 280–6. doi:10.1016/j.jep.2015.04.024
- Dimauro, I., Pearson, T., Caporossi, D., Jackson, M.J., 2012. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Res. Notes* 5, 1. doi:10.1186/1756-0500-5-513
- Dirección General de Epidemiología, (DGE), 2015. Anuarios de morbilidad 1984 - 2015. Anu. Morbil. “Información Epidemiológica” - Dir. Gen. Epidemiol. 2015.
- Eder, C., 2009. Mechanisms of interleukin-1b release. *Immunobiology* 214, 543–553. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.007
- Eickmeier, O., Seki, H., Haworth, O., Hilberath, J.N., Gao, F., Uddin, M., Croze, R.H., Carlo, T., Pfeffer, M.A., Levy, B.D., 2013. Aspirin-triggered resolvin D1 reduces mucosal inflammation and promotes resolution in a murine model of acute lung injury. *Mucosal Immunol.* 6, 256–66. doi:10.1038/mi.2012.66
- Faust, T., Redfern, J.S., Lee, E., Feldman, M., 1989. Effects of fish oil on gastric mucosal 6-keto-PGF1 alpha synthesis and ethanol-induced injury. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 257.
- Faust, T.W., Redfern, J.S., Podolsky, I., Lee, E., Grundy, S.M., Feldman, M., 1990. Effects of aspirin on gastric mucosal prostaglandin E2 and F2 alpha content and on gastric mucosal injury in humans receiving fish oil or olive oil. *Gastroenterology* 98, 586–91.
- Fiorucci, S., Antonelli, E., Morelli, A., 2001. Mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drug-gastropathy. *Dig. Liver Dis.* 33 Suppl 2, S35-43.
- Fornai, M., Antonioli, L., Pellegrini, C., Colucci, R., Sacco, D., Tirota, E., Natale, G., Bartalucci, A., Flaibani, M., Renzulli, C., Ghelardi, E., Blandizzi, C., Scarpignato, C., 2016. Small bowel protection against NSAID-injury in rats: Effect of rifaximin, a poorly absorbed, GI targeted, antibiotic. *Pharmacol. Res.* 104, 186–96.

doi:10.1016/j.phrs.2015.12.031

- Fosbøl, E.L., Folke, F., Jacobsen, S., Rasmussen, J.N., Sørensen, R., Schramm, T.K., Schramm, S.S., Rasmussen, S., Poulsen, H.E., Køber, L., Torp-Pedersen, C., Gislason, G.H., 2010. Cause-specific cardiovascular risk associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs among healthy individuals. *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* 3, 395–405. doi:10.1161/CIRCOUTCOMES.109.861104
- Fredman, G., Serhan, C.N., 2011. Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. *Biochem. J.* 437, 185–97. doi:10.1042/BJ20110327
- Futosi, K., Mócsai, A., 2016. Tyrosine kinase signaling pathways in neutrophils. *Immunol. Rev.* 273, 121–139. doi:10.1111/imr.12455
- García Rodríguez, L.A., Barreales Tolosa, L., 2007. Risk of upper gastrointestinal complications among users of traditional NSAIDs and COXIBs in the general population. *Gastroenterology* 132, 498–506. doi:10.1053/j.gastro.2006.12.007
- Gemici, B., Elsheikh, W., Feitosa, K.B., Costa, S.K.P., Muscara, M.N., Wallace, J.L., 2015. H2S-releasing drugs: anti-inflammatory, cytoprotective and chemopreventative potential. *Nitric oxide Biol. Chem.* 46, 25–31. doi:10.1016/j.niox.2014.11.010
- Generoso, S.D.V., Rodrigues, N.M., Trindade, L.M., Paiva, N.C., Cardoso, V.N., Carneiro, C.M., Ferreira, A.V.D.M., Faria, A.M.C., Maioli, T.U., 2015. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. *Lipids Health Dis.* 14, 54. doi:10.1186/s12944-015-0052-z
- Ghosh, S., Dass, J.F.P., 2016. Study of pathway cross-talk interactions with NF- $\kappa$ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. *Gene* 584, 97–109. doi:10.1016/j.gene.2016.03.008
- Ghosh, S., DeCoffe, D., Brown, K., Rajendiran, E., Estaki, M., Dai, C., Yip, A., Gibson, D.L., 2013. Fish oil attenuates omega-6 polyunsaturated fatty acid-induced dysbiosis and infectious colitis but impairs LPS dephosphorylation activity causing sepsis. *PLoS One* 8, e55468. doi:10.1371/journal.pone.0055468
- Grommes, J., Soehnlein, O., 2011. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol. Med.* 17, 293–307. doi:10.2119/molmed.2010.00138
- Gurevich, E. V., Tesmer, J.J.G., Mushegian, A., Gurevich, V. V., 2012. G protein-coupled receptor kinases: More than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol. Ther.* 133, 40–69. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.08.001
- Gyenge, M., Amagase, K., Kunimi, S., Matsuoka, R., Takeuchi, K., 2013. Roles of pro-angiogenic and anti-angiogenic factors as well as matrix metalloproteinases in healing of NSAID-induced small intestinal ulcers in rats. *Life Sci.* 93, 441–447. doi:10.1016/j.lfs.2013.07.021
- Han, Y.-M., Park, J.-M., Kang, J.X., Cha, J.-Y., Lee, H.-J., Jeong, M., Go, E.-J., Hahm, K.B., 2016. Mitigation of indomethacin-induced gastrointestinal damages in fat-1

- transgenic mice via gate-keeper action of  $\omega$ -3-polyunsaturated fatty acids. *Sci. Rep.* 6, 33992. doi:10.1038/srep33992
- Handa, O., Majima, A., Onozawa, Y., Horie, H., Uehara, Y., Fukui, A., Omatsu, T., Naito, Y., Yoshikawa, T., 2014. The role of mitochondria-derived reactive oxygen species in the pathogenesis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal injury. *Free Radic. Res.* 48, 1095–9. doi:10.3109/10715762.2014.928411
- Hansberry, D.R., Shah, K., Agarwal, P., Agarwal, N., 2017. Fecal myeloperoxidase as a biomarker for inflammatory bowel disease. *Cureus* 9, e1004. doi:10.7759/cureus.1004
- Harvey, L.D., Yin, Y., Attarwala, I.Y., Begum, G., Deng, J., Yan, H.Q., Dixon, C.E., Sun, D., 2015. Administration of DHA reduces endoplasmic reticulum stress-associated inflammation and alters microglial or macrophage activation in traumatic brain injury. *ASN Neuro* 7, 175909141561896. doi:10.1177/1759091415618969
- Hashimoto, M., Hossain, S., Al Mamun, A., Matsuzaki, K., Arai, H., 2016. Docosahexaenoic acid: one molecule diverse functions. *Crit. Rev. Biotechnol.* 8551, 1–19. doi:10.1080/07388551.2016.1207153
- Healy, D.A., Wallace, F.A., Miles, E.A., Calder, P.C., Newsholm, P., 2000. Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids* 35, 763–8.
- Heifetz, A., James, T., Morao, I., Bodkin, M.J., Biggin, P.C., 2016. Guiding lead optimization with GPCR structure modeling and molecular dynamics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 30, 14–21. doi:10.1016/j.coph.2016.06.004
- Holub, B.J., 2002. Clinical nutrition: Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *Cmaj* 166, 608–615.
- Honda, K.L., Lamon-Fava, S., Matthan, N.R., Wu, D., Lichtenstein, A.H., 2015. EPA and DHA exposure alters the inflammatory response but not the surface expression of toll-like receptor 4 in macrophages. *Lipids* 50, 121–129. doi:10.1007/s11745-014-3971-y
- Hossain, M.S., Hashimoto, M., Gamoh, S., Masumura, S., 1999. Antioxidative effects of docosahexaenoic acid in the cerebrum versus cerebellum and brainstem of aged hypercholesterolemic rats. *J. Neurochem.* 72, 1133–1138. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0721133.x
- Huang, C.-Y., Sheu, W.H.-H., Chiang, A.-N., 2015. Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid suppress adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells via differential mechanisms. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 751–62. doi:10.1002/mnfr.201400687
- Huang, H., Dai, M.-H., Tao, Y.-X., 2014. Physiology and therapeutics of the free fatty acid receptor GPR40, in: *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* pp. 67–94. doi:10.1016/B978-0-12-800101-1.00003-X
- Hudert, C.A., Weylandt, K.H., Lu, Y., Wang, J., Hong, S., Dignass, A., Serhan, C.N., Kang, J.X.,

2006. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11276–81. doi:10.1073/pnas.0601280103
- Hunt, R.H., Camilleri, M., Crowe, S.E., El-Omar, E.M., Fox, J.G., Kuipers, E.J., Malfertheiner, P., McColl, K.E.L., Pritchard, D.M., Rugge, M., Sonnenberg, A., Sugano, K., Tack, J., 2015. The stomach in health and disease. *Gut* 64, 1650–1668. doi:10.1136/gutjnl-2014-307595
- Im, D.-S., 2012. Omega-3 fatty acids in anti-inflammation (pro-resolution) and GPCRs. *Prog. Lipid Res.* 51, 232–7. doi:10.1016/j.plipres.2012.02.003
- Imaoka, H., Ishihara, S., Kazumori, H., Kadowaki, Y., Aziz, M.M., Rahman, F.B., Ose, T., Fukuhara, H., Takasawa, S., Kinoshita, Y., 2010. Exacerbation of indomethacin-induced small intestinal injuries in Reg I-knockout mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G311-9. doi:10.1152/ajpgi.00469.2009
- Intake, G.R. for E. and D., 2014. Global recommendations for EPA and DHA intake 1–20.
- Iwata, F., Joh, T., Ueda, F., Yokoyama, Y., Itoh, M., 1998. Role of gap junctions in inhibiting ischemia-reperfusion injury of rat gastric mucosa. *Am. J. Physiol.* 275, G883-8.
- Jahangiri, A., Leifert, W.R., Kind, K.L., McMurchie, E.J., 2006. Dietary fish oil alters cardiomyocyte Ca<sup>2+</sup> dynamics and antioxidant status. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1592–1602. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.026
- Johansson, C., Bergström, S., 1982. Prostaglandin and protection of the gastroduodenal mucosa. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 77, 21–46.
- Jung, J., Nam, Y., Sohn, U.D., 2012. Inhibitory effects of ECQ on indomethacin-induced gastric damage in rats. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 16, 399–404. doi:10.4196/kjpp.2012.16.6.399
- Kang, J.-W., Lee, S.-M., 2016. Resolvin D1 protects the liver from ischemia/reperfusion injury by enhancing M2 macrophage polarization and efferocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 1025–35. doi:10.1016/j.bbali.2016.06.002
- Kantha, S.S., 1987. Dietary effects of fish oils on human health: a review of recent studies. *Yale J. Biol. Med.* 60, 37–44.
- Kato, S., Aihara, E., Yoshii, K., Takeuchi, K., 2005. Dual action of prostaglandin E2 on gastric acid secretion through different EP-receptor subtypes in the rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289, G64-9. doi:10.1152/ajpgi.00397.2004
- Kawai, T., Akira, S., 2007. Signaling to NF-κB by toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 13, 460–469. doi:10.1016/j.molmed.2007.09.002
- Kisic, B., Miric, D., Dragojevic, I., Rasic, J., Popovic, L., 2016. Role of myeloperoxidase in patients with chronic kidney disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* doi:10.1155/2016/1069743
- Kopic, S., Murek, M., Geibel, J.P., 2010. Revisiting the parietal cell. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C1–C10. doi:10.1152/ajpcell.00478.2009

- Krishnamoorthy, S., Recchiuti, A., Chiang, N., Yacoubian, S., Lee, C.-H., Yang, R., Petasis, N.A., Serhan, C.N., 2010. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 1660–5. doi:10.1073/pnas.0907342107
- Kudo, S., Mizuno, K., Hirai, Y., Shimizu, T., 1990. Clearance and tissue distribution of recombinant human interleukin 1 beta in rats. *Cancer Res.* 50, 5751–5.
- Kurata, S., Nakashima, T., Osaki, T., Uematsu, N., Shibamori, M., Sakurai, K., Kamiya, S., 2015. Rebamipide protects small intestinal mucosal injuries caused by indomethacin by modulating intestinal microbiota and the gene expression in intestinal mucosa in a rat model. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 56, 20–7. doi:10.3164/jcbn.14-67
- Kurihara, T., Miyata, A., 2015. Involvement of free fatty acid receptor GPR40/FFAR1 in the regulation of spinal nociceptive transmission. *Folia Pharmacol. Jpn.* 146, 309–314. doi:10.1254/fpj.146.309
- Kwak, D.S., Lee, O.Y., Lee, K.N., Jun, D.W., Lee, H.L., Yoon, B.C., Choi, H.S., 2016. The effect of DA-6034 on intestinal permeability in an indomethacin-induced small intestinal injury model. *Gut Liver* 10, 406–11. doi:10.5009/gnl15251
- Laine, L., Takeuchi, K., Tarnawski, A., 2008. Gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to bedside. *Gastroenterology* 135, 41–60. doi:10.1053/j.gastro.2008.05.030
- Lanas, A., 2008. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Arthritis Res. Ther.* 10 Suppl 2, S4. doi:10.1186/ar2465
- Latimer, N., Lord, J., Grant, R.L., O'Mahony, R., Dickson, J., Conaghan, P.G., 2009. Cost effectiveness of COX 2 selective inhibitors and traditional NSAIDs alone or in combination with a proton pump inhibitor for people with osteoarthritis. *BMJ* 339, b2538–b2538. doi:10.1136/bmj.b2538
- Lawson, C., Wolf, S., 2009. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep* 61, 22–32. doi:10.1016/S1734-1140(09)70004-0
- Lazzaroni, M., Bianchi Porro, G., 2004. Gastrointestinal side-effects of traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs and new formulations. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20 Suppl 2, 48–58. doi:10.1111/j.1365-2036.2004.02037.x
- Lee, H.-N., Kundu, J.K., Cha, Y.-N., Surh, Y.-J., 2013. Resolvin D1 stimulates efferocytosis through p50/p50-mediated suppression of tumor necrosis factor- $\alpha$  expression. *J. Cell Sci.* 126, 4037–47. doi:10.1242/jcs.131003
- Lee, J.Y., Plakidas, A., Lee, W.H., Heikkinen, A., Chanmugam, P., Bray, G., Hwang, D.H., 2003. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 44, 479–486. doi:10.1194/jlr.M200361-JLR200
- Lehmann, C., Homann, J., Ball, A.-K., Blöcher, R., Kleinschmidt, T.K., Basavarajappa, D., Angioni, C., Ferreirós, N., Häfner, A.-K., Rådmark, O., Proschak, E., Haeggström, J.Z., Geisslinger, G., Parnham, M.J., Steinhilber, D., Kahnt, A.S., 2015. Lipoxin and resolvin

- biosynthesis is dependent on 5-lipoxygenase activating protein. *FASEB J.* 29, 5029–43. doi:10.1096/fj.15-275487
- Leite, A.Z., Sipahi, A.M., Damião, A.O., Coelho, A.M., Garcez, A.T., Machado, M.C., Buchpiguel, C.A., Lopasso, F.P., Lordello, M.L., Agostinho, C.L., Laudanna, A.A., 2001. Protective effect of metronidazole on uncoupling mitochondrial oxidative phosphorylation induced by NSAID: a new mechanism. *Gut* 48, 163–7.
- Leung, F.W., 1994. Prostaglandins mediate fish oil protection against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Dig. Dis. Sci.* 39, 893.
- Lim, J.H., Kim, J.-H., Kim, N., Lee, B.H., Seo, P.J., Kang, J.M., Jo, S.Y., Park, J.H., Nam, R.H., Chang, H., Kwon, J.-W., Lee, D.H., 2014. Gastroprotective effect of *Cochinchina momordica* seed extract in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced acute gastric damage in a rat model. *Gut Liver* 8, 49–57. doi:10.5009/gnl.2014.8.1.49
- Lim, Y.J., Lee, J.S., Ku, Y.S., Hahm, K.B., 2009. Rescue strategies against non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastroduodenal damage. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24, 1169–1178. doi:10.1111/j.1440-1746.2009.05929.x
- Lima-Garcia, J.F., Dutra, R.C., da Silva, K., Motta, E.M., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2011. The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats. *Br. J. Pharmacol.* 164, 278–93. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01345.x
- Liu, M., Boussetta, T., Makni-Maalej, K., Fay, M., Driss, F., El-Benna, J., Lagarde, M., Guichardant, M., 2014. Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ROS production in human neutrophils and cyclooxygenase activities. *Lipids* 49, 49–57. doi:10.1007/s11745-013-3863-6
- LoGuidice, A., Ramirez-Alcantara, V., Proli, A., Gavillet, B., Boelsterli, U.A., 2010. Pharmacologic targeting or genetic deletion of mitochondrial cyclophilin D protects from NSAID-induced small intestinal ulceration in mice. *Toxicol. Sci.* 118, 276–285. doi:10.1093/toxsci/kfq226
- Lopez-Castejon, G., Brough, D., 2011a. Understanding the mechanism of IL-1b secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 189–195. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.10.001
- Lopez-Castejon, G., Brough, D., 2011b. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 189–95. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.10.001
- Lu, M., Wu, B., 2016. Structural studies of G protein-coupled receptors. *IUBMB Life* 68, 894–903. doi:10.1002/iub.1578
- Lukiw, W.J., Bazan, N.G., 2008. Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J. Nutr.* 138, 2510–4. doi:10.3945/jn.108.096016
- Ma, D., Zhang, M., Larsen, C.P., Xu, F., Hua, W., Yamashima, T., Mao, Y., Zhou, L., 2010. DHA promotes the neuronal differentiation of rat neural stem cells transfected with GPR40 gene. *Brain Res.* 1330, 1–8. doi:10.1016/j.brainres.2010.03.002

- Maity, P., Bindu, S., Dey, S., Goyal, M., Alam, A., Pal, C., Mitra, K., Bandyopadhyay, U., 2009. Indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, develops gastropathy by inducing reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathology and associated apoptosis in gastric mucosa: A novel role of mitochondrial aconitase oxidation. *J. Biol. Chem.* 284, 3058–3068. doi:10.1074/jbc.M805329200
- Mancini, A.D., Bertrand, G., Vivot, K., Carpentier, É., Tremblay, C., Ghislain, J., Bouvier, M., Poitout, V., 2015.  $\beta$ -Arrestin Recruitment and Biased Agonism at Free Fatty Acid Receptor 1. *J. Biol. Chem.* 290, 21131–21140. doi:10.1074/jbc.M115.644450
- Manjari, V., Das, U.N., 2000. Effect of polyunsaturated fatty acids on dexamethasone-induced gastric mucosal damage. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 62, 85–96. doi:10.1054/plef.1999.0125
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S., 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 519–531. doi:10.1038/nri3024
- Martin, G.R., Perretti, M., Flower, R.J., Wallace, J.L., 2008. Annexin-1 modulates repair of gastric mucosal injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G764–769. doi:10.1152/ajpgi.00531.2007
- Martin, G.R., Wallace, J.L., 2006. Gastrointestinal inflammation: A central component of mucosal defense and repair. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 231, 130–7.
- Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J., 2002. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Mol. Cell* 10, 417–426. doi:10.1016/S1097-2765(02)00599-3
- Martins de Lima, T., Gorrão, R., Hatanaka, E., Cury-Boaventura, M.F., Portioli Silva, E.P., Procopio, J., Curi, R., 2007. Mechanisms by which fatty acids regulate leucocyte function: Figure 1. *Clin. Sci.* 113, 65–77. doi:10.1042/CS20070006
- Matsui, H., Shimokawa, O., Kaneko, T., Nagano, Y., Rai, K., Hyodo, I., 2011. The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries in stomach and intestine. *J. Clin. Biochem. Nutr* 48, 107–111. doi:10.3164/jcbtn.10
- Mayo, S.A., Song, Y.K., Cruz, M.R., Phan, T.M., Singh, K. V, Garsin, D.A., Murray, B.E., Dial, E.J., Lichtenberger, L.M., 2016. Indomethacin injury to the rat small intestine is dependent upon biliary secretion and is associated with overgrowth of enterococci. *Physiol. Rep.* 4, e12725. doi:10.14814/phy2.12725
- Mayurasakorn, K., Williams, J.J., Ten, V.S., Deckelbaum, R.J., 2011a. Docosahexaenoic acid: brain accretion and roles in neuroprotection after brain hypoxia and ischemia. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 14, 158–67. doi:10.1097/MCO.0b013e328342cba5
- Mayurasakorn, K., Williams, J.J., Ten, V.S., Deckelbaum, R.J., 2011b. Docosahexaenoic acid: brain accretion and roles in neuroprotection after brain hypoxia and ischemia. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 14, 158–67. doi:10.1097/MCO.0b013e328342cba5



- McCafferty, D.-M., Granger, D.N., Wallace, J.L., Volpes, D., Melis, M., Pace, E., Merendino, A., Ward, P., 1995. Indomethacin-induced gastric injury and leukocyte adherence in arthritic versus healthy rats. *Gastroenterology* 109, 1173–1180. doi:10.1016/0016-5085(95)90576-6
- Mendoza Patiño, N., 2008. *Farmacología médica*. Médica Panamericana.
- Milligan, G., Alvarez-Curto, E., Watterson, K.R., Ulven, T., Hudson, B.D., 2015. Characterizing pharmacological ligands to study the long-chain fatty acid receptors GPR40/FFA1 and GPR120/FFA4. *Br. J. Pharmacol.* 172, 3254–3265. doi:10.1111/bph.12879
- Mion, F., Cuber, J.C., Minaire, Y., Chayvialle, J.A., 1994. Short term effects of indomethacin on rat small intestinal permeability. Role of eicosanoids and platelet activating factor. *Gut* 35, 490–495. doi:10.1136/gut.35.4.490
- Mobraten, K., Haug, T.M., Kleiveland, C.R., Lea, T., 2013. Omega-3 and omega-6 PUFAs induce the same GPR120-mediated signalling events, but with different kinetics and intensity in Caco-2 cells. *Lipids Health Dis.* 12, 101. doi:10.1186/1476-511X-12-101
- Moniri, N.H., 2016. Free-fatty acid receptor-4 (GPR120): Cellular and molecular function and its role in metabolic disorders. *Biochem. Pharmacol.* 110–111, 1–15. doi:10.1016/j.bcp.2016.01.021
- Monteiro, A.P., Pinheiro, C.S., Luna-Gomes, T., Alves, L.R., Maya-Monteiro, C.M., Porto, B.N., Barja-Fidalgo, C., Benjamim, C.F., Peters-Golden, M., Bandeira-Melo, C., Bozza, M.T., Canetti, C., 2011. Leukotriene B4 mediates neutrophil migration induced by heme. *J Immunol* 186, 6562–6567. doi:jimmunol.1002400 [pii]r10.4049/jimmunol.1002400
- Morise, Z., Granger, D.N., Fuseler, J.W., Anderson, D.C., Grisham, M.B., 1999. Indomethacin induced gastropathy in CD18, intercellular adhesion molecule 1, or P-selectin deficient mice. *Gut* 45, 523–528. doi:10.1136/gut.45.4.523
- Morisseau, C., Inceoglu, B., Schmelzer, K., Tsai, H., Jinks, S.L., Hegedus, C.M., Hammock, B.D., 2010. Naturally occurring monoepoxides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are bioactive antihyperalgesic lipids. *J. Lipid Res.* 51, 3481–90. doi:10.1194/jlr.M006007
- Mozaffarian, D., Wu, J.H.Y., 2012. (n-3) fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary? *J. Nutr.* 142, 614S–625S. doi:10.3945/jn.111.149633
- Nagata, N., Niikura, R., Aoki, T., Sakurai, T., Moriyasu, S., Shimbo, T., Sekine, K., Okubo, H., Watanabe, K., Yokoi, C., Yanase, M., Akiyama, J., Uemura, N., 2015. Effect of proton-pump inhibitors on the risk of lower gastrointestinal bleeding associated with NSAIDs, aspirin, clopidogrel, and warfarin. *J. Gastroenterol.* 50, 1079–1086. doi:10.1007/s00535-015-1055-2
- Nakamoto, K., Nishinaka, T., Mankura, M., Fujita-Hamabe, W., Tokuyama, S., 2010.

- Antinociceptive effects of docosahexaenoic acid against various pain stimuli in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 1070–2. doi:10.1248/bpb.33.1070
- Nakamoto, K., Nishinaka, T., Matsumoto, K., Kasuya, F., Mankura, M., Koyama, Y., Tokuyama, S., 2012. Involvement of the long-chain fatty acid receptor GPR40 as a novel pain regulatory system. *Brain Res.* 1432, 74–83. doi:10.1016/j.brainres.2011.11.012
- Nakamoto, K., Nishinaka, T., Sato, N., Mankura, M., Koyama, Y., Kasuya, F., Tokuyama, S., 2013. Hypothalamic GPR40 signaling activated by free long chain fatty acids suppresses CFA-induced inflammatory chronic pain. *PLoS One* 8, e81563. doi:10.1371/journal.pone.0081563
- Nakamoto, K., Tokuyama, S., 2015. The possibility of a novel pain control system through brain long chain fatty acid receptor GPR40/FFAR1. *Folia Pharmacol. Jpn.* 146, 302–308. doi:10.1254/fpj.146.302
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79, 1193–226.
- Nauroth, J.M., Liu, Y.C., Van Elswyk, M., Bell, R., Hall, E.B., Chung, G., Arterburn, L.M., 2010. Docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA-6) algal oils reduce inflammatory mediators in human peripheral mononuclear cells in vitro and paw edema in vivo. *Lipids* 45, 375–84. doi:10.1007/s11745-010-3406-3
- 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. doi:10.1211/0022357056659
- Nishinaka, T., Matsumoto, K., Nakamoto, K., Anbo, A., Mankura, M., Koyama, Y., Tokuyama, S., 2013. Elucidation of mechanisms underlying docosahexaenoic acid-induced antinociception. *Yakugaku Zasshi* 133, 493–9. doi:10.1248/yakushi.12-00278-2
- Niu, X., de Graaf, I.A.M., van der Bij, H.A., Groothuis, G.M.M., 2014. Precision cut intestinal slices are an appropriate ex vivo model to study NSAID-induced intestinal toxicity in rats. *Toxicol. In Vitro* 28, 1296–305. doi:10.1016/j.tiv.2014.06.010
- Nordgren, T.M., Friemel, T.D., Heires, A.J., Poole, J.A., Wyatt, T.A., Romberger, D.J., 2014. The omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid attenuates organic dust-induced airway inflammation. *Nutrients* 6, 5434–5452. doi:10.3390/nu6125434
- Norling, L. V., Dalli, J., Flower, R.J., Serhan, C.N., Perretti, M., 2012. Resolvin D1 limits polymorphonuclear leukocyte recruitment to inflammatory loci: Receptor-dependent actions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1970–1978. doi:10.1161/ATVBAHA.112.249508
- Nowak, J.Z., 2013. Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: Focus on age-related macular degeneration. *Pharmacol. Reports* 65, 288–304. doi:10.1016/S1734-1140(13)71005-3

- Odashima, M., Otaka, M., Jin, M., Komatsu, K., Wada, I., Horikawa, Y., Matshuhashi, T., Hatakeyama, N., Oyake, J., Ohba, R., Watanabe, S., Linden, J., 2006. Attenuation of gastric mucosal inflammation induced aspirin through activation of A2A adenosine receptor in rats. *World J. Gastroenterol.* 12, 568–573.
- Oh, D.Y., Olefsky, J.M., 2012. Omega 3 fatty acids and GPR120. *Cell Metab.* 15, 564–565. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.009
- Oh, D.Y., Talukdar, S., Bae, E.J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W.J., Watkins, S.M., Olefsky, J.M., 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142, 687–698. doi:10.1016/j.cell.2010.07.041
- Ohnishi, H., Miyahara, N., Gelfand, E.W., 2008. The role of leukotriene B(4) in allergic diseases. *Allergol. Int.* 57, 291–8. doi:10.2332/allergolint.08-RAI-0019
- Ohta, Y., Yashiro, K., Kobayashi, T., Inui, K., Yoshino, J., 2017. Protective effect of N , N' - dimethylthiourea against stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 31, 319–328. doi:10.1111/fcp.12268
- Okada, A., Kinoshita, Y., Waki, S., Fukui, H., Maekawa, T., Matsushima, Y., Kawanami, C., Kishi, K., Nakata, H., Wang, H.Y., Hassan, S., Chiba, T., 1998. Rat gastric mucosal cells express ICAM-1 and proinflammatory cytokines during indomethacin-induced mucosal injury. *J Lab Clin Med* 131, 538–547.
- Otani, K., Watanabe, T., Shimada, S., Takeda, S., Itani, S., Higashimori, A., Nadatani, Y., Nagami, Y., Tanaka, F., Kamata, N., Yamagami, H., Tanigawa, T., Shiba, M., Tominaga, K., Fujiwara, Y., Arakawa, T., 2016. Colchicine prevents NSAID-induced small intestinal injury by inhibiting activation of the NLRP3 inflammasome. *Sci. Rep.* 6, 32587. doi:10.1038/srep32587
- Parameswaran, N., Patial, S., 2010. Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 20, 87–103. doi:10.1016/j.bbi.2008.05.010
- Pechous, R.D., 2017. With friends like these: the complex role of neutrophils in the progression of severe pneumonia. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 160. doi:10.3389/fcimb.2017.00160
- Perretti, M., Mugridge, K.G., Wallace, J.L., Parente, L., 1992. Reduction of aspirin-induced gastric damage in rats by interleukin-1 beta: possible involvement of endogenous corticosteroids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 1238–47.
- Picq, M., Chen, P., Perez, M., Michaud, M., Véricel, E., Guichardant, M., Lagarde, M., 2010. DHA metabolism: targeting the brain and lipoygenation. *Mol. Neurobiol.* 42, 48–51. doi:10.1007/s12035-010-8131-7
- 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, 139–143. doi:10.1016/j.ejphar.2012.09.049

- Polat, B., Albayrak, Y., Suleyman, B., Dursun, H., Odabasoglu, F., Yigiter, M., Halici, Z., Suleyman, H., 2011. Antiulcerative effect of dexmedetomidine on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Pharmacol. Reports* 63, 518–526. doi:10.1016/S1734-1140(11)70518-7
- Praveen Rao, P.N., Knaus, E.E., 2008. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 11, 81–110. doi:10.1016/j.mpm.2008.11.004
- Rabelo-Gonçalves, E.M.A., Nishimura, N.F., Zeitune, J.M.R., 2005. Development of a BALB/c mouse model of *Helicobacter pylori* infection with fresh and frozen bacteria. *Biol. Res.* 38, 101–109.
- Raederstorff, D., Pantze, M., Bachmann, H., Moser, U., 1996. Anti-inflammatory properties of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids in phorbol-ester-induced mouse ear inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 111, 284–90.
- Reddy, K.V.K., Naidu, K.A., 2016. Oleic acid, hydroxytyrosol and n-3 fatty acids collectively modulate colitis through reduction of oxidative stress and IL-8 synthesis; in vitro and in vivo studies. *Int. Immunopharmacol.* 35, 29–42. doi:10.1016/j.intimp.2016.03.019
- Reyes-Gordillo, K., Segovia, J., Shibayama, M., Vergara, P., Moreno, M.G., Muriel, P., 2007. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF- $\kappa$ B, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1770, 989–996. doi:10.1016/j.bbagen.2007.02.004
- Rius, B., Titos, E., Morán-Salvador, E., López-Vicario, C., García-Alonso, V., González-Pérez, A., Arroyo, V., Clària, J., 2014. Resolvin D1 primes the resolution process initiated by calorie restriction in obesity-induced steatohepatitis. *FASEB J.* 28, 836–48. doi:10.1096/fj.13-235614
- Rodrigues, H.G., Takeo Sato, F., Curi, R., Vinolo, M.A.R., 2016. Fatty acids as modulators of neutrophil recruitment, function and survival. *Eur. J. Pharmacol.* 785, 50–58. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.098
- Sahoo, M., Ceballos-Olvera, I., del Barrio, L., Re, F., 2011. Role of the Inflammasome, IL-1 $\beta$ , and IL-18 and IL-18 in bacterial infections. *Sci. World J.* 11, 2037–2050. doi:10.1100/2011/212680
- Santana, A.P.M., Tavares, B.M., Lucetti, L.T., Gouveia, F.S., Ribeiro, R.A., Soares, P.M.G., Sousa, E.H.S., Lopes, L.G.F., Medeiros, J.V.R., Souza, M.H.L.P., 2015. The nitric oxide donor cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)NO](PF<sub>6</sub>) increases gastric mucosa protection in mice - Involvement of the soluble guanylate cyclase/KATP pathway. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 45, 35–42. doi:10.1016/j.niox.2015.02.002
- Santos, C.L., Souza, M.H.L.P., 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. doi:10.1038/sj.bjp.0706361

- Sargent, J.R., 1997. Fish oils and human diet. *Br. J. Nutr.* 78 Suppl 1, S5-13.
- Seki, H., Sasaki, T., Ueda, T., Arita, M., 2010. Resolvins as regulators of the immune system. *ScientificWorldJournal.* 10, 818–31. doi:10.1100/tsw.2010.72
- Seo, P.J., Kim, N., Kim, J.H., Lee, B.H., Nam, R.H., Lee, H.S., Park, J.H., Lee, M.K., Chang, H., Jung, H.C., Song, I.S., 2012. Comparison of indomethacin, diclofenac and aspirin-induced gastric damage according to age in rats. *Gut Liver* 6, 210–217. doi:10.5009/gnl.2012.6.2.210
- Serhan, C.N., 2014. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510, 92–101. doi:10.1038/nature13479
- Serhan, C.N., 2010. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation New solution for resolution of acute inflammation. *Am. J. Pathol.* 177, 1576–1591. doi:10.2353/ajpath.2010.100322
- Serhan, C.N., 2006. Novel chemical mediators in the resolution of inflammation: resolvins and protectins. *Anesthesiol. Clin.* 24, 341–64.
- Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O'Neill, L.A.J., Perretti, M., Rossi, A.G., Wallace, J.L., 2007. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 21, 325–32. doi:10.1096/fj.06-7227rev
- Serhan, C.N., Chiang, N., 2009. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *Br. J. Pharmacol.* 153 Suppl, S200–S215. doi:10.1038/sj.bjp.0707489
- Serhan, C.N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S.P., Devchand, P.R., Mirick, G., Moussignac, R.-L., 2002. Resolvins. *J. Exp. Med.* 196, 1025–1037. doi:10.1084/jem.20020760
- Simopoulos, A., 2002. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* 21, 495–505. doi:10.1080/07315724.2002.10719248
- Singh, D.P., Borse, S.P., Nivsarkar, M., 2016. A novel model for NSAID induced gastroenteropathy in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 78, 66–75. doi:10.1016/j.vascn.2015.11.008
- Sirover, M.A., 2014. Structural analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase functional diversity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 57, 20–25. doi:10.1016/j.biocel.2014.09.026
- Somasundaram, S., Sigthorsson, G., Simpson, R.J., Watts, J., Jacob, M., Tavares, I.A., Rafi, S., Roseth, A., Foster, R., Price, A.B., Wrigglesworth, J.M., Bjarnason, I., 2000. Uncoupling of intestinal mitochondrial oxidative phosphorylation and inhibition of cyclooxygenase are required for the development of NSAID-enteropathy in the rat. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14, 639–50.
- Sorensen, L.S., Thorlacius-Ussing, O., Rasmussen, H.H., Lundbye-Christensen, S., Calder, P.C., Lindorff-Larsen, K., Schmidt, E.B., 2014. Effects of perioperative supplementation with omega-3 fatty acids on leukotriene B4 and leukotriene B5

- production by stimulated neutrophils in patients with colorectal cancer: A randomized, placebo-controlled intervention trial. *Nutrients* 6, 4043–4057. doi:10.3390/nu6104043
- Souza, M.H.L.P., Lemos, H.P., Oliveira, R.B., Cunha, F.Q., 2004. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. *Gut* 53, 791–796. doi:10.1136/gut.2002.012930
- Spite, M., Norling, L. V, Summers, L., Yang, R., Cooper, D., Petasis, N.A., Flower, R.J., Perretti, M., Serhan, C.N., 2009. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature* 461, 1287–91. doi:10.1038/nature08541
- Strzepa, A., Pritchard, K.A., Dittel, B.N., 2017. Myeloperoxidase: A new player in autoimmunity. *Cell. Immunol.* doi:10.1016/j.cellimm.2017.05.002
- Sublette, M.E., Ellis, S.P., Geant, A.L., Mann, J.J., 2011. Meta-analysis of the effects of eicosapentaenoic acid (EPA) in clinical trials in depression. *J. Clin. Psychiatry* 72, 1577–1584. doi:10.4088/JCP.10m06634
- Süleyman, H., Akçay, F., Altinkaynak, K., 2002. The effect of nimesulide on the indomethacin- and ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Pharmacol. Res.* 45, 155–8. doi:10.1006/phrs.2001.0933
- Süleyman, H., Demircan, B., Karagöz, Y., 2007. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol. Rep.* 59, 247–58.
- Sun, Y.P., Oh, S.F., Uddin, J., Yang, R., Gotlinger, K., Campbell, E., Colgan, S.P., Petasis, N.A., Serhan, C.N., 2007. Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer: Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. *J. Biol. Chem.* 282, 9323–9334. doi:10.1074/jbc.M609212200
- Suwa, T., Urano, H., Kohno, Y., Suzuki, A., Amano, T., 1987. Comparative studies on the gastrointestinal lesions caused by several nonsteroidal anti-inflammatory agents in rats. *Agents Actions* 21, 167–172. doi:10.1007/BF01974937
- Szura, M., Pasternak, A., 2014. Upper gastrointestinal bleeding - state of the art. *Folia Med Cracov* 54, 59–78.
- Takeuchi, K., Aihara, E., Ise, F., 2006. Involvement of Cyclooxygenase-1 prostaglandin E2 and EPI receptors in acid-induced HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion in stomach. *Gene Expr.* 661–676.
- Takeuchi, K., Kato, S., Amagase, K., 2010. Prostaglandin EP receptors involved in modulating gastrointestinal mucosal integrity. *J. Pharmacol. Sci.* 114, 248–261. doi:10.1254/jphs.10R06CR
- Tang, Y., Zhang, M.J., Hellmann, J., Kosuri, M., Bhatnagar, A., Spite, M., 2013. Proresolution therapy for the treatment of delayed healing of diabetic wounds. *Diabetes* 62, 618–627. doi:10.2337/db12-0684
- Thomson, A.B.R., Sauve, M.D., Kassam, N., Kamitakahara, H., 2010. Safety of the long-term

- use of proton pump inhibitors. *World J. Gastroenterol.* 16, 2323–2330. doi:10.3748/wjg.v16.i19.2323
- Thong-Ngam, D., Chochuai, S., Patumraj, S., Chayanupatkul, M., Klaikeaw, N., 2012. Curcumin prevents indomethacin-induced gastropathy in rats. *World J. Gastroenterol.* 18, 1479–1484. doi:10.3748/wjg.v18.i13.1479
- Tvrzicka, E., Kremmyda, L.S., Stankova, B., Zak, A., 2011. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review. part 1: Classification, dietary sources and biological functions. *Biomed. Pap.* 155, 117–130. doi:10.5507/bp.2011.038
- Uchida, M., Matsueda, K., Shoda, R., Muraoka, A., Yamato, S., 2001. Nitric oxide donating compounds inhibit HCl-induced gastric mucosal lesions mainly via prostaglandin 138, 133–138.
- Ueda, T., Hokari, R., Higashiyama, M., Yasutake, Y., Maruta, K., Kurihara, C., Tomita, K., Komoto, S., Okada, Y., Watanabe, C., Usui, S., Nagao, S., Miura, S., 2015. Beneficial effect of an omega-6 PUFA-rich diet in non-steroidal anti-inflammatory drug-induced mucosal damage in the murine small intestine. *World J. Gastroenterol.* 21, 177–186. doi:10.3748/wjg.v21.i1.177
- Van Den Abeele, J., Rubbens, J., Brouwers, J., Augustijns, P., 2017. The dynamic gastric environment and its impact on drug and formulation behaviour. *Eur. J. Pharm. Sci.* 96, 207–231. doi:10.1016/j.ejps.2016.08.060
- Viggiano, D., Ianiro, G., Vanella, G., Bruno, G., Simeone, G., Mele, G., 2015. Gut barrier in health and disease: focus on childhood. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 19, 1077–1085.
- Wallace, J., McKnight, W., 1993. Role of endothelial adhesion molecules in NSAID-induced gastric mucosal injury. *Am. J. ...* G993–G998.
- Wallace, J.L., 2013. Mechanisms, prevention and clinical implications of nonsteroidal anti-inflammatory drug-enteropathy. *World J. Gastroenterol.* 19, 1861. doi:10.3748/wjg.v19.i12.1861
- Wallace, J.L., 2008. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: Why doesn't the stomach digest itself? *Physiol. Rev.* 88, 1547–1565. doi:10.1152/physrev.00004.2008
- Wallace, J.L., 2007. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 501–505. doi:10.1016/j.tips.2007.09.003
- Wallace, J.L., Devchand, P.R., 2005. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. *Br. J. Pharmacol.* 145, 275–82. doi:10.1038/sj.bjp.0706201
- Wallace, J.L., Granger, D.N., 1996. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB J.* 10, 731–40.

- Wallace, J.L., Ma, L., 2001. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Exp. Biol. Med.* 226, 1003–1015. doi:10.3181/00379727-214-44087
- 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. doi:10.1053/gast.2000.16510
- Wallace, J.L., Syer, S., Denou, E., De Palma, G., Vong, L., McKnight, W., Jury, J., Bolla, M., Bercik, P., Collins, S.M., Verdu, E., Ongini, E., 2011a. Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis. *Gastroenterology* 141, 1314–1322.e5. doi:10.1053/j.gastro.2011.06.075
- Wallace, J.L., Vong, L., Dharmani, P., Srivastava, V., Chadee, K., 2011b. Muc-2-deficient mice display a sex-specific, COX-2-related impairment of gastric mucosal repair. *Am. J. Pathol.* 178, 1126–1133. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.048
- Waller, E.S., 1983. Evaluation of new indomethacin dosage forms. *Pharmacotherapy* 3, 324–33.
- Wang, Q.S., Zhu, X.N., Jiang, H.L., Wang, G.F., Cui, Y.L., 2015. Protective effects of alginate–chitosan microspheres loaded with alkaloids from *Coptis chinensis* Franch. and *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. (Zuojin Pill) against ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *Drug Des. Devel. Ther.* 9, 6151–6165. doi:10.2147/DDDT.S96056
- Watanabe, T., Higuchi, K., Hamaguchi, M., Shiba, M., Tominaga, K., Fujiwara, Y., Matsumoto, T., Arakawa, T., 2004. Monocyte chemotactic protein-1 regulates leukocyte recruitment during gastric ulcer recurrence induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  1–4.
- Watson, D.J., Harper, S.E., Zhao, P.L., Quan, H., Bolognese, J.A., Simon, T.J., 2000. Gastrointestinal tolerability of the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor rofecoxib compared with nonselective COX-1 and COX-2 inhibitors in osteoarthritis. *Arch Intern Med* 160, 2998–3003. doi:10.1001/archinte.160.19.2998
- Weylandt, K.H., Chiu, C.Y., Gomolka, B., Waechter, S.F., Wiedenmann, B., 2012. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: Towards an understanding of resolvins and protectin formation. *Omega-3 fatty acids and their resolvins/protectin mediators. Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 97, 73–82. doi:10.1016/j.prostaglandins.2012.01.005
- Xiao, G., Yuan, F., Geng, Y., Qiu, X., Liu, Z., Lu, J., Tang, L., Zhang, Y., Su, L., 2015. Eicosapentaenoic acid enhances heatstroke-impaired intestinal epithelial barrier function in rats. *Shock* 44, 348–356. doi:10.1097/SHK.0000000000000417
- Yadav, S.K., Adhikary, B., Chand, S., Maity, B., Bandyopadhyay, S.K., Chattopadhyay, S., 2012. Molecular mechanism of indomethacin-induced gastropathy. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1175–1187. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.023
- Yamashima, T., 2015. Dual effects of the non-esterified fatty acid receptor “GPR40” for



- human health. *Prog. Lipid Res.* 58, 40–50. doi:10.1016/j.plipres.2015.01.002
- Yan, X.M., Joo, M.J., Lim, J.C., Whang, W.K., Sim, S.S., Im, C., Kim, H.R., Lee, S.Y., Kim, I.K., Sohn, U.D., 2011. The effect of quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside on indomethacin-induced gastric damage in rats via induction of mucus secretion and down-regulation of ICAM-1 expression. *Arch. Pharm. Res.* 34, 1527–1534. doi:10.1007/s12272-011-0915-4
- Yan, Y., Jiang, W., Spinetti, T., Tardivel, A., Castillo, R., Bourquin, C., Guarda, G., Tian, Z., Tschopp, J., Zhou, R., 2013. Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* 38, 1154–1163. doi:10.1016/j.immuni.2013.05.015
- Yang, R.H., Lin, J., Hou, X.H., Cao, R., Yu, F., Liu, H.Q., Ji, A.L., Xu, X.N., Zhang, L., Wang, F., 2014. Effect of docosahexaenoic acid on hippocampal neurons in high-glucose condition: Involvement of PI3K/AKT/nuclear factor-kB-mediated inflammatory pathways. *Neuroscience* 274, 218–228. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.05.042
- Yoshida, S., Yasutomo, K., Watanabe, T., 2016. Treatment with DHA/EPA ameliorates atopic dermatitis-like skin disease by blocking LTB4 production. *J. Med. Invest.* 63, 187–91. doi:10.2152/jmi.63.187
- Zambalde, É.P., Teixeira, M.M., Favarin, D.C., de Oliveira, J.R., Magalhães, M.L., Cunha, M.M., Silva, W.C., Okuma, C.H., Rodrigues, V., Levy, B.D., Rogerio, A. de P., 2016. The anti-inflammatory and pro-resolution effects of aspirin-triggered RvD1 (AT-RvD1) on peripheral blood mononuclear cells from patients with severe asthma. *Int. Immunopharmacol.* 35, 142–8. doi:10.1016/j.intimp.2016.03.014
- Zhang, S., Chao, G.Q., Lu, B., 2013. Proton pump inhibitors are not the key for therapying non-steroidal anti-inflammatory drugs-induced small intestinal injury. *Rheumatol. Int.* 33, 2513–2521. doi:10.1007/s00296-013-2756-6
- Zhang, X., Tajima, K., Kageyama, K., Kyoji, T., 2008. Irsogladine maleate suppresses indomethacin-induced elevation of proinflammatory cytokines and gastric injury in rats. *World J. Gastroenterol.* 14, 4784–4790. doi:10.3748/wjg.14.4784
- Zhao, J., Wang, H., Shi, P., Wang, W., Sun, Y., 2017. GPR120, a potential therapeutic target for experimental colitis in IL-10 deficient mice. *Oncotarget* 8, 8397–8405. doi:10.18632/oncotarget.14210

## 14.- ANEXOS

### *ANEXO I. Soluciones y reactivos*

- a) Amortiguador de lisis de tejido para técnica de MPO: 50 mM de amortiguador de fosfatos de potasio [ $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$ ] (pH 6) con 0.5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
- b) Amortiguador de fosfato de sodio para técnica de MPO:  $Na_2HPO_4$  0.22M y  $NaH_2PO_4$  0.22M.
- c) Amortiguador de fosfato salino (PBS) NaCl 137 M, KCl 2.7 mM,  $Na_2HPO_4$  10 mM y  $KH_2PO_4$  1.8 M.
- d) Amortiguador de lisis de tejido STM para técnica de extracción nuclear: sacarosa 250mM, Tris-HCl 50 mM y  $MgCl_2$  5 mM
- e) Amortiguador de lisis de tejido NET para técnica de extracción nuclear: HEPES 20 Mm (pH 7.9),  $MgCl_2$  1.5 mM, NaCl 0.5 M, EDTA 0.2 mM, Glicerol 20% y Triton X 100 al 1%.
- f) Amortiguador de fosfato para técnica de ELISA:  $NaH_2PO_4$  y  $Na_2HPO_4$  10mM (pH 7.4).
- g) Amortiguador de lisis de tejido gástrico para técnica de Western Blot 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), PMSF 0.1mMol, Triton X-100 1%, inhibidores de proteasas 2X .
- h) Acrilamida / Bisacrilamida 40%: se pesaron 193.4 g de Acrilamida y 6.6 g de Bisacrilamida se disolvieron en 500 mL de  $H_2O$  bidestilada y se guarda en frasco ámbar a 4°C.
- i) Gel separador: Para dos geles separadores al 12% se emplean 4.3 ml de  $H_2O$  bidestilada, 2.5 ml de Tris 1.5 M pH 8.8, 100  $\mu$ l de SDS 10%, 3 ml de Acrilamida /Bis acrilamida 40 %, 100  $\mu$ l de PSA 10%, 10  $\mu$ l de TEMED. Para dos geles separadores al 10% se emplean 4.8 ml de  $H_2O$  bidestilada, 2.5 ml de Tris 1.5 M pH 8.8, 100  $\mu$ l de SDS 10%, 2.5 ml de Acrilamida / Bis acrilamida 40 %, 100  $\mu$ l de PSA 10% y 10  $\mu$ l de TEMED.

- j) Gel concentrador: Para un gel concentrador al 5% se emplean 3.2 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada, 1.25 ml de Tris 1.5 M pH 6.8, 50 µl de SDS 10%, 0.5ml de Acrilamida / Bis acrilamida 40 %, 50 µl de PSA 10% y 5 µl de TEMED.
- k) Amortiguador de corrida Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M y SDS 0.1%.
- l) Amortiguador de transferencia Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M y MeOH 20 %.
- m) Reactivo de Comassie: 0.25 g de azul de comassie R, 45 ml de etanol, 45 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada y 10 ml de ácido acético glacial.
- n) Solución desteñidora constó de 45 ml de etanol, 45 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada y 10 ml de ácido acético glacial al 10%.
- o) Amortiguador de tris salino (TBS), 20 mM Tris y 500mM de NaCl.
- p) Amortiguador de tris salino (TBS) con Tween-20, 20 mM Tris, 500mM de NaCl y Tween-20 al 0.05 %, para ello se pesan 2.42 g de Tris y 29.22 g de NaCl 8.76 g disueltos en 800 ml de H<sub>2</sub>O, se afora a 1 l con H<sub>2</sub>O bidestilada y finalmente se agregan 0.5 mL de Tween-20.
- q) Solución de bloqueo para GPR120 y GPR40, es TBS-Tween con 15% de leche libre de grasa por 1h, para ello se pesan 3.75 g de leche libre de grasa (Svelty) disuelta en 25 mL de TBS-Tween.

## ANEXO II. Productos de Investigación



INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL  
Dirección Divisinal de Patentes

<input checked="" type="checkbox"/> Solicitud de Patente <input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad  <input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cual: <input type="checkbox"/> Modelo Industrial <input type="checkbox"/> Dibujo Industrial	Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI Sello  Folio de entrada  Fecha y hora de recepción
---	--

Antes de llenar la forma lee las consideraciones generales al reverso

Solicitud: MX/a/2016/017198  
Expediente: 28/DIC/2016 Hora: 11:48:14  
Folio: MX/E/2016/092963 181567



FOLIO 0018-000003

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)			
El solicitante es el inventor <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> solicitante es el causahabiente <input checked="" type="checkbox"/>		
1) Nombre (s): <b>INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL</b>			
2) Nacionalidad (es): MEXICANA			
3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO DE LA DIRECCION GENERAL, AV. LUIS ENRIQUE ERRO S/N, UNIDAD PROFESIONAL "ADOLFO LOPEZ MATEOS", COLONIA ZACATENCO, C.P. 07738			
Población, Estado y País: DELEGACIÓN GUSTAVO A. MADERO, CIUDAD DE MEXICO, MÉXICO			
4) Teléfono (clave): 55 57296000 EXT. 51971 y 51975    5) Fax (clave): 55 51193245			
II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)			
6) Nombre (s): <b>ARACELY EVANGELINA CHÁVEZ PIÑA, ELIZABETH ARLEN PINEDA PEÑA</b>			
7) Nacionalidad (es): MEXICANAS			
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: ISLA DEL CARMEN #15, COL. PRADO VALLEJO, C.P. 54170			
Población, Estado y País: TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO, MÉXICO			
9) Teléfono (clave): 57296000 EXT. 68306    10) Fax (clave):			
III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)			
11) Nombre (s): <b>LIC. CLAUDIA ALEJANDRA BLANCO SALAZAR</b>	12) R G P: 27491		
13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO DE LA DIRECCION GENERAL, AV. LUIS ENRIQUE ERRO S/N, UNIDAD PROFESIONAL "ADOLFO LOPEZ MATEOS", COLONIA ZACATENCO, C.P. 07738			
Población, Estado y País: GAM, CIUDAD DE MEXICO, MÉXICO			
14) Teléfono (clave): 55 57296000 EXT. 51971 y 51975    15) Fax (clave): 55 51193245			
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: <b>CARLOTA MARTÍNEZ MARTIN</b>			
17) Denominación o Título de la invención: <b>USO DEL ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA) COMO AGENTE PROTECTOR FRENTE AL DAÑO INTESTINAL PROVOCADO EN ESPECÍFICO POR FÁRMACOS</b>			
18) Fecha de divulgación previa Día   Mes   Año	19) Clasificación internacional <b>uso exclusivo del IMPI</b>		
20) Divisinal de la solicitud Número	21) Fecha de presentación Día   Mes   Año		
22) Prioridad Reclamada: País   Fecha de presentación (Día   Mes   Año)   No. de serie			
<b>Lista de verificación (uso interno)</b>			
No. Hojas		No. Hojas	
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Comprobante de pago de la tarifa	<input checked="" type="checkbox"/> 2	Documento de cesión de derechos
<input checked="" type="checkbox"/> 25	Descripción y reivindicación (es) de la invención		Constancia de depósito de material biológico
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Dibujo (s) en su caso		Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Documento que acredita la personalidad del apoderado		Traducción
		<b>33</b>	<b>TOTAL DE HOJAS</b>
Observaciones: <b>HOJA DEL 50% DE DESCUENTO (1)</b>			
Bajo protesta de decir verdad, declaro que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.			
<b>LIC. CLAUDIA ALEJANDRA BLANCO SALAZAR</b> Nombre y firma del solicitante o su apoderado	<b>CIUDAD DE MEXICO, A 15 DE DICIEMBRE DE 2016</b> Lugar y fecha		

Página 1 de 2 IMPI-00-009

**Consideraciones generales para su llenado:**

- Este formato es de distribución gratuita. Se autoriza su libre reproducción, siempre y cuando éste no sea alterado y sea presentado impreso su anverso (Página 1) y reverso (Página 2) en una sola hoja de papel blanco y en tamaño oficio.
- Debe llenarse en idioma español, preferentemente a máquina. No obstante, podrá presentarse con letra de molde, siempre que la solicitud sea legible. La información de la solicitud debe ser requisitada toda por el mismo medio, sin tachaduras ni enmendaduras.
- El formato de solicitud por duplicado, debidamente requisitado y firmado en todos sus ejemplares, así como sus documentos anexos, deben presentarse en la Coordinación Departamental de Recepción y Control de Documentos de la Dirección Divisiva de Patentes del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, con domicilio en Anenil # 550, Pueblo Santa María Tepepan, Delegación Xochimilco, C.P. 16020, México, D.F., con horario de atención de 8:45 a 16:00 horas de lunes a viernes o en la ventanilla de las Oficinas Regionales del IMPI o las Delegaciones o Subdelegaciones Federales de la Secretaría de Economía.
- También podrá remitirse la solicitud por correo, servicios de mensajería u otros equivalentes o, en su caso, presentarse por transmisión telefónica facsimilar, en los términos previstos en el artículo 5o, del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial.
- Los documentos anexos redactados en idioma distinto al español deberán acompañarse de la traducción correspondiente.
- Los documentos anexos provenientes del extranjero, cuando proceda, deberán acompañarse de la legalización o, en su caso, apostilla correspondiente.
- En el formato de solicitud marque con una X en el recuadro la solicitud que desea presentar.
- En caso de Registro de Diseño Industrial señale además si se trata de un modelo o un dibujo.
- La denominación o título debe ser connotativa de la invención.
- Si la invención fue divulgada dentro de los doce meses previos a la fecha de presentación de la solicitud, indique la fecha de divulgación y anexe la información comprobatoria que marca el Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial.
- En la solicitud de invención que sea divisiva de una solicitud previamente presentada, deberá proporcionar el número de expediente, la figura jurídica y la fecha de presentación de dicha solicitud.
- El derecho de reclamar la prioridad sólo tiene lugar si la presente solicitud ha sido previamente presentada en algún país miembro del Convenio de París para la Protección de la Propiedad Industrial. Proporcionar los siguientes datos:
  - País donde se presentó por primera vez la solicitud, fecha y número asignado a la solicitud en dicho país.
  - En el listado de documentos que se anexan mencione el total de hojas que comprende cada documento y al final el total de hojas

**Trámite al que corresponde la forma:** Solicitud de Patente, Registro de Diseño Industrial y Registro de Modelo de Utilidad.

**Número de Registro Federal de Trámites y Servicios:** IMPI-03-001, IMPI-03-002, IMPI-03-003.

**Fecha de autorización de la forma por parte de la Dirección General Adjunta de Propiedad Industrial del IMPI:** 2-XII-2011.

**Fecha de autorización de la forma por parte de la Comisión Federal de Mejora Regulatoria:** 8-XII-2011.

**Fundamento jurídico-administrativo:**

Ley de la Propiedad Industrial. Arts. 38-47, 50, 52, 53-54, 55-61 (D.O.F. 27-VI-91, reformas D.O.F. 2-VIII-94, 25-X-96, 26-XII-97, 17-V-99, 26-I-04, 16-VI-05, 25-I-06, 06-V-09, 08-I-10, 18-VI-10 y 28-VI-10).

Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial. Arts. 5-8, 16, 24-39, 43, 45 y 46 (D.O.F. 23-XI-94, reformas D.O.F. 10-IX-02, 19-IX-03 y 10-VI-11).

Acuerdo que establece las reglas para la presentación de solicitudes ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Arts. 3-10 y 34 (D.O.F. 14-XII-94, reformas D.O.F. 22-III-99, 14-XII-00, 20-VI-03, 11-VII-03, 15-III-10 y 2-IV-10).

Acuerdo por el que se da a conocer la tarifa por los servicios que presta el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Arts. 1 inciso a); 9, inciso a) y demás aplicables (D.O.F. 23-VIII-95, reformas D.O.F. 28-XII-95, 10-XII-95, 2-V-97, 4-V-95, 23-III-99, 11-X-00, 17-X-01, 13-XI-01, 24-XII-01, 27-II-02, 14-III-02, 14-XI-02, 04-II-03, 8-X-03, 27-X-04, 23-III-05, 13-IX-07, 1-VI-09, 10-VIII-09, 24-VIII-09, 1-X-10 y 10-V-11).

Acuerdo por el que se da a conocer la lista de instituciones reconocidas por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial para el depósito de material genético (D.O.F. 30-V-97).

Acuerdo por el que se establecen reglas y criterios para la resolución de diversos trámites ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Art. 4-18 (D.O.F. 9-VIII-04).

Acuerdo por el que se dan a conocer los horarios de trabajo del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Art.1. (D.O.F. 31-III-99, reforma D.O.F. 20-I-11).

**Documentos anexos:**

**Solicitud de Patente y Registro de Modelo de Utilidad**

- Comprobante de pago de la tarifa correspondiente (original y copia)
- Descripción, reivindicación, resumen y dibujo (duplicado)

**Solicitud de Registro de Diseño Industrial**

- Comprobante de pago de la tarifa (original y copia)
- Descripción, reivindicación y dibujo o fotografía (duplicado)

**Documentos adicionales que deberán presentarse en su caso:**

- Constancia de depósito de material biológico
- Acreditación de personalidad del apoderado, en su caso (original)
- Acreditación del poderante en el caso de persona moral, señalando el instrumento donde obran dichas facultades y acta constitutiva (original)
- Documento donde se acredita el carácter del causahabiente o de cesión de derechos (original)
- Documento comprobatorio de divulgación previa, en su caso (original y copia)
- Documento de prioridad y su traducción, en su caso (copia certificada expedida por la oficina extranjera)
- Escrito solicitando el descuento del 50%, cuando corresponda (original)

**Criterios de resolución del trámite**

- Presentar toda la documentación requerida y pagos de la tarifa conforme a la legislación nacional y convenios internacionales de los que México forma parte.
- Será suficiente el cumplir con los requisitos formales al momento de presentar su solicitud.

**Tiempo de respuesta:**

El plazo máximo de primera respuesta es de 3 meses. No aplica la positiva ni la negativa ficta.

**Número telefónico para quejas:**

Órgano Interno de Control en el IMPI  
5624-04-12 ó 13 (directo)  
5624-04-00 (conmutador)  
Extensiones: 11028 y 11234.  
Fax: 56-24-04-35  
Correo electrónico: [quejasnet@impi.gob.mx](mailto:quejasnet@impi.gob.mx)

Para cualquier aclaración, duda y/o comentario con respecto a este trámite, sírvase llamar al Sistema de Atención Telefónica a la Ciudadanía-SACTEL a los teléfonos: 20002000 en el D.F. y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario al 01-800-11205-84 o desde Estados Unidos y Canadá al 1-800-475-23-93.

Número telefónico del responsable del trámite para consultas: 53 34 07 00 extensiones 10098 y 10026.



Certificado de acuse  
de recibo registro(s):  
MX/2016/092963

DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES  
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO DE  
PATENTES  
COORDINACION DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FORMA  
Expediente de Patente de Invención Norma: MX/a/2016/017198

Asunto: Resultado del Examen de Forma.

Ciudad de México, a 16 de marzo de 2017

Claudia Alejandra BLANCO SALAZAR  
Apoderado de  
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
Edificio De La Direccion General, Av. Luis Enrique Erro S/N,  
Unidad Profesional Adolfo Lopez Mateos  
Zacatenco  
07738, GUSTAVO A. MADERO, Ciudad de México, México

No. de Folio: 21863

RECIBI ORIGINAL

Nombre:

Fecha:

Firma:

REF: Se da acuse de recibo a su Solicitud presentada el 20/12/2016.

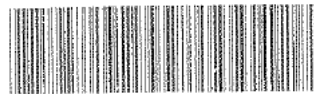
Se tiene por satisfecho el examen de forma señalado por la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento.

Cabe señalar que de conformidad con los artículos 52 de la Ley de la Propiedad Industrial; 39 y 40 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial vigentes, una vez concluido el examen de forma y, después del vencimiento del plazo de 18 meses, contado a partir de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de prioridad reconocida, toda solicitud de patente será publicada en la Gaceta, conteniendo los datos bibliográficos comprendidos en la solicitud presentada, el resumen de la invención y, en su caso, el dibujo más ilustrativo de la misma o la fórmula química que mejor la caracterice.

No obstante, la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento también prevén que, a petición del solicitante mediante escrito, la solicitud de patente podrá ser publicada de manera anticipada, siempre que la misma haya aprobado el examen de forma y el solicitante entere al Instituto el pago de la tarifa correspondiente (artículo 1d).

Así, una vez publicada la solicitud, de conformidad al artículo 52 BIS de la Ley de la Propiedad Industrial, cualquier persona podrá dentro de un plazo de seis meses posteriores a aquella, presentar ante el Instituto, información concerniente a los requisitos de patentabilidad y sus excepciones (artículos 16 y 19 de la Ley de la Propiedad Industrial), por lo que el Instituto dará inicio al examen de fondo hasta haber transcurrido los plazos especificados.

El suscrito firma el presente oficio con fundamento en los artículos 6º fracciones III y XI y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 2º, 3º fracción V, inciso a), sub inciso i), segundo guión, 4º, 5º y 12º fracciones I, II, III, IV y VI del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 07/09/2007); artículos 1º, 2º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a)




MX/2017/21863

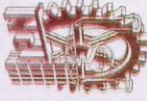


sub inciso i), segundo guión, 16 fracciones I, II, III, IV y VI y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); artículos 1º, 3º y 5º inciso e) e i) y penúltimo párrafo del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

ATENTAMENTE  
COORDINADOR DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FORMA

  
OMAR SANTIAGO GALVEZ CASTILLO.

OSGC/BCC/2017



Otorga la presente

## CONSTANCIA

*A la: C. Pineda Peña Elizabeth Arlen*

Por su valiosa participación como ponente con el tema "*Evaluación de las moléculas implicadas en el mecanismo gastro y enteroprotector del DHA (Ácido docosahexaenoico) en el daño gastrointestinal generado por indometacina*", en las VI Jornadas Académicas del Doctorado en Biología del I.P.N., que se llevaron a cabo en CEPROBI, Yauatepec, Morelos, los días 5 y 6 de noviembre de 2013.

Yauatepec, Morelos, México, a 6 de Noviembre de 2013

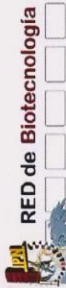
Dr. en C. Cesar Augusto Sandino Reyes López  
Jefe de la SEPI-ENMyH-IPN

Dra. en C. Maria Esther Ramirez Moreno  
Coordinador del Nodo de Doctorado ENMyH-IPN

DR. CRISÓFORO ORDOÑES LÓPEZ  
DIRECTOR de la ENMyH-IPN







Instituto Politécnico Nacional  
"La técnica al servicio de la patria"

## Instituto Politécnico Nacional Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Otorga el presente reconocimiento a:

# Elizabeth Arlen Pineda Peña

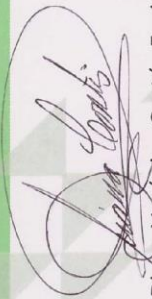
por su participación como ponente en las



JORNADAS ACADÉMICAS DEL  
DOCTORADO EN CIENCIAS  
EN BIOTECNOLOGÍA



Celebradas el 14 de octubre de 2014 dentro del marco del  
1st Biotechnology World Symposium & 9° Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN  
Atlihuetzía, Tlaxcala, México.

  
Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa  
Coordinadora de nodo CIBA  
del Doctorado en Ciencias en Biotecnología

  
Dr. Miguel Ángel Reyes López  
Coordinador general del  
Doctorado en Ciencias en Biotecnología CBA Reynosa

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara  
Director interino del CIBA-Tlaxcala



El Instituto Politécnico Nacional  
a través de su Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología  
Otorga la presente:



# CONSTANCIA

a:

**ELIZABETH ARLEN PINEDA PEÑA**

Por la presentación del tema de Tesis: "EVALUACIÓN DE LAS MOLÉCULAS IMPLICADAS EN EL MECANISMO GASTRO Y ENTERO PROTECTOR DEL DHA (ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO) EN EL DAÑO GASTROINTESTINAL GENERADO POR INDOMETACINA", en las XI Jornadas Académicas del Doctorado en Ciencias en Biotecnología, los días 16 y 17 de Mayo del 2016 en la ciudad de Durango, Dgo. México

**Atentamente**  
"La Técnica al Servicio de la Patria"



**Dr. Miguel Ángel Reyes López**  
Coordinador General del Doctorado en Ciencias en Biotecnología





**XXXVI Congreso Nacional de Farmacología**  
**XII Congreso de Investigación en Medicina de la ESM-IPN**  
**XVI Congreso Estudiantil de Farmacología en honor al Dr. Sergio Estrada Parra**

*Dra. Rosa Amalia Bobadilla Lugo, Presidenta Honoraria del Congreso*



**Otorga constancia a:**

**Pineda Peña Elizabeth Arlen, Chávez Piña Aracely Evangelina**

Facultad de Medicina



**Por su participación como PONENTE(S) DEL CARTEL TITULADO:**  
**Evaluación del efecto gastro y entero protector del DHA (ácido docosaheptaenoico) en el daño gastrointestinal generado por indometacina**



*Unidad Politécnica para el Desarrollo Empresarial y para la Competitividad del IPN  
 y Centro General de Formación e Innovación Educativa del IPN  
 Ciudad de México, D. F., del 12 al 14 de mayo de 2014.*

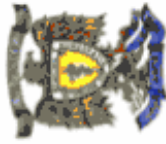
Por el Comité Organizador

**Dr. José Miguel Cervantes Alfaro**  
 Presidente de la Asociación Mexicana de Farmacología A. C.



**XXXVI Congreso Nacional de Farmacología**  
**XII Congreso de Investigación en Medicina de la ESM-IPN**  
**XVI Congreso Estudiantil de Farmacología en honor al Dr. Sergio Estrada Parra**  
*Dra. Rosa Amalia Bobadilla Lugo, Presidenta Honoraria del Congreso*

*Otorga constancia a:*



**Pineda Peña Elizabeth Arlen, Chávez Piña Aracely Evangelina**

*Por su brillante presentación como FINALISTAS con la ponencia:*



**Evaluación del efecto gastro y entero protector del DHA (ácido docosaheptaenoico) en el daño gastrointestinal generado por indometacina**

**y GANADORES DE MENCIÓN ESPECIAL como mejor trabajo en el tema "Gastrointestinal"**



*Unidad Politécnica para el Desarrollo Empresarial y para la competitividad del IPN*  
*Ciudad de México, D. F., del 12 al 14 de mayo de 2014.*  
*Por el Comité Organizador*

**Dr. José Miguel Cervantes Alfaro**  
Presidente de la Asociación Mexicana de Farmacología A. C.



# Instituto Politécnico Nacional

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Tlaxcala



AWARDS THIS

## CERTIFICATE OF PRESENTATION

to:

**Elizabeth Arlen Pineda-Peña and Aracely Evangelina Chávez-Piña**

for presenting the contribution entitled:

**PROTECTIVE EFFECT OF DOCOSAHEXAENOIC ACID AGAINST  
INDOMETHACIN-INDUCED GASTROINTESTINAL INJURY IN MICE**

IN THE

**1<sup>ST</sup> BIOTECHNOLOGY & 9<sup>º</sup> ENCUENTRO NACIONAL  
WORLD SYMPOSIUM DE BIOTECNOLOGÍA DEL IPN**

Atlihuetzia Tlaxcala, México, October 13 to 16, 2014.

Dra. Myrna Solís Oba  
Presidente del comité organizador

Dra. ~~Norma~~ Patricia Muñoz Sevilla  
Secretaría de Investigación y Posgrado

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara  
Director CIBA Tlaxcala



*Neuroscience 2015  
October 17 - 21, 2015  
Chicago, IL*

Please let this serve to certify that

***Elizabeth Pineda Pena, MS***

has attended Neuroscience 2015, the 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience at the McCormick Convention Center, Chicago, IL. Additionally, this attendee has participated in the following scientific session(s) listed below:

Session Type: Poster

Session Title: Gastrointestinal, Renal/Urinary, and Reproductive Regulation

Session Date/Time: 10/19/2015 8:00

Presentation Number: 348.15

Presentation Title: Evaluation of the mechanism involved in the gastro protective effect of DHA (docosahexaenoic acid) in the indomethacin-induced gastric injury model in mice

The Society for Neuroscience (SfN) is a nonprofit membership organization of basic scientists and physicians who study the brain and nervous system. The Society's primary goal is to promote the exchange of information among researchers. For this purpose, SfN holds a prestigious annual meeting, attended by scientists and researchers from around the globe. It is considered the most important annual forum for the neuroscience research community, offering attendees the opportunity to learn about the latest advances in brain research and to meet and network with their colleagues at top destinations throughout the United States.

Sincerely,

Kyle Hayden, CMP  
Assistant Director of Annual Meeting Programs  
Society for Neuroscience

**Date:** October 19, 2015



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Química



Otorga la presente

## CONSTANCIA

a:

Elizabeth A. Pineda-Peña, Aracely E. Chavez-Piña

Por su participación en la realización y presentación del cartel:

### **"Evaluación de las moléculas implicadas en el efecto gastroprotector de DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gástrico generado por indometacina"**

Durante el segundo simposio "Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos" realizado los días 22 y 23 de junio de 2016 en la explanada del A de la Facultad de Química.

Dr. Andrés Navarrete Castro  
Jefe del Departamento de Farmacia

"Por mi raza hablará el espíritu"

Ciudad Universitaria, D.F. a 23 de junio de 2016

Dr. Alfonso S. Lira Rocha  
Comité Organizador

Instituto Politécnico Nacional  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas  
y el Posgrado en Biomedicina y Biotecnología Molecular

OTORGAN LA PRESENTE

# CONSTANCIA

A:

Elizabeth Arlen Pineda-Peña; Aracely Evangelina Chávez-Piña

Por su destacada participación con el trabajo de investigación:

Evaluación de las moléculas implicadas en el efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoico)  
en el daño gástrico generado por indometacina

Con número de registro: CBM5APL20170228

Dentro de las

XV Jornadas

bbm

Dr. José Luis Muñoz Sánchez

Dr. Mario Alberto Rodríguez Casas  
Director de la Escuela Nacional de  
Ciencias Biológicas

Dr. Gerardo Aparicio Soto  
Jefe de la Sección de Estudios  
de Posgrado e Investigación

Dra. Rosa María Ribas Jaimes  
Coordinadora del Posgrado en Biomedicina  
y Biotecnología Molecular

