

R.13535 T. 1008

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 96 número 17 del libro  
correspondiente. **23 JUL. 1999**

Sevilla, \_\_\_\_\_

El Jefe del Negociado de Tesis,

*[Handwritten signature]*

**MECANISMOS IMPLICADOS EN LA GASTROPROTECCIÓN MEDIADA  
POR IBUPROFENO / L-ARGININA.**

Memoria presentada por **M<sup>a</sup> Dolores Jiménez Gordillo**  
para optar al grado de Doctora en Farmacia

1999

*[Handwritten signature]*

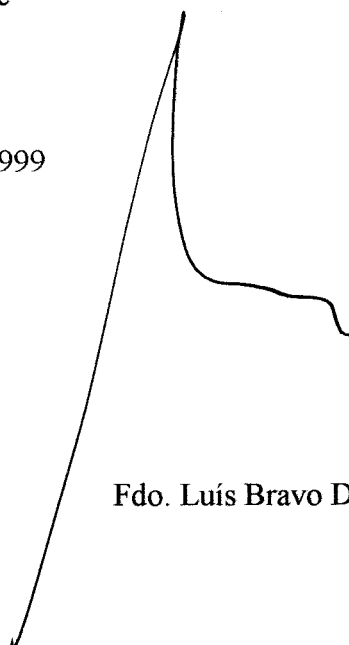
LBS 1242400

D. Luis Bravo Díaz, Catedrático de Farmacognosia y Director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA: Que la presente tesis Doctoral titulada "MECANISMOS IMPLICADOS EN LA GASTROPROTECCIÓN MEDIADA POR IBUPROFENO / L-ARGININA", ha sido dirigida por las Doctoras Dña M<sup>a</sup> José Martín Calero y Dña Virginia Motilva Sánchez y realizada en el departamento de farmacología de esta Facultad, cumpliendo los requisitos para este tipo de trabajo.

Y para que conste, firmo el presente

En Sevilla, a 7 de Julio de 1999

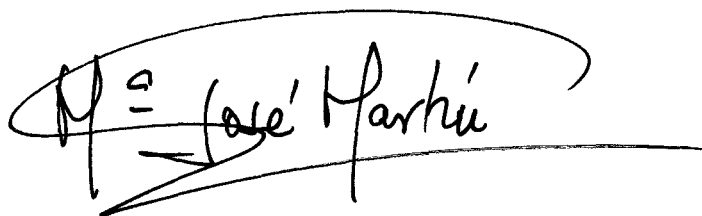
A handwritten signature in black ink, consisting of a long, thin diagonal stroke that curves upwards and then downwards into a more complex, stylized shape.

Fdo. Luis Bravo Díaz

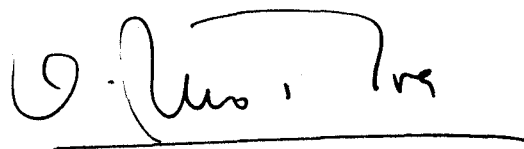
M<sup>a</sup> José Martín Calero y Virginia Motilva Sánchez, Profesoras Titulares del Departamento de Farmacología, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla

CERTIFICAN: Que la presente Tesis Doctoral titulada "MECANISMOS IMPLICADOS EN LA GASTROPROTECCIÓN MEDIADA POR IBUPROFENO / L-ARGININA", realizada por M<sup>a</sup> Dolores Jiménez Gordillo para aspirar al grado de Doctora en farmacia, ha sido llevada a cabo bajo su dirección.

En Sevilla, a 7 de Julio de 1999

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M.ª José Martín Calero". The signature is written in a cursive style and is underlined with a single horizontal line.

Fdo. M<sup>a</sup> José Martín Calero

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Virginia Motilva Sánchez". The signature is written in a cursive style and is underlined with a single horizontal line.

Fdo. Virginia Motilva Sánchez

*No basta dar pasos que un día puedan conducir hasta la meta, sino que cada paso ha de ser una meta, sin dejar de ser un paso.*

Johann P. ECKERMANN

*La alegría está en la lucha, en el esfuerzo, en el sufrimiento que supone la lucha, y no en la victoria misma. Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado final. Un esfuerzo total es una victoria completa.*

Mahatma GANDHI

## *AGRADECIMIENTOS*

A la Dra Elisa Marhuenda y al Dr Luis Bravo por permitirme realizar éste trabajo de investigación en el Dpto de Farmacología.

A las Dras M<sup>a</sup> José Martín, Virginia Motilva y Catalina Alarcón de la Lastra no sólo por haber dirigido y ayudado a la realización de mi tesis, sino porque me habéis enseñado el significado de las palabras: “investigación” y “trabajar en grupo”. Gracias por confiar en mí.

A mis inseparables y sin duda, inolvidables, compañeros de grupo: Juan, Isabel, Ana, Mariló, Susana, Mamen y Betina, porque siempre habéis estado ahí cuando más os he necesitado. Gracias chicos.

A todos mis otros compañeros del Dpto por vuestra colaboración y amistad.

A todos los profesores del Dpto por todo lo que me han enseñado a lo largo de éstos años.

A M<sup>a</sup> Carmen, por ayudarme con los números y los papeles siempre a última hora.

A Gracia y Rosa quienes cada una en su momento, me han facilitado lo necesario para mi trabajo. Muchos ánimos a las dos.

A M<sup>a</sup> Carmen Cortés, amiga entre las amigas, la que siempre está ahí cuando lo necesitas y nunca te falla. Gracias por ser mi amiga.

A los Laboratorios Zambón S.A. por haber financiado éste proyecto de investigación, especialmente al Dr Esteras y al Dr Bruseghini.

Al Dpto de Farmacología de la Facultad de Medicina de Cádiz, y muy especialmente al Prof. José Esteban por haberme admitido y dado la posibilidad de aprender técnicas nuevas en su laboratorio.

A los Prof. Juan Miguel y Juan Ramón del Dpto de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, quiénes me han permitido estar con su grupo y aprender de ellos, y muy especialmente al Dr David Pozo, quién me ha enseñado la mayor parte de lo que sé sobre Biología Molecular.

En último lugar, pero sin duda, no menos importante, a mis padres y a mi hermano, por vuestro cariño, ánimos y por enseñarme a defender y luchar en lo que uno cree.

A Manolo, te dije que haría algo importante, creo que esto es importante, que poco a poco daría pasitos, y mira que gran paso he dado. Gracias por apoyarme en todo y sobre todo, por confiar en mí.

# ÍNDICE

<b>I- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
--	----------

## **II- IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL ÓXIDO NÍTRICO**

<b>II.1- ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....</b>	<b>5</b>
---	----------

<b>II.2- SÍNTESIS, DIFERENCIAS ENZIMÁTICAS Y REGULACIÓN GENÉTICA.....</b>	<b>7</b>
---	----------

<b>II.3- FUNCIONES DEL ÓXIDO NÍTRICO.....</b>	<b>18</b>
---	-----------

II.3.1- ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA CONSTITUTIVA ENDOTELIAL.....	18
--	----

II.3.2- ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA CONSTITUTIVA NEURONAL.....	21
--	----

II.3.3- ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA INDUCIBLE.....	24
---	----

II.3.4- ÓXIDO NÍTRICO SINTETIZADO VÍA NO ENZIMÁTICA.....	30
--	----

<b>II.4- PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA FUNCIÓN GASTROINTESTINAL .....</b>	<b>35</b>
---	-----------

II.4.1- ACCIONES Y EFECTOS PRODUCIDOS.....	35
--	----

- Esófago.....	35
----------------	----

- Tracto Gastrointestinal.....	35
--------------------------------	----

- Hígado.....	38
II.4.2- RELACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO CON LA ENZIMA CICLOOXIGENASA.....	39
II.5- IMPORTANCIA DEL AMINOÁCIDO ARGININA.....	41
II.6- PERFIL FARMACOLÓGICO DE IBUPROFENO Y L-ARGININA .....	44

### **III- MATERIAL Y METODOS**

III.1- REACTIVO ANIMAL.....	63
III.2- SUSTANCIAS ENSAYADAS. PAUTAS POSOLÓGICAS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN.....	64
III.3- EQUIPOS ANALÍTICOS UTILIZADOS.....	66
III.4- EVALUACIÓN DEL DAÑO GÁSTRICO.....	67
<i>III.4.1- ESTUDIO MACROSCÓPICO DE LAS LESIONES: SELECCIÓN DE DOSIS Y TIEMPOS DE TRATAMIENTOS</i>	
III.4.1.1- EFECTOS INDUCIDOS TRAS LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE LOS FÁRMACOS.....	67
III.4.1.2- EFECTOS PRODUCIDOS TRAS LA ADMINISTRACIÓN PARENTERAL DE L-ARGININA.....	68



<i>III.4.2- ESTUDIO MICROSCOPICO DE LAS LESIONES.....</i>	<i>69</i>
---	-----------

**III.5-MECANISMOS IMPLICADOS.....71**

*III.5.1- MODIFICACIONES INDUCIDAS SOBRE EL METABOLISMO  
OXIDATIVO*

III.5.1.1- NIVELES DE LIPOPEROXIDOS EN LA MUCOSA.....	71
---	----

III.5.1.2- MEDIDA DEL INDICE DE INFILTRACION LEUCOCITARIA. ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA.....	73
--	----

III.5.1.3- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD XANTIN- OXIDASA.....	76
--	----

III.5.1.4- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	77
--	----

III.5.1.5- CAMBIOS EN EL METABOLISMO DEL GLUTATION.....	79
---	----

- Determinación de los niveles de glutacion total.....80

- Estudio de la actividad glutacion peroxidasa.....81

*III.5.2- PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL EFECTO PROTECTOR  
DE L-ARGININA*

III.5.2.1- TRATAMIENTOS CON DONADORES E INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS LESIONES.....	83
--	----

III.5.2.2- ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA	
--	--

ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA.....	84
III.5.2.3- MODIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE GMPc. RELACIÓN TIEMPO-EFECTO.....	86
III.5.2.4- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÁSTRICA DE LA ENZIMA NOS - Expresión de mRNA de NOSi y NOSc.....	87
<i>III.5.3- IMPLICACIÓN DE LA ENZIMA CICLOOXIGENASA EN LOS MECANISMOS DESARROLLADOS</i>	
III.5.3.1- MEDIDA DE PROSTAGLANDINA E <sub>2</sub> MUCOSAL.....	91
III.5.3.2- ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÁSTRICA DE LAS PROTEÍNAS COX-1 Y COX-2.....	92
<b>III.6- ANALISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>94</b>

## **IV-RESULTADOS**

<b>IV.1- EFECTOS DE L-ARGININA SOBRE LAS LESIONES GÁSTRICAS INDUCIDAS POR IBUPROFENO.....</b>	<b>96</b>
IV.1.1- EVALUACIÓN DEL DAÑO MACROSCÓPICO. RELACIÓN TIEMPO-EFECTO.....	96
IV.1.2- VALORACIÓN DEL DAÑO MICROSCÓPICO.....	104

<b>MUCOSA GÁSTRICA</b> .....	107
<b>IV.3-IMPLICACIONES DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL EFECTO PROTECTOR DE L-ARGININA</b> .....	114
IV.3.1- RESPUESTA ANTE DONADORES E INHIBIDORES DE SU SÍNTESIS. VALORACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS LESIONES.....	114
IV.3.2- EVALUACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS INDICADORES DE ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO.....	119
IV.3.3- EXPRESIÓN DE LA ENZIMA ÓXIDO-NÍTRICO SINTETASA.....	123
<b>IV.4- ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CICLOOXIGENASA</b> .....	125
<b>V- DISCUSIÓN</b> .....	128
<b>VI- CONCLUSIONES</b> .....	140
<b>VII- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	143
<b>VIII- NOMENCLATURA</b> .....	162
<b>IX- INDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	165

**I-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

Sería casi excepcional encontrar hoy en día a un paciente afectado de dolor articular e inflamación que no consuma o haya consumido antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Sin embargo, con las dosis habituales de cualquiera de ellos no se puede pasar por alto un hecho bastante relevante: la alta incidencia de problemas gastrointestinales que causan, destacando su toxicidad precisamente en personas mayores. Es frecuente el ingreso en urgencias de todos los hospitales, de pacientes con hemorragias, algunas de ellas muy graves, debidas a las erosiones ulcerosas causadas por un AINE. Además, el coste económico derivado presenta también elevadas proporciones. Según datos publicados recientemente, los AINE el pasado año en Estados Unidos provocaron 107.000 ingresos por hemorragia digestiva con 16.500 muertes, más incluso que las causadas por SIDA.

A la vista de estas estadísticas, es natural el gran esfuerzo que actualmente realizan la comunidad científica y las industrias farmacéuticas por conseguir nuevas moléculas o, al menos, reducir la patogenicidad de las existentes. Las investigaciones se dirigen hacia dos líneas fundamentales: encontrar fármacos con características protectoras de la mucosa que administrados junto con el AINE reduzcan su toxicidad, o bien desarrollar nuevos antiinflamatorios menos gastrolesivos sin menoscabo de sus propiedades terapéuticas. En este sentido, y gracias a los descubrimientos de Needleman, actualmente se están produciendo importantes cambios en la farmacología del dolor y la inflamación con la incorporación de la nueva generación de inhibidores de COX-2.

El óxido nítrico juega un papel importante, diverso y a veces, incluso controvertido en diferentes procesos fisiológicos y patológicos. Sin embargo, a nivel digestivo, la actuación de la forma constitutiva de la enzima sintetizadora produciría unos niveles de óxido nítrico que, como las prostaglandinas, presenta propiedades protectoras de la mucosa incrementando el flujo sanguíneo, la liberación de moco o favoreciendo los procesos proliferativos y reparadores. Estas circunstancias han propiciado el interés de investigar sobre moléculas donadoras del gas, que asociadas con

los AINE, compensaran sus efectos deletéreos consecuentes a la reducción de las prostaglandinas citoprotectoras.

El precursor biológico de este mediador endógeno es L-arginina, un aminoácido esencial en el hombre, y substrato de diferentes enzimas implicadas en importantes rutas metabólicas, incluyendo la sintetasa del óxido nítrico. Debido a ésta característica, en los últimos años se ha puesto de manifiesto la utilidad de L-arginina en diferentes patologías. Datos clínicos demuestran como, por ejemplo en pacientes hipertensos, la administración exógena del aminoácido produce descenso en la presión arterial y caída de la resistencia total periférica con incremento de la concentración plasmática de GMPc. Sin embargo, a nivel gastrointestinal no existen apenas datos sobre su posible papel en la homeostasis vascular digestiva relacionada con el óxido nítrico.

Estas circunstancias han propiciado nuestro interés en valorar las propiedades protectoras gástricas del aminoácido frente a las lesiones por AINE tratando de profundizar en los posibles mecanismos implicados. Concretamente, nuestro estudio ha sido planteado según los siguientes **objetivos:**

- Determinar los cambios macro y microscópicos que L-arginina provoca en mucosa gástrica de rata, tras su administración conjunta con dosis equimolares de ibuprofeno, comparando dichos cambios con los observados para el AINE solo.
- Evaluar los mecanismos oxidativos desencadenados tras las alteraciones gástricas de tipo isquémico consecuencia de la administración del AINE, así como las modificaciones inducidas por el aminoácido.
- Conocer la relación entre la protección proporcionada por L-arginina con mecanismos óxido nítrico dependientes, analizando posibles cambios en la actividad y niveles de expresión de la enzima sintetizadora.

- Valorar otras vías implicadas en la protección de L-arginina y, en concreto, la consecuencia de las posibles conexiones entre la enzima ciclooxigenasa y la vía del óxido nítrico.

## **II- IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL ÓXIDO NÍTRICO**



## **II.1 – ANTECEDENTES HISTORICOS**

En 1980, Furchgott y Zawadzki (farmacólogos cardiovasculares del Hospital de Bownstate de Brooklyn) demostraron que la relajación de la aorta aislada de conejo, inducida por acetilcolina, dependía de la liberación de una sustancia que en presencia de endotelio vascular difundía hasta las células musculares lisas próximas y que fué denominado más tarde “*factor relajante derivado del endotelio*” (EDRF) (Furchgott y Zawadzki, 1980; Furchgott, 1984; Moncada y cols., 1995).

En estudios posteriores se comprobó que este mediador tenía una vida media efímera, 6-10 sg, que su acción era inhibida por hemoglobina/azul de metileno y que a nivel del músculo liso, su actuación implicaba la estimulación de la enzima guanililciclase soluble (GCs) con aumento de los niveles guanidín monofosfato cíclico (GMPc). Los bioensayos demostraron que los aniones superóxido ( $O_2^-$ ) provocaban la inestabilidad del EDRF de manera que su acción se prolongaba en presencia de superóxido dismutasa (SOD) y se inhibía con  $Fe^{2+}$  (Furchgott, 1988; Moncada y cols., 1991).

Es a mediados de 1986, cuando Furchgott lanza la idea de que EDRF podría ser el óxido nítrico (NO), lo que coincide con la propuesta de Ignarro (Universidad de California, Los Angeles) quién había sugerido que se trataba de un óxido de nitrógeno o un derivado de éste (Ignarro y cols., 1988). Ambos fundamentaban sus ideas en las semejanzas farmacológicas que existían entre las dos moléculas: inestabilidad, efecto relajante por estimulación de la GCs, inhibición por hemoglobina y estabilización por SOD (Furchgott, 1988).

Moncada y colaboradores (Wellcome Research Laboratories de Beckenham), provocaron la liberación del EDRF en las células endoteliales registrando el efecto relajante sobre el músculo liso. Determinaron la cantidad de NO liberado, resultando ser suficiente para explicar por completo la relajación de las células musculares adyacentes

y por tanto confirmar que el NO y el EDRF eran una misma molécula. Para verificarlo, se compararon sus propiedades farmacológicas en músculo liso vascular y en plaquetas, presentándose idénticos perfiles: ambos relajaban aortas de conejo (privadas antes de endotelio), incrementándose el efecto con SOD e inhibiéndose en presencia de hemoglobina. En plaquetas, se observó una disminución de su agregación, y ésta acción también era inhibida en presencia de hemoglobina y  $Fe^{2+}$ .

Estudios posteriores confirmaron la identidad del NO avanzándose en el conocimiento de sus funciones. La mayoría de ellas están reguladas por proteínas y macrocompuestos de gran complejidad, lo que resulta llamativo frente a una molécula tan sencilla como el NO.

La primera indicación de que el gas podría tener relación con el sistema nervioso (SN) se produjo en 1982. Takeo Deguchi observó que su síntesis en cerebro requería el aminoácido arginina. La utilización de técnicas de inmunohistoquímica, permitió localizar a la enzima sintetizadora de NO, en neuronas de la hipófisis y de la corteza cerebral (Palmer y cols., 1987). Es en 1989, cuando Moncada confirma el papel del aminoácido en el SNC y su relación con la formación de NO (Snyder y Brecht, 1992).

A principios de 1989 se investiga su posible función en la transmisión sináptica, buscando la región cerebral donde el glutamato influyera sobre el GMPc (Moncada, 1991). James Ferrendel observó un pronunciado y rápido aumento del metabolito cuando a unos cortes de cerebelo se les añadía glutamato. De igual forma, midiendo la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), pudo confirmarse que el N-metil-D-aspartato (NMDA) provocaba una elevación considerable en los niveles de GMPc. Tras la adición de unos inhibidores de la NOS, concretamente metil-arginina, se bloqueaba la formación del nucleótido a concentraciones iguales a las que se inhibía la enzima (Kerwin y cols., 1995).

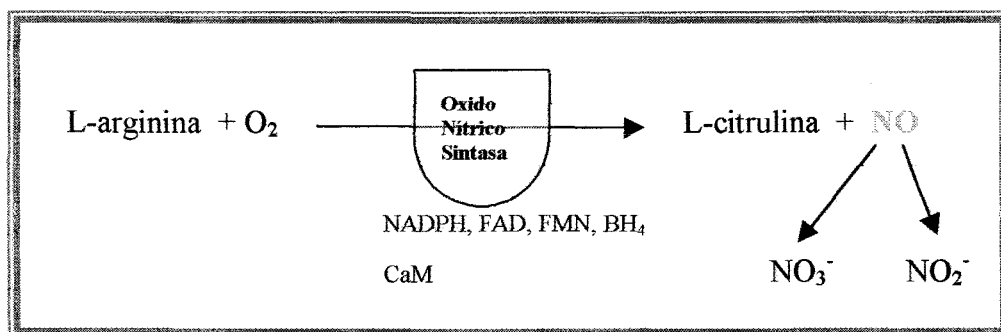
En la década de los 90, son muchos los grupos de investigación dedicados no sólo a estudiar el papel del NO en procesos fisiológicos sino también patológicos.

## **II.2- SÍNTESIS, DIFERENCIAS ENZIMÁTICAS Y REGULACIÓN GENÉTICA**

La demostración de que la formación de nitratos y nitritos en macrófagos activados se producía a partir de L-arginina (L-arg) (Palmer y cols., 1987) o que cuando a células endoteliales, cultivadas en ausencia del aminoácido, se les adicionaba éste, aumentaba drásticamente la liberación de éstos compuestos (Moncada y cols., 1991), propició la hipótesis de que éste fuese el aminoácido precursor del NO. La utilización de espectrometría de masa y del isótopo  $^{15}\text{N}$ -L-arginina, permitió comprobar la formación de  $^{15}\text{NO}$  a partir precisamente del átomo de nitrógeno del terminal guanidínico del aminoácido (Moncada y cols., 1991).

El significado biológico de la formación de NO, se investigó utilizando el compuesto  $\text{N}^G$ -monometil-L-arginina (L-NMMA), del cual se sabía su poder inhibitorio en la formación de nitritos y nitratos en macrófagos (Moncada y cols., 1991). L-NMMA inhibía la liberación de NO de células endoteliales cultivadas específicamente, y dicha acción era revertida en presencia de L-arg. Además, L-NMMA aumentaba el tono de tejidos aórticos e inhibía la relajación dependiente de endotelio inducido por acetilcolina, efecto que el aminoácido anula. También se demostró que el antagonista anulaba la conversión del aminoácido, dependiente de NADPH, en L-citrulina, coproducto en la formación de NO. Esta ruta biosintética se ha comprobado en muchos tejidos y células como macrófagos, neutrófilos, tejido nervioso, glándula adrenal o células de Kupffer, entre otras (Moncada y cols., 1991; Liew, 1995).

La enzima responsable de la síntesis es la *óxido nítrico sintetasa (NOS)* que realiza una oxidación del nitrógeno terminal de L-arg formando equimolecularmente NO y L-citrulina (Figura 1) (Palmer, 1987; Palmer y Moncada, 1989; Kerwin y cols., 1995; Bogle y cols., 1996), que posteriormente, es convertido de nuevo en L-arg mediante la incorporación de un grupo amino (Hecker y cols., 1990; Kiechle y Malinski, 1993).



*Figura 1- Reacción de síntesis del óxido nítrico: substratos, cofactores y productos implicados.*

La enzima requiere para su acción la presencia de dos cosubstratos, NADPH y O<sub>2</sub>, y cinco cofactores, FAD, FMN, calmodulina, hemo y tetrahydrobiopterina (Moncada y cols., 1991; Schmidt y cols., 1994)(Figura 2).

En condiciones aerobias, el NO se oxida espontáneamente formando metabolitos más estables como son nitratos y nitritos.

La tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) juega un papel crucial en la interacción de las subunidades de la enzima y en la formación del centro activo. La síntesis de BH<sub>4</sub> es un proceso restrictivo acoplado a la generación de NO jugando un papel modulador en la expresión de ARNm de NOS y de sus proteínas. De tal modo que la inhibición de la síntesis *in vivo* de BH<sub>4</sub> produce disminución de la expresión NOSi en respuesta a

estímulos de citoquinas, y al contrario, el aumento intracelular del cofactor por tratamiento con donadores como sepiapterina, claramente potencia la inducción de NOSi (Pérez Sala y cols., 1998).

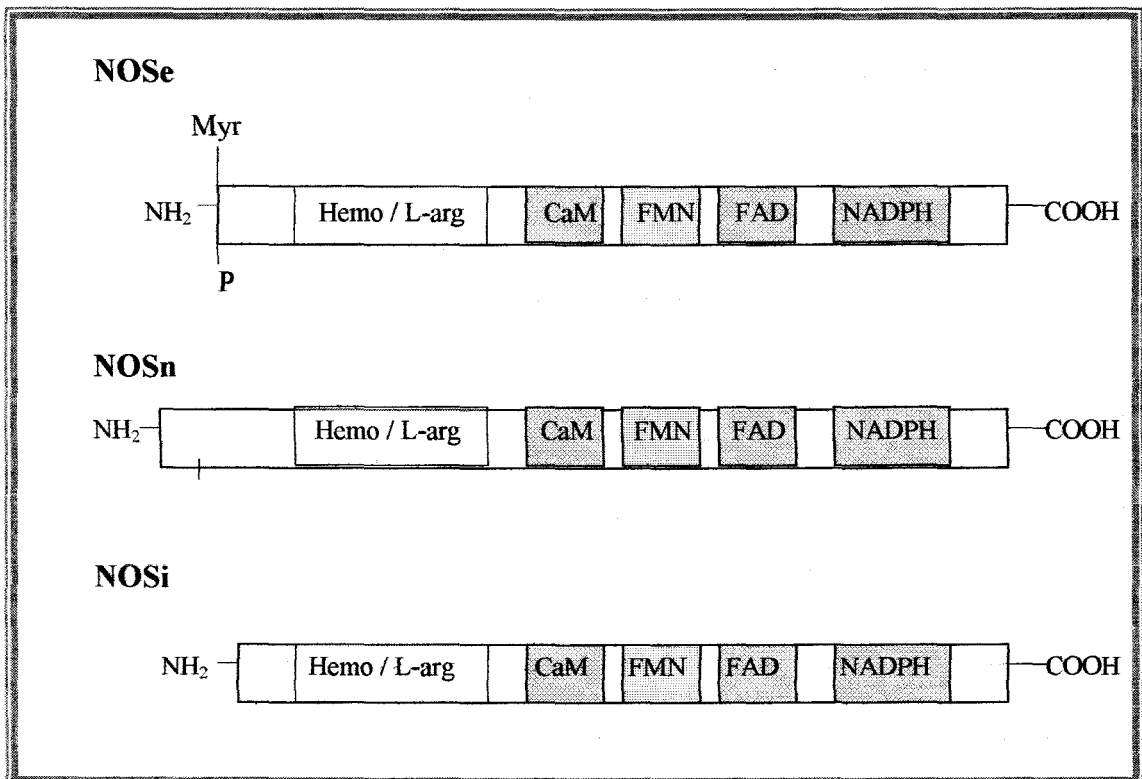


Figura 2- Estructura de los dominios de NOSe, NOSn y NOSi. Todas tienen en común un dominio para NADPH, FAD, y FMN en el carboxilo terminal. Presentan sitios para el complejo CaM y hemo/L-arg en el amino terminal, lugar donde se produce la fosforilación y miristilación. La fosforilación es producida por protein-quinasas dependientes de AMPc y GMPc.

La NOS es una flavoproteína que presenta cierta homología con el citocromo P-450. Se han descrito dos isoformas: *óxido nítrico sintetasa constitutiva (NOSc)* y *óxido nítrico sintetasa inducible (NOSi)*. Ambas pueden ser reguladas por un proceso de

retroalimentación negativa mediada por el propio NO: el generado enzimáticamente o el exógeno inhiben la NOS por un mecanismo donde está involucrada la oxidación hemo-dependiente de L-arg. (Bugá y cols., 1993; Rengasamy y cols., 1993).

La enzima NOS<sub>c</sub>, libera cantidades pequeñas (pmoles) de NO de forma intermitente por períodos cortos (segundos-minutos) (Nathan y cols., 1994). Existen 2 variedades de NOS<sub>c</sub> cuyas características bioquímicas son similares pero de diferente localización (Tabla 1):

*La óxido nítrico sintetasa constitutiva endotelial (NOS<sub>e</sub> o isoforma III)* presente principalmente en células endoteliales, plaquetas y células mesangiales renales, está fundamentalmente involucrada en la regulación de la homeostasia vascular (Lamas y cols., 1992; Marsden y cols., 1992; Nishida y cols., 1992). *La óxido nítrico sintetasa constitutiva neuronal (NOS<sub>n</sub> o isoforma I)* que se encuentra en neuronas tanto del sistema nervioso central como periférico, produciendo NO que actúa como neurotransmisor (Knowels y cols., 1989; Hassall y cols., 1992; Moncada y Higgs, 1995).

Las actividades de las isoformas NOS<sub>e</sub> y NOS<sub>n</sub> están rigurosamente controladas por los niveles de calcio; cuando las células que las contienen reciben el estímulo adecuado (acetilcolina en las células endoteliales o glutamato en las células neuronales) la activación de los receptores localizados en la membrana provoca un aumento de los niveles de calcio en el citosol celular que a su vez desencadena la activación de la enzima y, finalmente, la síntesis de NO. (Hecker y cols., 1993). El aumento del ión calcio intracelular es el resultado de los procesos de intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en la membrana, y del proceso movilizador a partir de los depósitos intracelulares (retículo endoplasmático).

El calcio se une a la proteína calmodulina, y el complejo formado (CaM) regula tanto la actividad de muchas proteínas con función enzimática (proteín-quinasas, adenilicilasa, fosfodiesterasas, NOS y ATPasa-Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>) como otras de naturaleza estructural (Dawson y cols., 1993; Fleming y Busse, 1995). La calmodulina presenta cuatro sitios de fijación para el calcio que provocan cambios conformacionales que le permite unirse a las proteínas.

*La isoforma NOSe* ejerce un papel clave coordinando diversos estímulos extracelulares moduladores de la presión sanguínea y agregación plaquetaria.

Su síntesis es regulada a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-translacional. La región promotora del gen NOSe contiene sitios que son controlados por agentes que responden a cambios relacionados con el estrés o frente a hormonas sexuales (Robinson, 1995). Los niveles de ARNm de NOSe están sujetos a una regulación dinámica por citoquinas (Lamas y cols., 1992). Además, la NOSe es modificada a nivel post-translacional por miristilación en su N-terminal (Busconi y Michel, 1993), siendo ésta reacción necesaria para que la enzima interactúe con la membrana endotelial de la célula. En primer lugar, es estabilizada por interacciones hidrofóbicas entre la enzima - ácido mirístico - membrana fosfolipídica. En respuesta a agonistas (como bradiquinina) la NOSe se transloca desde la membrana al citosol acompañada de un aumento en la fosforilación de la enzima.

*La isoforma presente en neuronas (NOSn)* ejerce un papel importante como neurotransmisor en el desarrollo y regeneración neuronal, así como en numerosos desórdenes neurológicos con excesiva producción de NO. No obstante, la expresión de NOSn no se limita sólo a células neuronales, pues se han encontrado transcritos en células no neuronales, y es regulada dinámicamente por diferentes condiciones fisiológicas o patológicas, estímulos físicos-químicos, biológicos, eléctricos, etc. Su aumento está asociado también a la co-inducción de factores transcripcionales semejantes a c-jun (Herdegen y cols., 1993; Wu y cols., 1994) y c-fos (Torres y cols., 1994; Hatakeyama y cols., 1996). En el cerebelo, la inhibición drástica de la

neurotransmisión glutaminérgica aumenta su expresión (Baader y cols., 1996), estando la enzima frecuentemente localizada junto a receptores NMDA (Bhat y cols., 1995, Aoki y cols., 1997). Además, puede también ser blanco de las hormonas: el estradiol podría inducir su formación (Ceccatelli y cols., 1996; Xu y cols., 1996), la corticosterona parece disminuir la transcripción (Torres y cols., 1994; Hatakeyama y cols., 1996). El litio y la tacrina, aumentan la expresión sinérgicamente en el hipocampo.

*La isoforma inducible (NOS<sub>i</sub> o isoforma II)* es una enzima calcio-independiente (Figura 3). Se localiza en macrófagos, hepatocitos, músculo liso vascular, neutrófilos, células endoteliales (Tabla 1) y es capaz de generar NO de forma continua (horas-días) en cantidades masivas (nmoles), si bien necesita un cierto período de tiempo para expresarse (horas) (Anggard 1994; Nathan y cols., 1994). Se transcribe en respuesta a estímulos inmunológicos como citocinas (interferón  $\alpha$  o interleucinas) o determinadas endotoxinas (lipopolisacáridos) (Nussler y Billiar, 1993; Liew, 1995). Del mismo modo que la enzima NOS<sub>c</sub>, su actividad también es inhibida retroactivamente por el propio NO.

Su regulación es llevada a cabo por factores transcripcionales pertenecientes a la familia "rel", entre los que se incluye *el factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B)*, determinante en la activación del gen en respuesta a citoquinas. Algunos agentes antioxidantes o fármacos (AINE) parece ser que también inhiben la activación de dicho factor (Ignarro y cols., 1995).

Este importante regulador fue inicialmente descrito como factor de transcripción capaz de unirse al gen de la cadena ligera  $\kappa$  de los linfocitos B. Más tarde, se han encontrado zonas de unión en otros genes como inmunoreceptores (IL-2 $\alpha$ , TCR $\beta$ , MHC-I) o citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, TNF $\alpha$ ).



Tabla 1- Aspectos diferenciales de la NOS

	<b>NOSce</b>	<b>NOScn</b>	<b>NOSi</b>
<i>Localización</i>	Citosólica/membrana	Citosólica	Citosólica
<i>Expresión en tejidos</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Células del endotelio vascular y plaquetas</li> <li>➤ Células mesangiales renales</li> <li>➤ Osteoblastos</li> <li>➤ Osteoclastos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ SNC (cerebelo, hipocampo, lóbulos olfatorios)</li> <li>➤ SNP (nervios NANC),</li> <li>➤ Músculo esquelético humano</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Macrófagos</li> <li>➤ Neutrófilos</li> <li>➤ Fibroblastos</li> <li>➤ Músculo liso vascular</li> <li>➤ Cél endoteliales y hepatocito.</li> </ul>
<i>Estímulos</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Mecánicos (flujo pulsátil, estrés por tracción)</li> <li>➤ Vasodilatadores (acetilcolina, adenosina, sustancia P, bradicinina)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Incremento en la concentración intraneuronal de calcio citoplasmático</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Mediadores de la inflamación: IL-1, TNF<math>\alpha</math>, LTB<math>_4</math>, LPS, etc.</li> </ul>
<i>Función del NO</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Regulación del tono vascular y de la función plaquetaria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Neurotransmisor central y periférico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Mediador de la respuesta inmunitaria inespecífica y endotoxémicas</li> </ul>
<i>Moléculas diana</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hemoproteínas, GCs, tioles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hemoproteínas, GCs, tioles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Tioles, Fe-S proteínas.</li> </ul>

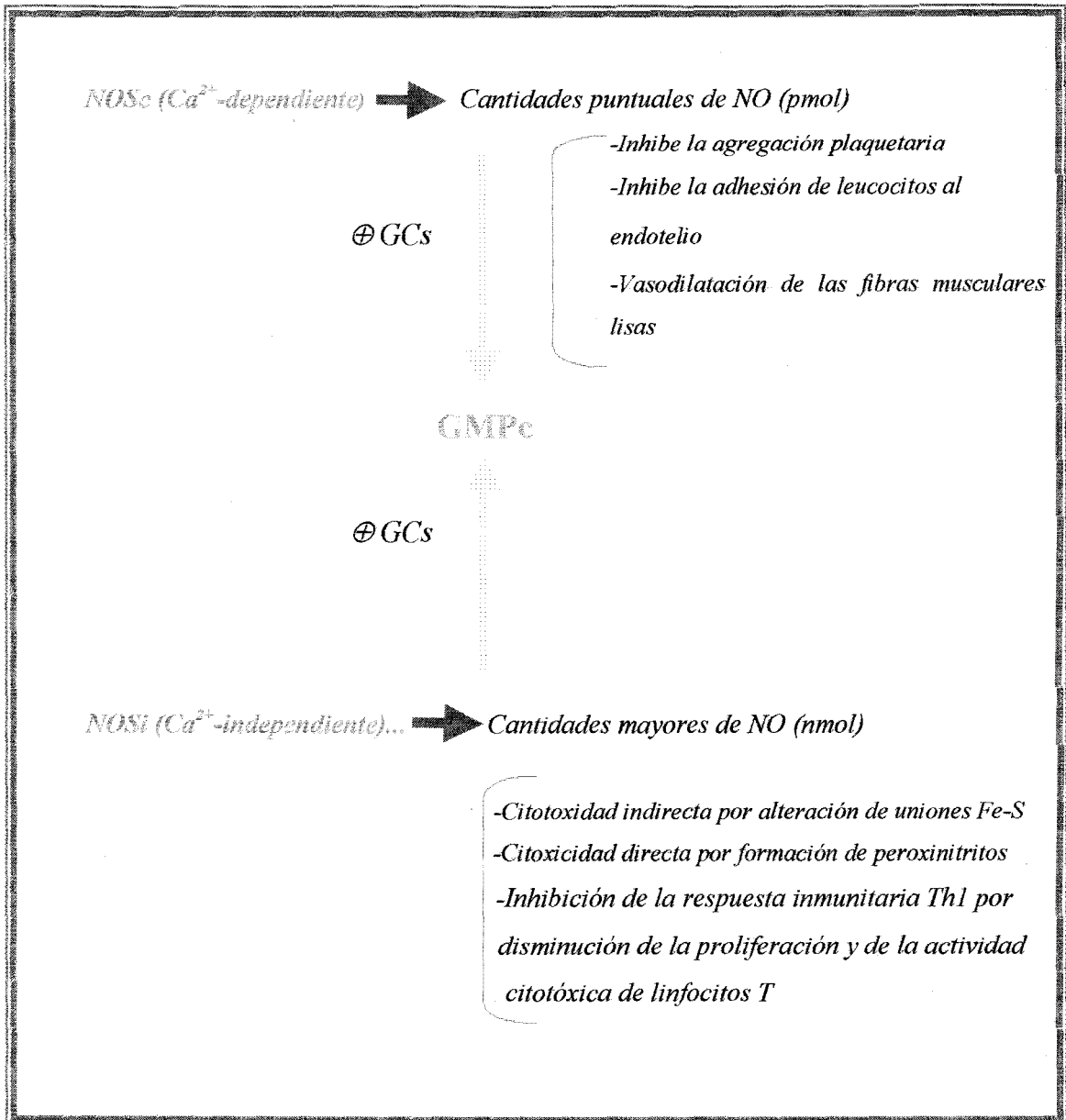
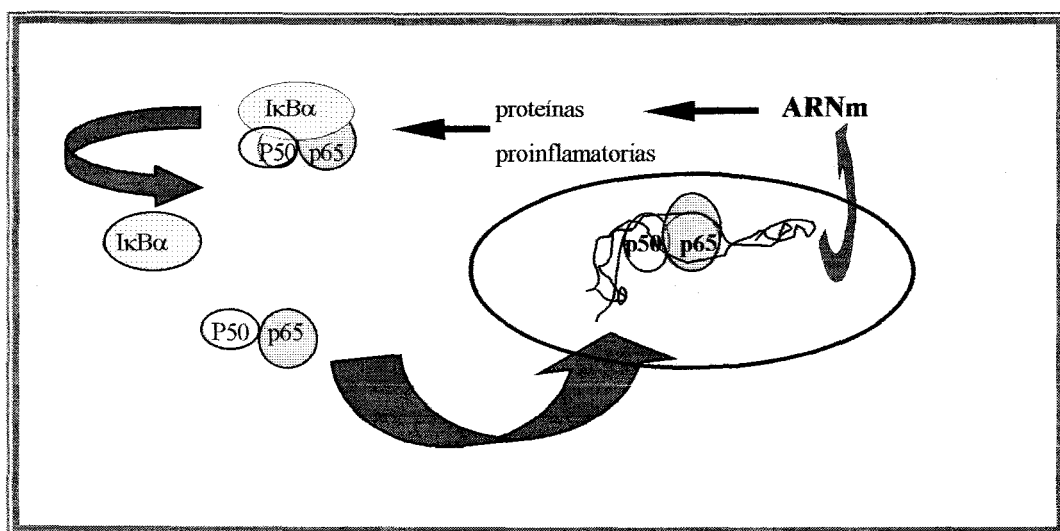


Figura 3- Acciones relacionadas con la actividad NOS.

La actividad NF- $\kappa$ B está regulada por muchos factores. El mecanismo más importante implica su inactivación cuando se localiza en el citoplasma celular, siendo activo dentro del núcleo. La retención de ésta molécula en el citoplasma es debida a la formación de un complejo con las proteínas inhibitoras I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3, p100, p105) (Whiteside y cols., 1997).

De hecho, es I $\kappa$ B $\alpha$  quién actúa como finalizador de la transcripción ya que se introduce en el núcleo y desplaza a los complejos NF- $\kappa$ B de los motivos  $\kappa$ B (Figura 4) (Miyamoto y Verma, 1995).



**Figura 4- Modelo de activación del NF $\kappa$ B: el complejo inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  actúa como finalizador de la transcripción, pues se introduce en el núcleo y desplaza a los complejos NF $\kappa$ B de los motivos  $\kappa$ B.**

El NF- $\kappa$ B como factor transcripcional regulador de la expresión de muchos genes involucrados en el proceso de inflamación, ha reclamado la atención de muchos investigadores. Se ha observado su actividad en células epiteliales de las criptas intestinales, en macrófagos (Neurath y cols., 1996) o en células epiteliales cercanas a pequeños vasos de la mucosa inflamada. Es más, existe una correlación entre el número de células que presentan NF- $\kappa$ B activado y el grado de inflamación (Rogler y cols., 1997).

Entre las señales extracelulares, se incluyen la formación de RLO, con una rápida activación de NF- $\kappa$ B y por tanto de ARNm NOSi. Los RLO son desencadenantes de la fosforilación y reacciones proteolíticas, causando disociación de NF- $\kappa$ B e inhibición del complejo I $\kappa$ B en el citoplasma; el factor libre translocado en el núcleo estimula al promotor del gen NOSi, activando así la transcripción.

Ha sido estudiada la influencia de antioxidantes e inhibidores de proteasas en la formación de NO y expresión de NOSi con la activación por LPS de los macrófagos. Se ha demostrado que el NO es un agente proinflamatorio y que la inhibición de la isoforma presenta propiedades antiinflamatorias. La expresión transcripcional de NOSi involucra vías que también afectan la expresión inducible de genes que codifican proteínas encargadas de la defensa inmune e inflamación.

Se ha valorado la posibilidad de que los AINE interfieran en la producción de NO a través de NOSi en macrófagos (Aeberhard y cols., 1995). En efecto, la aspirina, salicilato sódico, ibuprofeno, indometacina, diclofenaco y naproxeno inhiben la formación de nitratos producidos por la estimulación de LPS en éstas células. Al parecer, no alteran directamente la actividad catalizada por la NOSi, sin embargo, sí disminuyen la capacidad de síntesis de dicha enzima en células intactas. De hecho, los análisis de expresión revelan que los AINE interfieren en la transcripción previniendo de ésta forma la síntesis de proteínas NOSi (Aeberhard y cols., 1995).

En ratas los ensayos muestran que la inducción con LPS produce acumulación de nitratos (hasta 10 veces) aumentada en sangre, y también su prevención por la administración i.p. de AINE, 1 h antes al LPS (Franco y cols., 1998; Ukawa y cols., 1998; Konturek y cols., 1998). Todos los estudios sugieren que la activación de NF- $\kappa$ B representa un papel importante en el mecanismo transcripcional para la activación de NOSi.

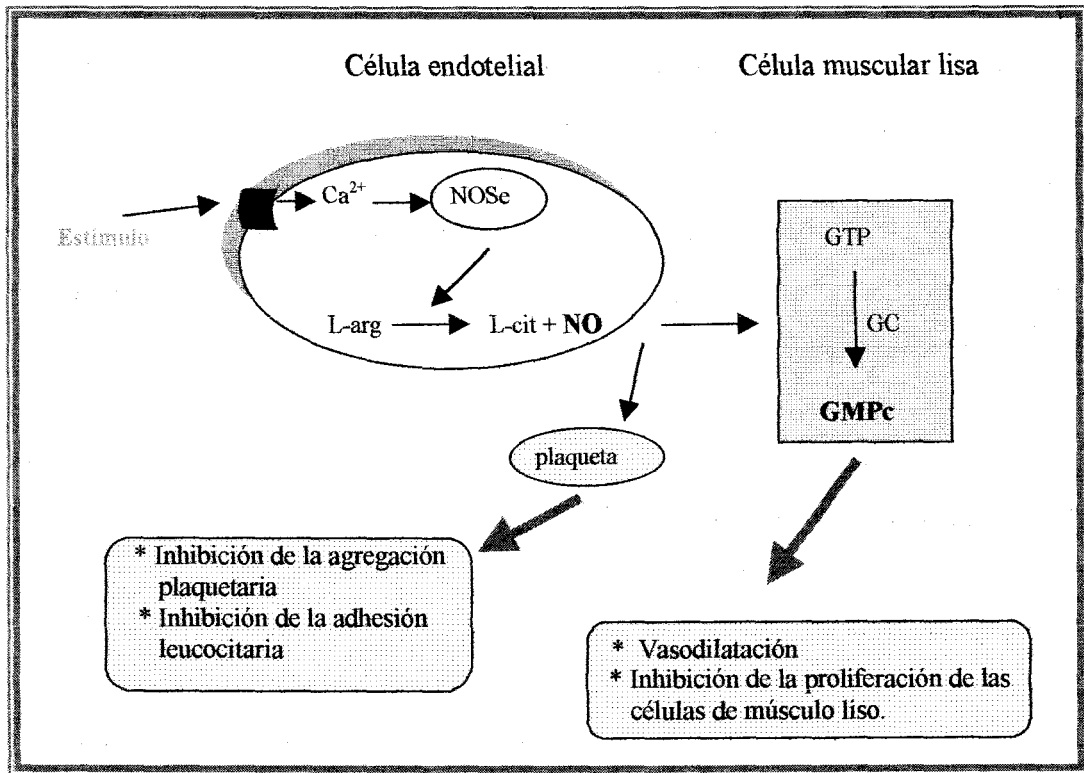
### **II.3- FUNCIONES DEL ÓXIDO NÍTRICO.**

Como hemos señalado anteriormente, el NO presenta un comportamiento dual, a dosis bajas regula funciones homeostáticas y a dosis muy altas se comporta como citotóxico produciendo lesiones tisulares capaces de promover una defensa inmunitaria. La actividad del NO depende de su lugar de síntesis y de la proteína implicada en su formación.

#### **II.3.1- ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA CONSTITUTIVA ENDOTELIAL**

El NO generado en las células endoteliales por NOSe se comporta como un mediador en la transmisión de estímulos célula-célula teniendo un papel clave en la regulación del flujo sanguíneo y en el mantenimiento del tono vascular (Tabla 1). No obstante, se ha observado que el incremento en los niveles intracelulares de GMPc tiene variadas consecuencias: relajación de la musculatura lisa de la pared vascular, vasodilatación, inhibición de la proliferación de las células del músculo liso, de la agregación plaquetaria, de la adhesión de leucocitos al endotelio vascular y modulación de la actividad de los mastocitos (Figura 5) (Kubes y cols., 1991).

La enzima GC es un receptor de membrana con actividad enzimática propia. En la porción extracelular del receptor existe un dominio al cual se fija el ligando y cuya presencia provoca la modificación adecuada para que la porción intracelular, activa enzimáticamente, actúe sobre sustratos específicos.



**Figura 5- Mecanismo de acción del NO sintetizado por las células del endotelio vascular tras la activación de la isoforma endotelial de la enzima NOSe (modificado de Farrell y cols., 1995).**

El GMPc es un segundo mensajero que abunda en muchas células del organismo: células endoteliales y epiteliales (vasos, bronquios, pared intestinal), conos, bastones, células cerebelosas y células que fijan al péptido natriurético. Este mensajero se comporta como señal intracelular capaz de actuar sobre quinasas, fosfodiesterasas, canales iónicos entre otras.

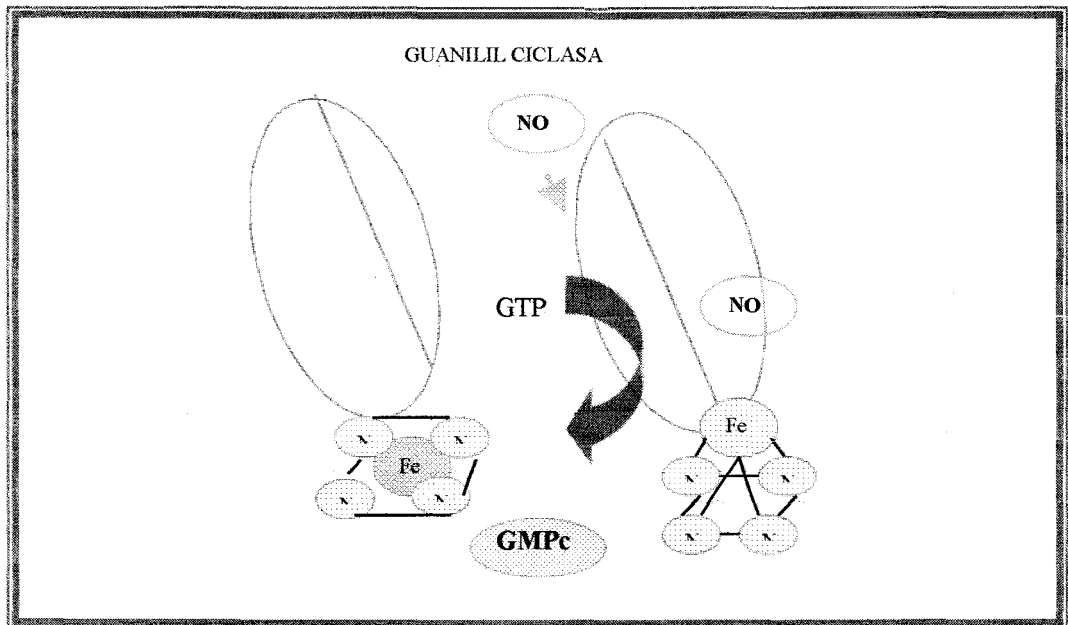
Se diferencian dos tipos de GC:

*Una situada en la membrana plasmática que se caracteriza por conformar una proteína monomérica con una única porción transmembrana. En su parte externa N-terminal se encuentra el dominio que actúa como receptor, capaz de identificar y fijar a diferentes sustratos. En su porción intracelular se encuentra el dominio con actividad proteín-tirosín-quinasa y en la parte más próxima a la porción C-terminal se encuentra el dominio con actividad GC.*

*Otra forma está situada en la fracción soluble celular; adopta una conformación dimerica con 2 subunidades, una  $\alpha$  (82kD) y otra  $\beta$  (70kD). Cada una de ellas presenta un dominio en situación C-terminal con actividad GC siendo necesaria la acción conjunta de ambas para que ésta se exprese plenamente. Una característica de ésta enzima, es que es activada por NO y otros nitratos. El NO es capaz de estimularla tras su fijación previa a un grupo hemo situado en el centro activo de la enzima (Figura 6). Dentro del grupo hemo, el NO se une al ión  $Fe^{2+}$  provocando un cambio tridimensional en la disposición espacial y tras su activación, aumenta la producción de GMPc (Moncada y cols., 1991).*

Frecuentemente, las células que contienen la enzima NOS no son las mismas que las que producen GMPc; ello significa la capacidad de difusión del NO desde la célula productora a la célula efectora.





*Figura 6- El receptor del NO es el hierro en la enzima GC, que sintetiza el segundo mensajero, GMPc. La unión de NO provoca un cambio conformacional del grupo hemo que contiene el hierro, lo que aumenta la producción de GMPc a partir del GTP.*

### II.3.2- ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA CONSTITUTIVA NEURONAL

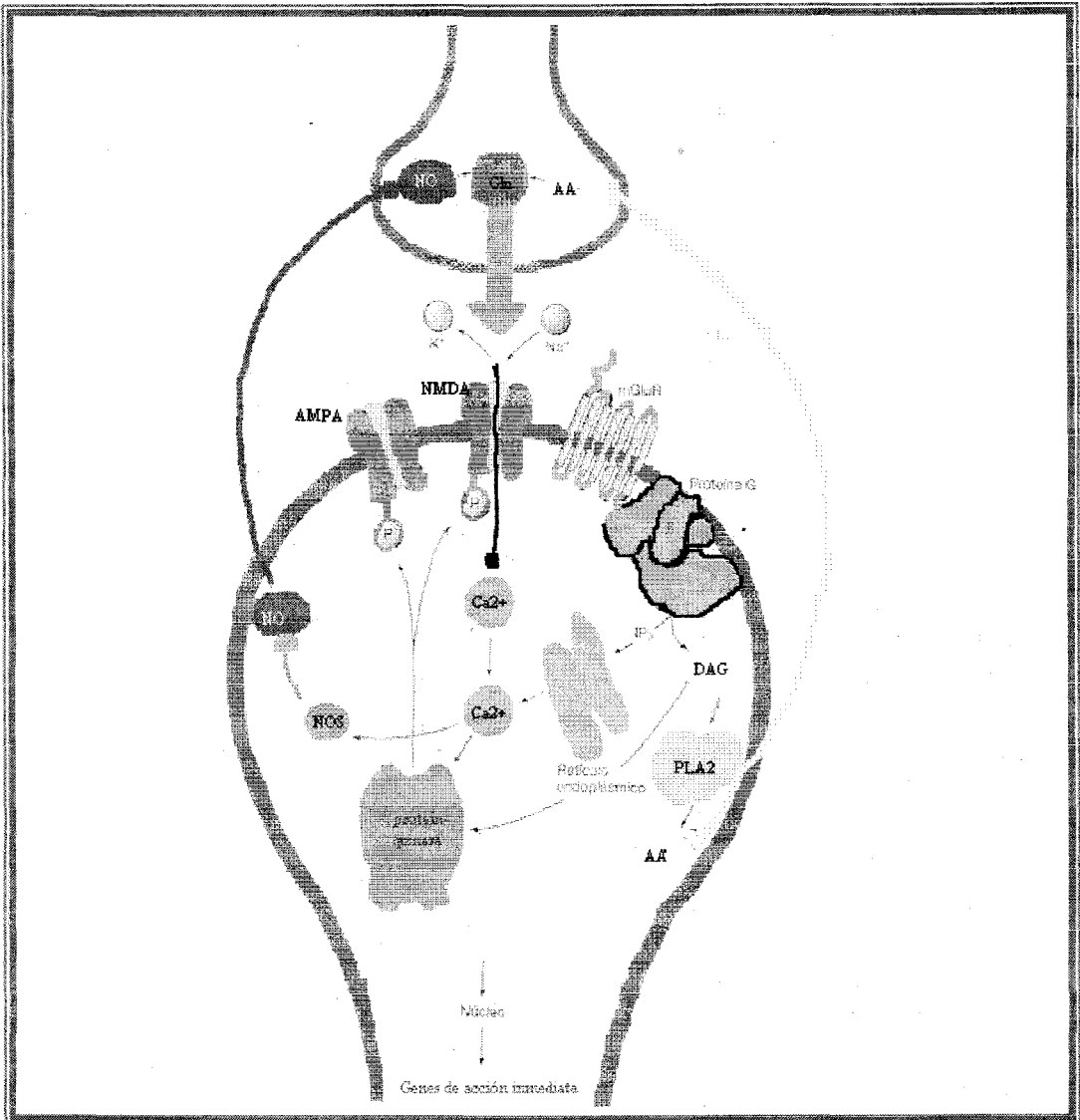
El NO formado en el tejido nervioso por la isoforma NOS<sub>cn</sub>, actúa como neurotransmisor en el SNC y periférico (fibras no adrenérgicas no colinérgicas, NANC), presentando un papel importante en el control de la relajación de la musculatura lisa a lo largo del tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario.

El cerebro contiene la mayor actividad NOS del organismo y la amplia distribución de la enzima (Tabla 1) indica que el NO puede estar implicado en muchas funciones del SNC: plasticidad sináptica, establecimiento y refinamiento de

proyecciones axonales durante las etapas tardías del desarrollo, memoria, control nervioso del flujo sanguíneo cerebral, regulación neuroendocrina, autorregulación de la actividad neuronal y producción de otros neurotransmisores.

El NO producido actúa como neurotransmisor difundiendo retrógradamente desde la neurona postsináptica y, tras unirse al grupo hemo de la GCs localizada en la neurona presináptica, activaría la producción de GMPc y otras sustancias fosforiladas capaces de aumentar y mantener la liberación de neurotransmisores presinápticos (Figura 7).

El glutamato (Glu) se comporta como neurotransmisor excitador en el SNC ya que provoca respuestas estimuladoras tras la activación de la proteína receptora correspondiente. Uno de estos receptores de tipo inotropo, es el NMDA asociado a un canal que permite el flujo de iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que se van a estimular diferentes respuestas amplificadoras a través de segundos y terceros mensajeros, como activación del complejo calcio-calmodulina-quinasa II, PKC, PLA<sub>2</sub>, activación de la NOS o síntesis de eicosanoides.



*Figura 7-Mecanismos moleculares relacionados con la estimulación de los receptores glutámicos (AMPA, NMDA y metalotropos). El aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico induce movilización de quinasas que a su vez activan segundos mensajeros tales como DAG, PLA<sub>2</sub> favoreciendo la síntesis de eicosanoides y de NO.*

### II.3.3- ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA INDUCIBLE

El NO formado por la activación de la isoforma NOSi juega un papel clave en los procesos de inflamación, reparación de tejidos y mecanismos inespecíficos de defensa del huésped ante la agresión de agentes infecciosos (Liew, 1995; Lyons, 1995).

Así por ejemplo, el NO formado en los macrófagos por ésta isoenzima contribuye a que éstas células sean capaces de destruir a microorganismos intra y extracelulares. Esta acción antibacteriana se debe a la interacción del mediador con un átomo de  $Fe^{2+}$  no hemínico conjugado a un átomo de azufre y con la consiguiente inhibición de enzimas pertenecientes al metabolismo glucídico (aldolasa), ciclo de Krebs (aconitasa), cadena respiratoria transportadora de electrones (citocromo oxidasa) y de la síntesis de ADN (ribonucleótido reductasa) (Figura 8) (Kwon y cols., 1991; García-González y cols., 1998).

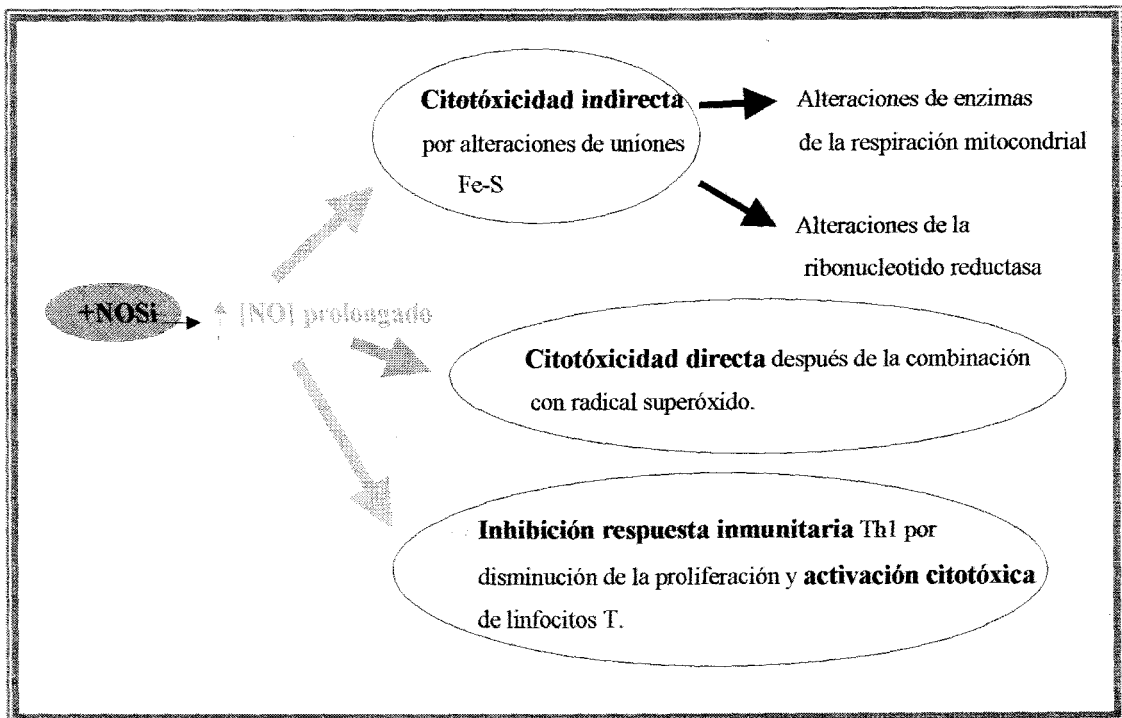
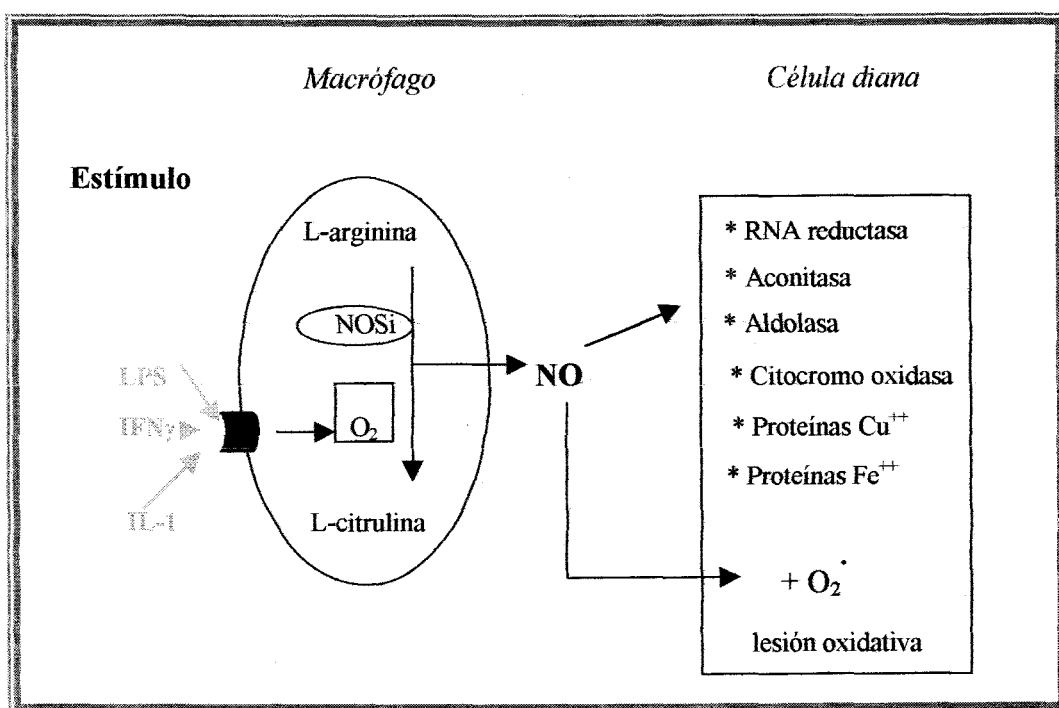


Figura 8-Consecuencias del aumento en los niveles de NO mediado por NOSi

Otro mecanismo que explica la actividad citotóxica del NO es su capacidad de interactuar con especies oxigenadas reactivas ( $O_2^{\cdot}$ ), formando peroxinitritos ( $ONOO^{\cdot}$ ) altamente tóxicos (Figura 9) (Yamada y Grisham, 1994; Welch y Loscalzo, 1994; Beckmam y Koppenol, 1996).



**Figura 9- Vía de activación de la isoforma NOSi y mecanismo de acción del NO sintetizado. El NO puede interactuar con el ión superóxido ( $O_2^{\cdot}$ ) o con otros sistemas antibacterianos y dar lugar a la formación de peroxinitritos.**

El NO posee once electrones de valencia, siete situados en el orbital más externo. Contiene por tanto un electrón no apareado lo que hace que sea una molécula con capacidad muy reactiva, es decir, un radical libre (Figura 10) (Mitjavila y Carbonell, 1997).

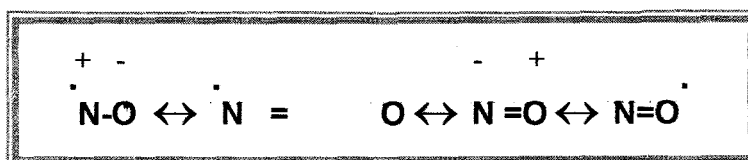


Figura 10- El óxido nítrico es un híbrido de resonancia.

Los  $\text{O}_2\cdot$  son producidos por neutrófilos y macrófagos en los procesos inflamatorios. Cuando alcanzan en las células cantidades similares al NO, reaccionan de manera muy rápida, produciendo anión  $\text{ONNO}\cdot$  (Szabó y cols., 1996; Beckman, 1996) que va a oxidar a todas las moléculas con las que contacte, entre ellas, los lípidos de la membrana celular, peroxidándolas y haciendo que pierdan su integridad. También pueden atacar al material genético, ADN, causando mutaciones en las cadenas (Wiseman y cols., 1996).

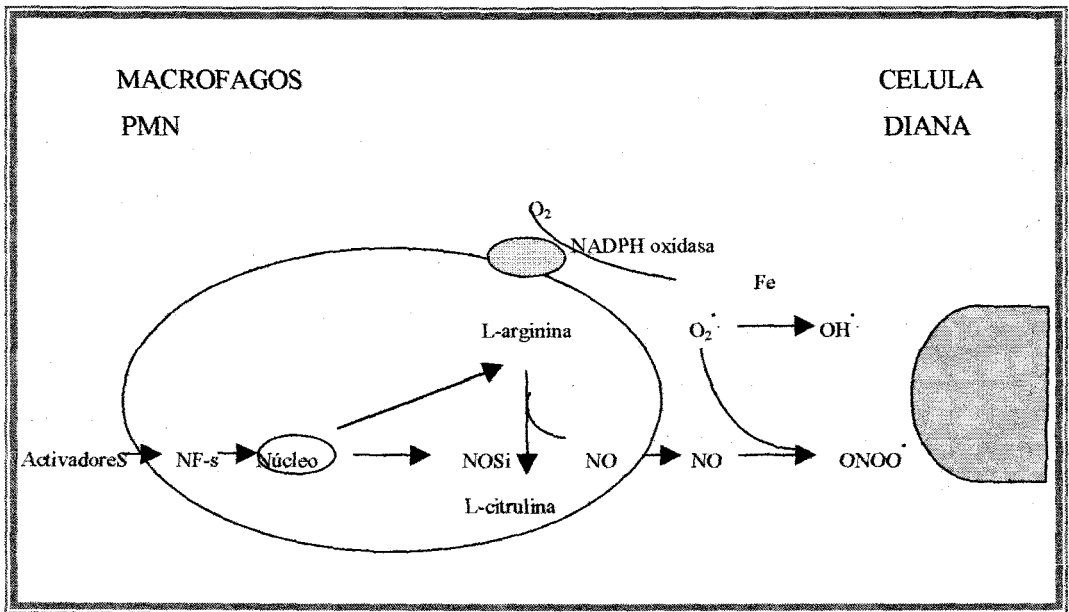
De estas reacciones, se deduciría que el NO tendría un papel principalmente citotóxico y proinflamatorio. Sin embargo, otros estudios, revelan su papel protector celular.

Además de las consecuencias que tiene la liberación continuada por las células del endotelio vascular evitando la adhesión de los neutrófilos a las paredes vasculares e interviniendo en el mantenimiento de la integridad celular, su eficacia como pro o antiinflamatorio está relacionada con la presencia de concentraciones relativas de otras moléculas oxidantes.

De éste modo, y según se refleja en la Figura 11:

\* Concentraciones semejantes de NO y  $O_2^-$  → **peroxinitritos**  
↓  
procesos oxidantes

\* Exceso de NO → limita la formación de superóxido y por tanto la lesión tisular.

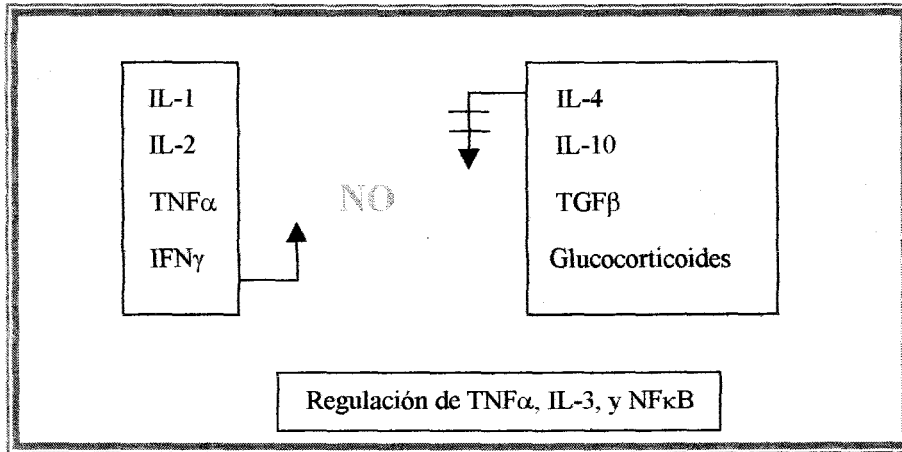


*Figura 11-Formación de NO y anión superóxido ( $O_2^-$ ) en leucocitos activados; cuando ambas moléculas reaccionan, forman peroxinitritos ( $ONOO^\cdot$ ) que puede atacar a otras células o al propio leucocito.*

El NO también es un importante mediador de la respuesta inmune actuando en procesos de inmunorregulación. Altos niveles han sido implicados en la activación y proliferación de los linfocitos, estimulación en la producción de TNF- $\alpha$  y de NF- $\kappa$ B y también se ha visto que afecta a la tirosin quinasa p56 implicada en determinadas señales linfocitarias (Billiar, 1995; Farrell y cols., 1996). Bajos niveles de NO suprimen la actividad de las células presentadoras de antígenos y proliferación de las células T (Mills, 1991; Merryman y cols., 1993). De hecho existen evidencias de que NO ejerce diferentes efectos en las subpoblaciones de las células T, inhibe por ejemplo, la secreción de IL-2 por las células Th1 e incrementa la secreción de IL-4 por las células Th2 (Figura 12) (Chang y cols., 1997).

El efecto citotóxico, relacionado con una inmunidad no específica, y depende de la concentración local de NO; cantidades bajas (pM) producidas vía NOS<sub>c</sub> son suficientes para determinadas señales intracelulares y producir efectos fisiológicos. Altas concentraciones ( $\mu$ M), producidas por NOS<sub>i</sub>, son lesivas para los tejidos (Farrell, 1996; Nathan, 1997). Así, ha sido relacionado con la etiopatogénesis de una serie de enfermedades inmunes: diabetes (Holstad y cols., 1997), artritis reumatoide (Cochran y cols., 1996), lupus eritomatoso (Belmont y cols., 1997) o esclerosis múltiple (Parkinson y cols., 1997).





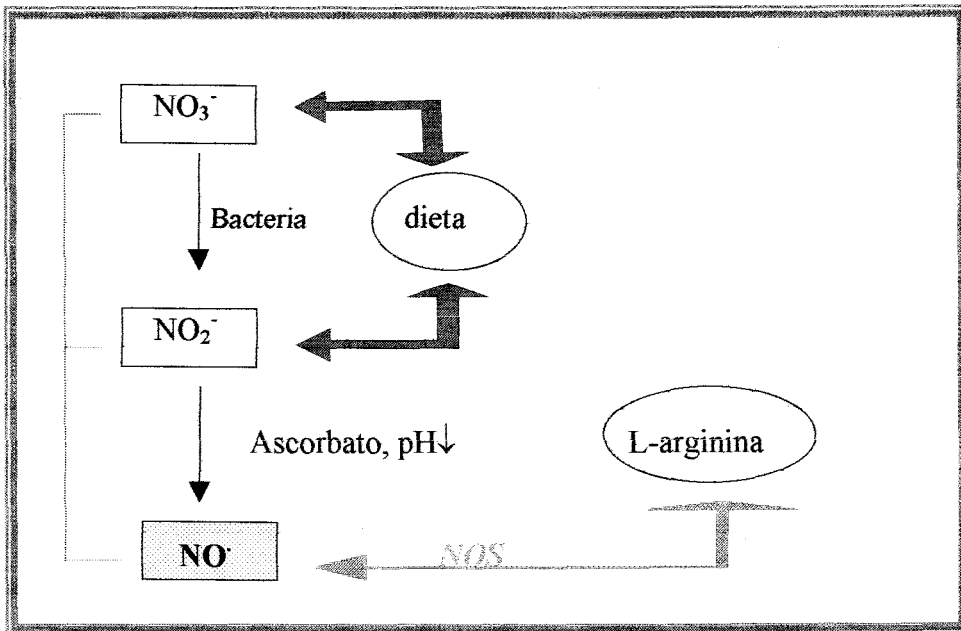
**Figura 12- Activación e inhibición de la producción de NO por macrófagos y neutrófilos activados.**

La apoptosis es otro mecanismo importante relacionado con este gas. El NO promueve este proceso en macrófagos, timocitos CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, condriocitos y células pancreáticas B (Albina y cols., 1997; Clancy y cols., 1997). Requiere la activación de la polimerasa poly (ADP-ribosa) y la formación de nitrotirosina, siendo éste un proceso antagonizado por Bcl-2 (Melkova y cols., 1997), proteína localizada en las mitocondrias y capaz de bloquear la liberación de factores pro-apoptóticos como el citocromo C inhibiendo así, la apoptosis.

El NO es una molécula pleitrópica, es decir, dependiendo de su concentración local va a proteger a las células de apoptosis ó bién va a inducirla; bajas concentraciones protegen a los linfocitos B frente a infecciones virales, mientras que las altas, inducen apoptosis en macrófagos, hepatocitos, células gliales, neuronas, y otras células del sistema inmune.

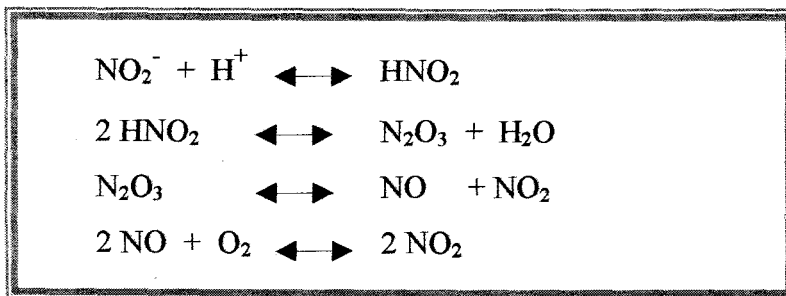
### II.3.4- ÓXIDO NÍTRICO SINTETIZADO VÍA NO ENZIMÁTICA

Dado el importante papel fisiológico del NO, se han realizado numerosos estudios sobre la posibilidad de que compuestos nitrogenados ingeridos en la dieta pudieran ser sus precursores, descubriéndose una nueva vía de síntesis: **producción no enzimática de NO** como resultado de la reducción de nitritos (Figura 13). Se ha comprobado que el NO conserva sus propiedades independientemente de su origen: enzimático o químico.



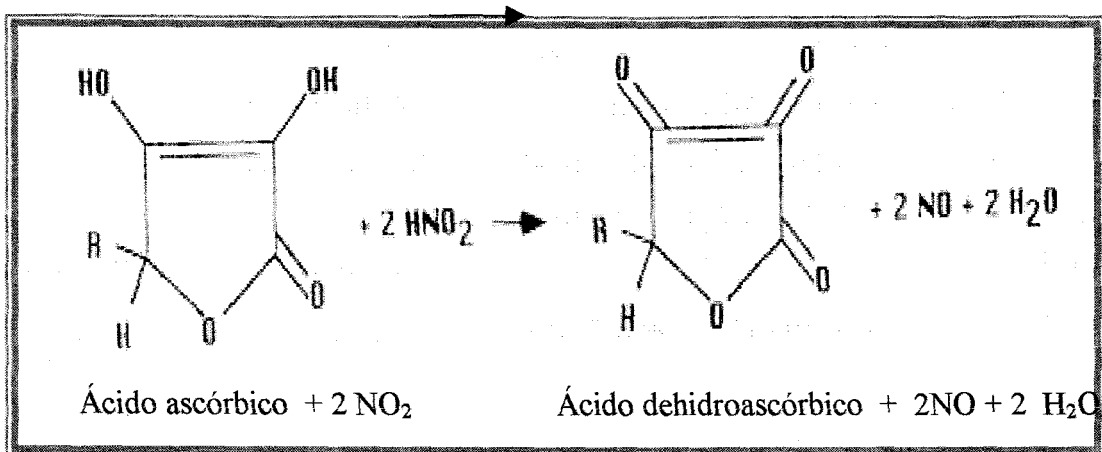
**Figura 13- Vías de reducción de los nitratos a NO in vivo.** Las bacterias presentes en la cavidad bucal o en los riñones, van a reducir los nitratos a nitritos con la intervención de la enzima nitrato reductasa. La reducción a NO ocurre mediante una reducción en condiciones ácidas, como es el caso del estómago.

El NO y otros compuestos nitrogenados son generados a partir de nitritos en una reacción de reducción ácida (Figura 14). A pH ácido (pKa 3.2-3.4), el ión nitrito es convertido en ácido nitroso y compuestos nitrogenados, incluyendo NO:



*Figura 14- Ruta biosintética de NO a partir de compuestos nitrogenados de la dieta.*

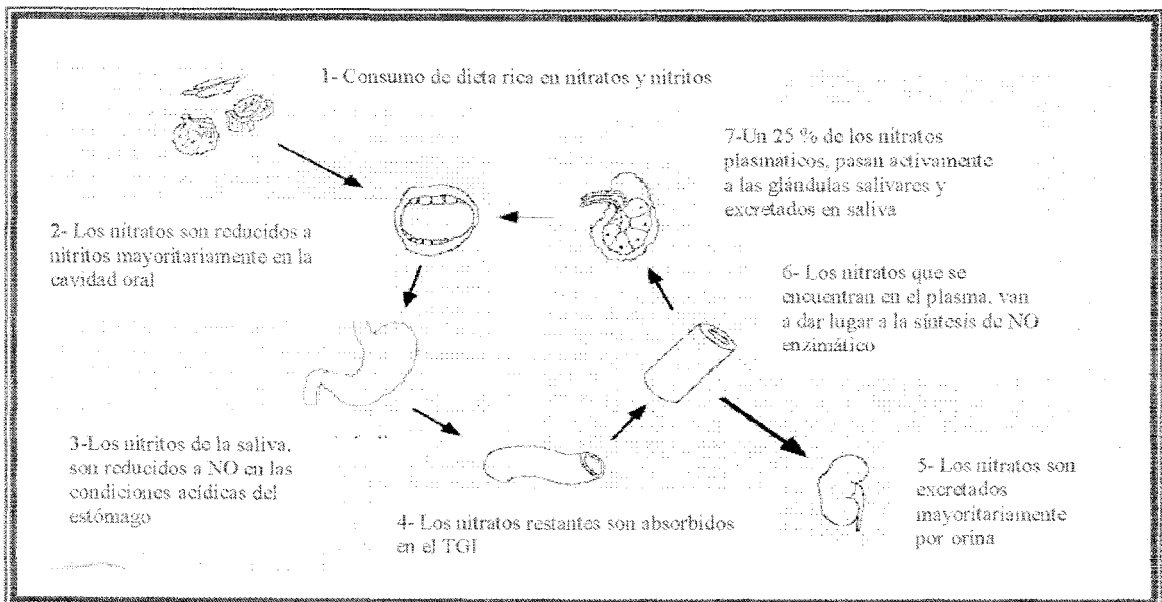
Entre los agentes reductores, se encuentran el ascorbato y el ácido ascórbico, quienes en un rango de pH ácido y solución acuosa, reducen rápidamente al ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>) produciendo ácido dehidroascórbico (Figura 15)(Bartsch y cols., 1988):



*Figura 15- Producción de ácido dehidroascórbico en presencia de NO y vitamina C.*

La presencia de nitratos y nitritos en el organismo, con producción de NO, se da en diferentes lugares:

\* **Tracto digestivo:** la saliva contiene grandes cantidades de sales nitrogenadas (Tannenbaum y cols., 1976). Los derivados de la dieta, provienen principalmente de legumbres y verduras. Más del 25% de los nitratos circulantes, son incorporados activamente por las glándulas salivares y secretados en la saliva (Spiegelhalder y cols., 1976). La flora bacteriana de la cavidad oral reduce parte de éstos nitratos a nitritos (Bartsch y cols., 1988) y es en el estómago donde se sintetiza NO después de la reducción de los nitritos salivares (Lundberg y cols., 1994). La producción intragástrica es dependiente del medio (ácidez y reductores), de forma que cuando la producción ácida es inhibida por diferentes agentes (omeprazol) la síntesis de NO también lo es (Figura 16) (Lundberg y cols., 1994)

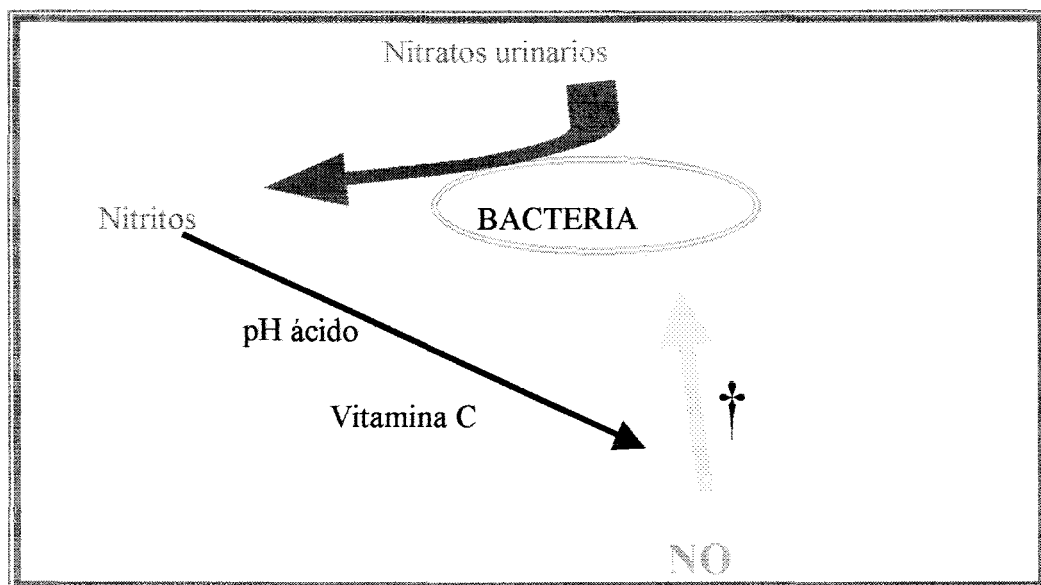


**Figura 16- Producción de NO no enzimática. Los nitratos consumidos en la dieta son reducidos en la cavidad bucal a nitritos y éstos a NO, junto a otros ácidos nitrosos en el estómago.**

La acumulación de nitratos en la saliva, podría prevenir el reciclaje del NO producido no enzimáticamente o bien sintetizado a partir de L-arginina.

El déficit de nitratos y nitritos en la dieta puede dar lugar a efectos no deseados (Tannenbaum y cols., 1974; Bartsch y cols., 1988). En el estómago, los óxidos nitrogenados formados a partir de los nitritos, pueden reaccionar con aminas y dar lugar a nitrosaminas que son tóxicas.

\* **Orina:** los nitratos, ya sea a través de la ingesta de vegetales o los producidos por la síntesis enzimática o no de NO, son eliminados principalmente por ésta vía (Green y cols., 1981), al contrario de lo que le sucede a los nitritos, que aparecen en mínimas cantidades. Sin embargo, son frecuentes las patologías bacterianas del tracto urinario, en las que estos microorganismos favorecen el paso de nitratos a nitritos por reducción enzimática, vía nitrato reductasa en forma similar a lo que ocurre en la cavidad bucal (James y cols., 1978). Este hecho es aprovechado en clínica para el diagnóstico de infecciones urinarias. La acidificación de la orina e ingesta de vitamina C, son tratamientos profilácticos contra estas infecciones. En estas condiciones se libera cierta cantidad de NO no enzimático, sugiriendo estos resultados, que la presencia de NO, en medio urinario acidificado, puede tener efectos bactericidas (Figura 17). La formación de NO formado en orina acídica, es otro ejemplo de síntesis no enzimática.



*Figura 17- Vías de generación y efectos antibacterianos del NO. Las bacterias presentes en una infección urinaria, reducen los nitratos a nitritos. Las condiciones de reducción acídicas hacen que los nitritos formen NO y otros reactivos nitrogenados intermedios, que presentan efectos antibacterianos.*

\* **A nivel renal:** recientes estudios han demostrado que la concentración de NO, aumenta tras la administración tópica de nitritos o por la acidificación del medio, y éste incremento no es anulado por inhibidores de NOS sugiriendo el origen no enzimático del NO formado (Weller y cols., 1996). De otro lado, se ha observado que en pacientes tratados con antibióticos durante un largo período, está inhibida la formación de NO en el riñón (Benjamin y cols., 1997).

## **II.4-PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL.**

### **II.4.1- ACCIONES Y EFECTOS PRODUCIDOS**

#### ***- Esófago***

Es interesante su mención independiente debido al importante papel del NO en sus funciones.

En el esófago, las neuronas NANC son las responsables tanto de la inhibición inicial asociada con el peristaltismo como del control del músculo liso circular esofagal.

El NO induce la relajación del músculo liso por estimulación de la GC y acumulación de GMPc (Navin y cols., 1994). Así, diversos estudios, indican que la combinación de inhibición NOS y bloqueo muscarínico, anulan las contracciones del músculo esofágico, sugiriéndose por tanto, que el peristaltismo está mediado por activación de las neuronas NANC-vía NO.

#### ***- Tracto gastrointestinal***

A partir del descubrimiento del NO y su implicación en múltiples procesos fisiológicos, se puso también de manifiesto su presencia a nivel gastrointestinal (GI). Existen evidencias sobre la distribución de la enzima NOSc en células epiteliales, y en menor proporción, en células parietales además de su localización en las neuronas nitrérgicas de la pared gástrica (Brown y cols., 1992).

La participación del NO como mediador endógeno en los procesos fisiológicos GI tiene lugar a través de diferentes mecanismos (Tabla 2):

***Procesos fisiológicos relacionados con el NO***

- 1- Control de la musculatura fúndica
- 2- Mantenimiento del FSM
- 3- Regeneración tisular de la mucosa
- 4- Estimulación de la producción de moco
- 5- Disminución de la actividad secretora y alcalina
- 6- Inhibición de la infiltración leucocitaria

***Tabla 2- Procesos fisiológicos gástricos en los que participa el NO (modificado de Esteban Carretero 1996)***

- *Neurotransmisor de las fibras NANC* que inervan al TGI, modulando las secreciones. En condiciones fisiológicas, la liberación basal regula el tono de la musculatura (Whittle, 1994) así como la producción y liberación de moco.

- *Su papel en el mantenimiento del flujo sanguíneo mucosal (FSM)* es clave ya que el aumento de la actividad fisiológica de un órgano o tejido va siempre acompañado de un aumento de aporte sanguíneo, garantizando así el suministro de principios necesarios y retirada de productos de desecho (Piqué y cols., 1989; Whittle y cols., 1992). La inhibición en la síntesis de NO a nivel gástrico reduce el FSM y su incremento por acetilcolina o bradiquinina, es NO-dependiente. Inhibidores de NOS atenuan el incremento del flujo inducido por pentagastrina. Todo esto es indicativo del importante papel modulador en el control homeostático vascular del tracto digestivo. Se ha descrito también la capacidad compensatoria de ésta molécula frente a los efectos



vasoconstrictores de noradrenalina, neuropéptido K o endotelinas, favoreciendo el mantenimiento de una vascularización adecuada.

- Participa también en *la respuesta vasodilatadora* que acompaña a diversas circunstancias fisiopatológicas (estimulación de la secreción o de la retrodifusión de hidrogeniones). Produce efectos *relajantes sobre la musculatura gástrica* (Rand, 1992; Sanders y Eard, 1992) de forma combinada con el VIP modulando los mecanismos de dilatación y peristaltismo (Whittle y cols., 1990; Desai y cols., 1991).

- El NO posee efectos *inhibidores de la secreción gástrica* mediada por GMPc (Brown y cols., 1993), disminuyendo tanto la producción de ácido como de bicarbonato en las células parietales (Takeuchi y cols., 1992) y duodenales (Takeuchi y cols., 1993; Martínez-Cuesta y cols., 1994).

- *Sus efectos gastroprotectores* han sido puestos en evidencia en muchos estudios, indicando su participación en los mecanismos de reparación tisular e integridad de la mucosa. En condiciones fisiológicas, el NO junto con los neuropéptidos liberados por las fibras sensoriales y PG, interviene en el mantenimiento de la integridad mucosal (Whittle y cols., 1990). La acción combinada de estos mediadores es además responsable, de la hiperemia y citoprotección adaptativa que se observa después de la exposición de la mucosa a irritantes (Brzozowski y cols., 1995). La síntesis endógena de NO regula la protección gástrica ejercida por fármacos utilizados en el tratamiento de la úlcera péptica (sucralfato, carbenoxolona) (Dembinska y cols., 1991, Konturek y cols., 1992). De igual forma, los tratamientos con inhibidores de la enzima NOS, previenen el incremento en la resistencia de la mucosa inducida por estimulación vagal o tras administración de capsaicina y pentagastrina.

La relación NO/gastroprotección es innegable, pues la disminución de su síntesis produce un retraso en la cicatrización de las lesiones (Esteban Carretero y cols., 1996).

**- Hígado**

El hígado es un órgano donde también la síntesis enzimática de NO es importante, con un efecto también dual. A niveles basales, ejerce una acción beneficiosa; sin embargo, cuando es producido en exceso (existe una inducción por citocinas o LPS), da lugar a un deterioro hepático.

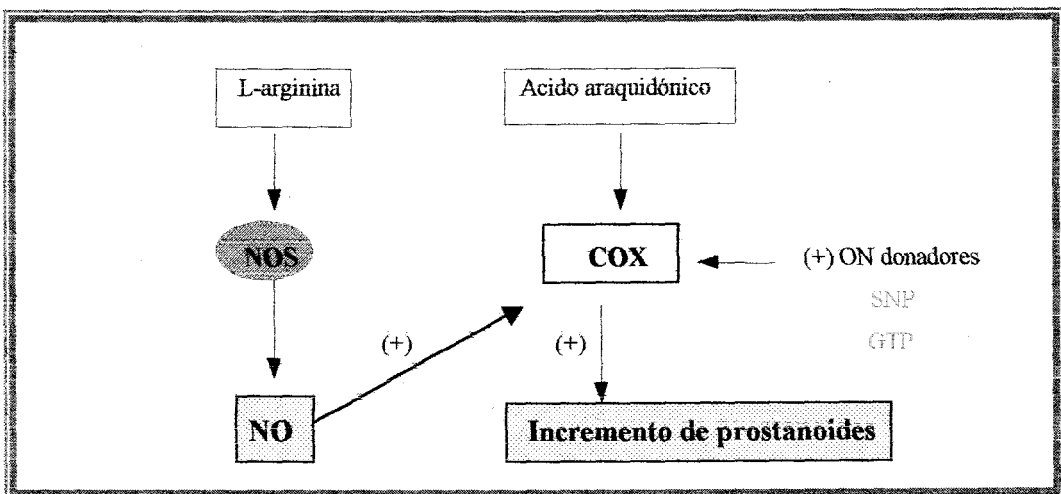
*El papel beneficioso* tiene lugar a través de la síntesis de poliaminas, ya que éstas intervienen en la síntesis proteica y tienen efectos protectores sobre las células hepáticas (Luk, 1986; Nagoshi y cols., 1994).

En cuanto a los *efectos lesivos*, el NO induce una inhibición en la síntesis de proteínas, transferencia electrónica y crecimiento hepático, siendo capaz de afectar severamente el movimiento de calcio mitocondrial (Richter, 1994).

Agentes bacterianos y endotoxinas, causan directamente alteraciones funcionales en el hepatocito (Stark y Szurszewski, 1992). Las células Kupffer estimuladas por agentes citotóxicos, liberan citoquinas (IL, TNF) que a su vez inhiben la síntesis proteica en hepatocitos. Esta inhibición podría ser NO-dependiente, ya que está asociada con la producción de nitratos, nitritos, y citrulina, y es bloqueada por análogos a L-arginina que inhiben a NOS (L-NAME, L-NNA, L-MMA).

#### II.4.2- RELACIÓN DEL NO CON LA ENZIMA CICLOOXIGENASA

Las enzimas COX son “blanco” del NO porque contienen un centro hemo-Fe<sup>2+</sup> como sitio activo, lugar donde interaccionaría este agente. Existen muchos estudios que demuestran como el NO aumenta la actividad de COX por mecanismos GMPc-independiente favoreciendo la producción de PG proinflamatorias. De hecho, existe un sinergismo entre el NO, PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> que operan amplificando respuestas fisiológicas o patológicas (Salvemini y cols., 1993, Vane y cols., 1994)(Figura 18).



**Figura 18- Modelo de regulación de la actividad COX por el NO. El NO tanto endógeno como exógeno actúa estimulando la COX y produciendo un incremento de PGs.**

COX y NOS son enzimas codificadas por diferentes genes. Sin embargo, presentan ciertas características bioquímicas y moleculares comunes; son hemoproteínas, en estado nativo son hemodímeros y poseen actividad catalítica bifuncional. Además, ambas poseen isoforma constitutiva e inducible.

Las isoformas constitutivas originan productos con importantes papeles en condiciones fisiológicas. En el sistema vascular, las dos enzimas catalizan la síntesis de potentes moléculas, PGI<sub>2</sub> y NO, con acción sinérgica, controlando plaquetas, monocitos y actividad celular del músculo liso, así como mantenimiento en la integridad vascular y flujo sanguíneo (Kenneth, 1995).

Con respecto a las inducibles, COX-2 y NOSi, son expresadas en la inflamación y tejido dañado, catalizando la formación de prostanoideos, principalmente PGE<sub>2</sub>, y NO e intermediarios oxigenados como los aniones peroxinitritos que causan daño severo (Vane y cols., 1994). De ésta forma, ambas enzimas pueden trabajar cooperativamente y contribuir en la patogénesis de la inflamación y lesiones en tejidos (Salvemini y cols., 1993)(Figura 19).

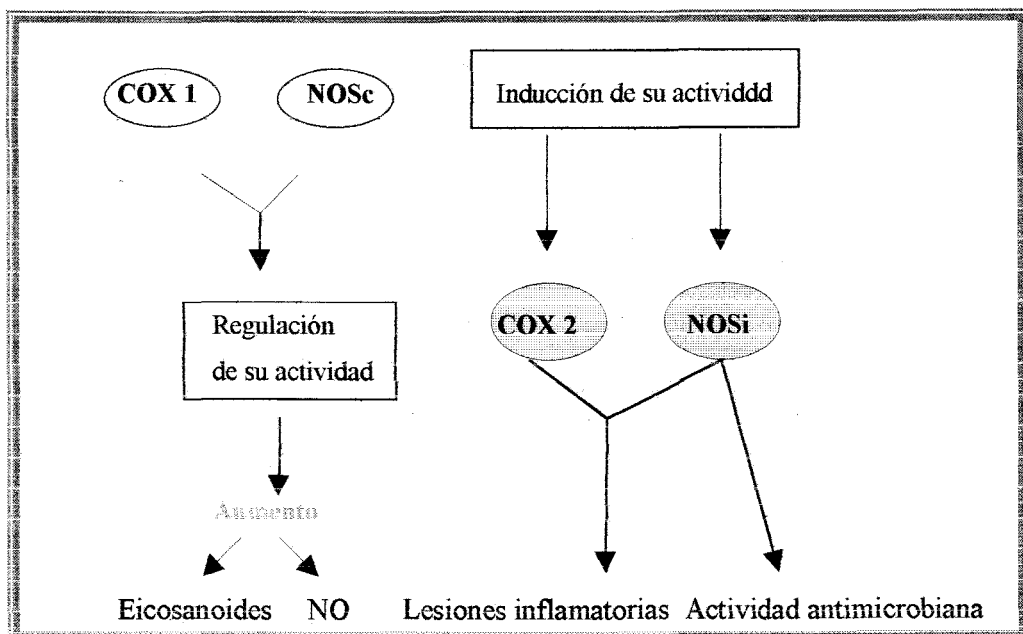


Figura 19- Interacciones de las isoformas COX y NOS en las condiciones fisiológicas y patológicas

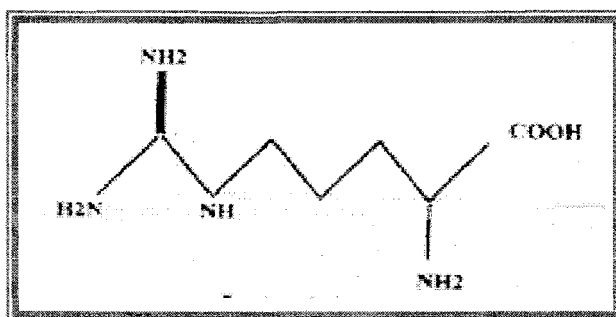
## **II.5- IMPORTANCIA DEL AMINOÁCIDO ARGININA.**

Las proteínas ingeridas en la dieta constituyen para el organismo la fuente principal de aminoácidos que, a su vez, son incorporados como proteínas. El exceso es degradado con el fin de proporcionar energía en los procesos biosintéticos. El grupo amino es excindido y excretado directamente, como ión amonio o como urea. El esqueleto carbono va a servir para formar ATP.

La presencia de un carbono asimétrico (Figura 20) da lugar a la formación de los isómeros levo (L-arg) y dextro (D-arg). Este último, biológicamente inactivo, se ha utilizado en numerosos ensayos para descartar o no la implicación del NO en los efectos de L-arg.

Entre las múltiples propiedades biológicas que éste aminoácido tiene, destaca su intervención en la restauración inmunológica y aceleración en la curación de lesiones (Cynober, 1994; Brzozowski y cols., 1997). Estudios recientes, muestran como la administración de L-arg produce una disminución del daño gástrico inducido por etanol y estrés. Esta protección va acompañada de un incremento del FSM (Brzozowski y cols., 1997).

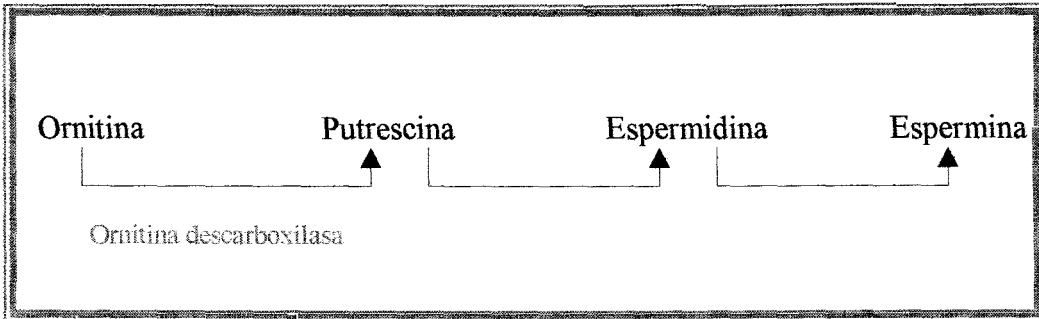
Hemos de comentar la importancia de L-arg como sustrato de diferentes e importantes enzimas semejantes a NOS, tales como arginasa y arginina descarboxilasa, entre otras (Nakaki y Kato, 1997).



*Figura 20- Estructura del aminoácido arginina*

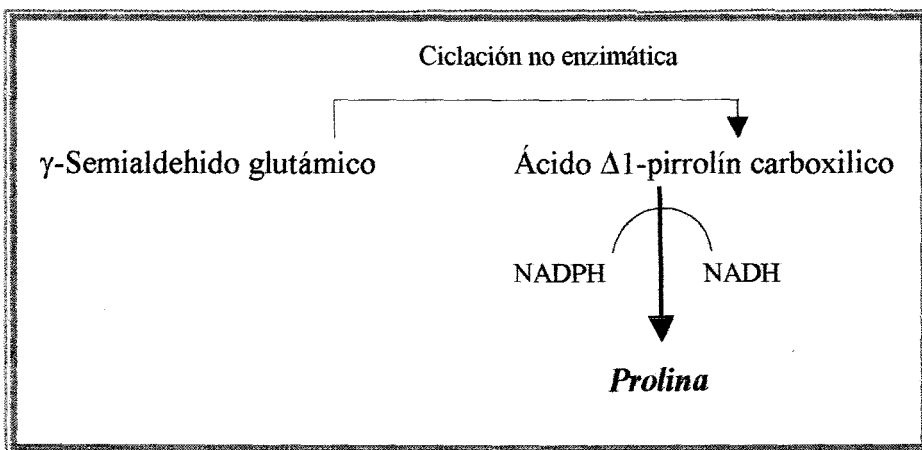
La enzima *arginina descarboxilasa (ADC)* cataliza la transformación de L-arg en agmatina (Nakaki y Kato, 1994), en las células endoteliales. Agmatina, es un endógeno agonista de los adrenoreceptores  $\alpha_2$  (Reis y cols., 1995), jugando un importante papel en los efectos antihipertensivos del aminoácido (Nakaki y Kato, 1994). Los receptores de ésta sustancia son reguladores en las células del músculo liso en crecimiento. Agmatina, y su metabolito hidroxiagmtina producen relajación endotelial mediada por la formación del NO.

La enzima *arginasa* cataboliza a L-arg en urea y L- ornitina, la cual es precursora de poliaminas (putrescina, espermina, espermidina) (Figura 21) y L-prolina (componente esencial del colágeno), compuestos requeridos para la proliferación celular. El NO formado a partir de L-arg origina intermediarios como N-hidroxiarginina (NOHA) que inhibe la actividad de la arginasa (Boucher y cols., 1994; Daghigh y cols., 1994; Buga y cols., 1996) y como consecuencia la proliferación celular.



*Figura 21- Síntesis de poliaminas a partir de ornitina.*

Una función a destacar es la de L-prolina por su incorporación a precursores polipeptídicos del colágeno y otras proteínas del tejido conjuntivo, de las que deriva la hidroxiprolina. La formación de prolina a partir de  $\gamma$ -Semialdehído glutámico, se ilustra en la Figura 22.

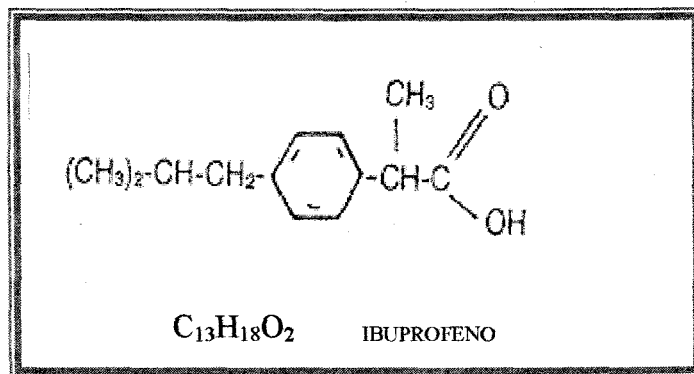


*Figura 22- Formación de prolina por ciclación no enzimática de  $\gamma$ -Semialdehído glutámico.*

## II.6-PERFIL FARMACOLOGICO IB/L-ARG

### IBUPROFENO

A lo largo de la historia, el análisis y el alivio del dolor han sido la base de una intensa evolución farmacológica orientada a la búsqueda de soluciones eficaces y seguras. Todo ello ha originado el desarrollo de una amplia gama de analgésicos/antiinflamatorios no esteroideos, de gran eficacia terapéutica. Ibuprofeno (IB), se introduce en clínica a finales de los años 60 y estructuralmente es un derivado del ácido propiónico: ácido 2-(4-isobutilfenil)propiónico.



Actualmente, la utilización de éste fármaco, ha alcanzado a nivel internacional un nivel que le ha supuesto convertirse en el relevo de otros fármacos analgésicos tradicionales como el AAS o paracetamol.



## 1- Características farmacocinéticas:

Su biodisponibilidad es del 80 %.

◆-**Absorción**: es rápida y los niveles plasmáticos máximos se alcanzan en 1-2 h después de una dosis oral única. Los alimentos retrasan la absorción oral. Su semivida de eliminación es de 2h (Figura 23).

La absorción rectal de IB es menor que la conseguida tras una administración oral.

◆-**Distribución**: el fármaco se une a las proteínas plasmáticas en elevada proporción (99%), concretamente se une al sitio II de la albúmina. Cuando la concentración plasmática de albúmina disminuye (artritis reumatoide, ancianos), la fracción libre de IB aumenta.

Se adapta al modelo farmacocinético bicompartimental con una cinética de absorción y eliminación de primer orden en el compartimento central.

Atraviesa con facilidad la placenta y alcanza concentraciones muy bajas en la leche materna.

◆-**Metabolismo y Excreción**: es ampliamente metabolizado en el hígado, siendo eliminado mayoritariamente con la orina, un 90 % en forma de metabolitos inactivos conjugados con el ácido glucurónico y un 10 % en forma inalterada. El estereoisómero R(-) se transforma en una alta proporción en el enantiómero activo S(+).

Estudios realizados en enfermos con fallo renal, demuestran que el fármaco es eliminado de la circulación sistémica, lo cual es explicable debido a la amplia metabolización que sufre.

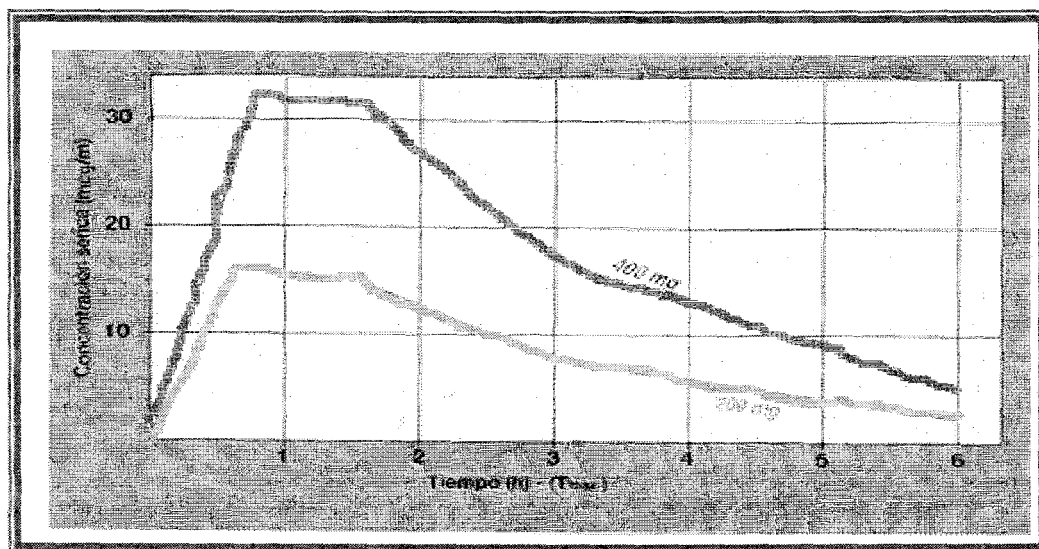


Figura 23- La dosis de IB 400 mg produce una concentración plasmática máxima doble a la alcanzada por dosis de 200 mg, manteniendo un tiempo máximo equiparable.

## 2- Posología:

### En procesos antiinflamatorios:

Adultos, oral- 400-800 mg/4 - 6 h, hasta un máximo de 3.2 g/ día. Retard: 600 - 1200 mg/12 h. Rectal: 500 mg/8 h.

Niños, oral- 10 mg/kg/6 h.

La administración oral debe realizarse conjuntamente con la comida.

### En procesos febriles y dolor:

Adultos, oral- 200-400 mg/4-6 h o 600 mg/12 h.

Niños, oral- 5-10 mg/kg/6-8 h, hasta un máximo de 40 mg/kg/día.

### 3-Reacciones adversas e interacciones

Es un fármaco bien tolerado y sus efectos adversos son en general, infrecuentes, leves y transitorios (1-9%).

Por lo general, los efectos son una prolongación de la acción farmacológica y afectan principalmente al aparato digestivo.

- *Efectos gastrointestinales.* Se asocia a una menor incidencia de alteraciones gastrointestinales que AAS, fenilbutazona, indometacina y otros AINE. No obstante también puede originar: dispepsia, erosiones y úlceras gástricas. En menor proporción puede dar lugar a epigastralgia severa, vómitos y sangrado oculto (Halpern y cols., 1993).

- *Efectos dermatológicos.* Las reacciones cutáneas son el segundo efecto adverso del IB. Las más frecuentes son angioedema, urticaria y prurito, así como diversas reacciones de hipersensibilidad (O'Brien y Bagby, 1985).

- *Efectos sobre el SNC.* Vértigos, dolor de cabeza, depresión, mareo y somnolencia no están normalmente asociados al consumo de éste AINE (Halpern y cols., 1993). Los ancianos suelen experimentar fallos de memoria y dificultad de concentración.

- *Efectos hematológicos.* Son raros. Puede aparecer anemia tras una hemorragia gastrointestinal, aplasia o depresión de la médula ósea con pancitopenia. Los más comunes son agranulocitos o granulopenia (Guidy y cols., 1979).

- *Efectos cardiovasculares.* En casos de insuficiencia cardíaca congestiva e hipertensión, estos pacientes pueden verse afectados por retención de sodio y edema (Hussan y Hodgen., 1985).

- *Efectos hepáticos.* Son poco frecuentes. Pueden dar lugar a un incremento de los niveles séricos de transaminasas (Aycock, 1991).

- *Efectos renales.* Suele presentarse disminución renal, retención hidrosalina y cambios hidrolíticos (Whelton y cols., 1990).

- *Reacciones de hipersensibilidad.* Pacientes con asma, pueden experimentar broncoespasmo, angioedema y/o shock tras la administración de IB (Aycock, 1991). Otras manifestaciones alérgicas son: rinitis, prurito, urticaria y erupción cutánea.

### Interacciones

- IB tiene un pequeño efecto sobre el tiempo de protrombina en pacientes que reciben terapia con anticoagulantes orales y podría contribuir a la aparición de episodios hemorrágicos debido al efecto antiagregante plaquetario (Aycock, 1991).

- En algunos pacientes modifica la acción de diuréticos y antihipertensores, lo cual puede exacerbar una insuficiencia cardíaca congestiva o interferir en el control de la hipertensión (Redack y cols., 1987).

- Incrementa los niveles séricos de litio (Ragheb, 1987) por interferir en la excreción de éste, y también los de metotrexato por inhibir su aclaramiento.

- La terapia concomitante con AAS, disminuye los niveles plasmáticos de IB, mientras que el paracetamol no los afecta (Aycock, 1991).

- Se han encontrado pequeñas cantidades del fármaco en leche materna, por ello no se recomienda su uso durante la lactancia.

#### 4- Aplicaciones Terapéuticas

- Por su actividad analgésica y antiinflamatoria se utiliza en el tratamiento de la artritis reumatoide, espondilitis anquilopoyética, osteoartritis, artritis gotosa y otro tipo de dolores osteomusculares. En situaciones crónicas conviene comenzar con dosis bajas para mejorar la tolerancia e ir aumentándola paulatinamente.

- Se está utilizando cada vez más con fines analgésicos: dolores menores, postoperatorios, dentarios, cólicos renales.

- Está indicado también como antipirético en diversos cuadros febriles, especialmente en niños.

#### 5- Eficacia

Si comparamos el efecto de IB en diferentes tipos de dolor, con el de otros analgésicos no narcóticos, se comprueba que su eficacia es similar e incluso superior.

- Ibuprofeno vs paracetamol en el alivio del dolor postquirúrgico: 107 pacientes a los que se les extrajo el tercer molar, se repartieron en tres grupos que recibieron los siguientes tratamientos: 800 mg IB antes de la intervención y 400 mg, 4 y 8 h después, 3 dosis de placebo, o paracetamol (3dosis/600 mg antes de la intervención, seguidas de 2 dosis/600 mg más 60 mg de codeína en el postoperatorio.

- Ibuprofeno vs AAS, meclofenamato (MEC) y placebo en el dolor severo: 152 pacientes con dolor molar moderado-severo y distribuidos de forma aleatoria, fueron tratados con una dosis única de IB 400 mg o AAS 650 mg o MEC 100 mg y placebo, en un estudio doble ciego. IB y MEC fueron superiores a AAS y placebo

en la suma de cotaciones de alivio a diversos tiempos, duración del efecto analgésico y valoración global, manifestando reacciones adversas de carácter leve y reversible (Desjrdins y cols., 1987).

- IB vs paracetamol y codeína en el alivio postextracción (Figura 24): 203 pacientes repartidos de forma aleatoria, fueron tratados con dosis única de paracetamol (600, 300mg + 30 mg de codeína, 600 mg + 60 mg de codeína) o IB 400 mg o de placebo, en un estudio a doble ciego.

IB alcanzó el nivel de analgesia más alto y fue el tratamiento más eficaz (Cooper, 1984).

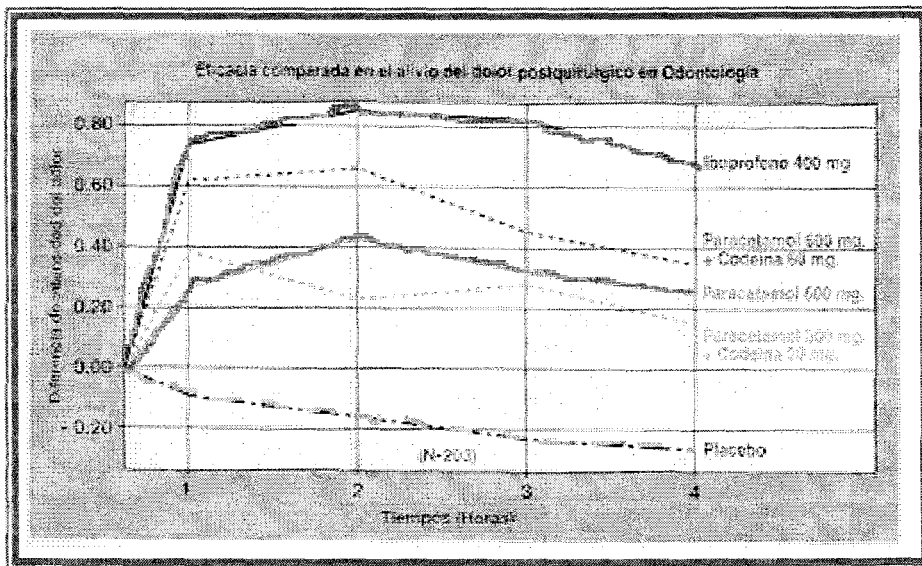


Figura 24- IB 400 mg vs paracetamol y codeína.

*IBUPROFENO/L-ARGININA (Espidifen® 400 y 600 mg)*

*Espidifen*® es un fármaco recientemente comercializado. Está formado por dosis equimolares de IB y L-arg, aminoácido esencial que en condiciones normales se ingiere con la dieta. Una serie de estudios han demostrado que la incorporación de determinados aminoácidos (L-arg, L-lys) a las formas farmacéuticas orales de algunos AINE, mejoran sus características farmacocinéticas.

En el caso de *Espidifen*®, éstas son sensiblemente diferentes a las de IB sólo (Tabla 3).

Parámetro	IB/L-arg	IB comprimidos normales	Estadística
T <sub>máx</sub>	24.4±15.9	63.8±29.7	p<0.01
C <sub>máx</sub>	56.4±13.6	43.1±8.5	p<0.01
T <sub>1/2</sub>	111±21.9	117±26.7	ns
Kel	0.006±0.001	0.006±0.002	ns
Lag time	0.0±0.0	9.96±13.7	
AUC <sub>obs</sub>	6959±1137	6858±1740	ns
AUC <sub>tot</sub>	7167±1273	7161±1873	ns
Vd	9.06±1.40	9.98±3.16	ns
Cl	0.057±0.011	0.059±0.015	ns

*Tabla 3- Parámetros farmacocinéticos correspondientes a IB/L-arg 400 mg y a una formulación comercializada con sólo IB 400 mg en comprimidos de liberación normal. La absorción de IB/L-arg es significativamente diferente a la del fármaco sólo, así como el tiempo necesario para llegar a las correspondientes concentraciones plasmáticas*

ns= no significativo

AUCobs= Área bajo la curva observada

AUCtot= Área bajo la curva total

Kel= Constante de eliminación

Vd= Volumen de distribución

CL=Aclaramiento plasmático

## 1- Características farmacocinéticas

▲-**Vía de administración y absorción:** IB/L-arg se administra vía oral. Posee una cinética de absorción muy favorable debido a que el aminoácido dispone de un mecanismo biológico específico en la pared gastrointestinal, actuando como transportador fisiológico selectivo y favoreciendo así la absorción de IB.

Como consecuencia, la concentración plasmática máxima resulta mucho más elevada que la de IB solo, además de producirse en un tiempo 3 veces menor.

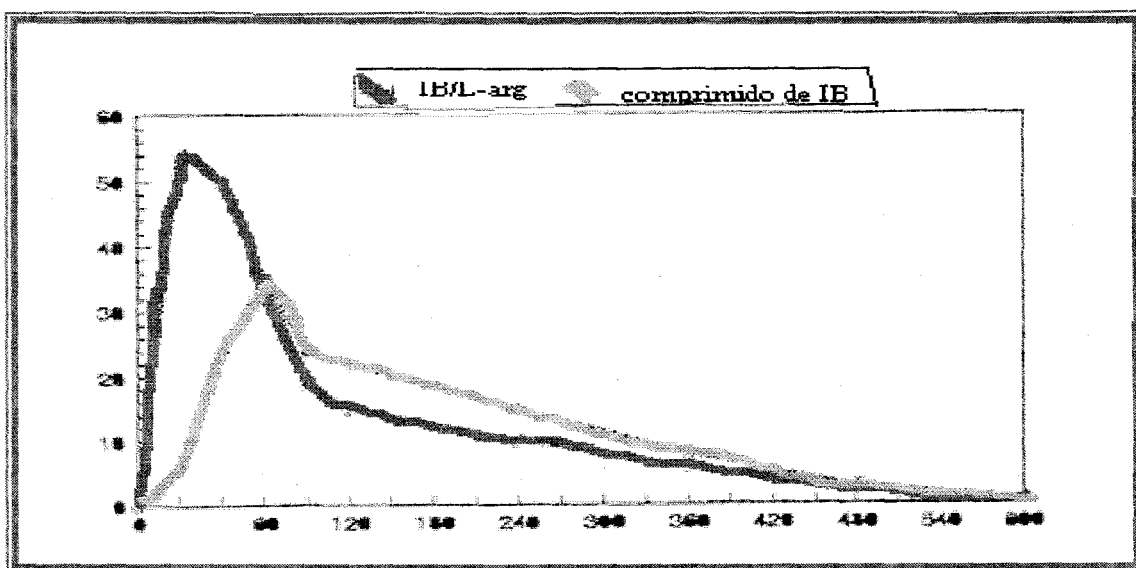
A los 15 min de la administración del fármaco, se consigue una concentración plasmática muy elevada y superior a la alcanzada a los 60 min. La  $T_{máx}$  es de unos 24 min, siendo la  $C_{máx}$  en plasma de aprox. 56.4 mg/mL.

La ventaja de éstas características farmacocinéticas es que permite obtener niveles plasmáticos particularmente elevados tras la administración oral y por tanto una acción analgésica casi inmediata, sin necesidad de recurrir a la administración parenteral.

Un aspecto interesante de ésta formulación es que debido a su rápida absorción, reduce los potenciales efectos gastrointestinales al mínimo y se puede administrar con el estómago vacío.



▲-*Curvas de niveles plasmáticos:* Tras la administración de una dosis oral única de IB/L-arg, al cabo de una  $T_{máx}$  de 24.4 min, se obtiene unos valores de  $C_{máx}$  de  $56\mu\text{g/mL}$  frente a los valores respectivos de  $43\mu\text{g/mL}$  ( $C_{máx}$ ) y 64 min ( $T_{máx}$ ) para el IB sólo (Figura 25).



*Figura 25-Comparación de las curvas de absorción de IB/L-arg frente a comprimidos de IB. Las curvas de absorción, evidencian una superior concentración plasmática máxima para IB/L-arg, obteniéndose además, en un tiempo mucho menor que las obtenidas con IB sólo.*

▲-*Unión a proteínas plasmáticas:* IB se une en un alto porcentaje (99%) a proteínas plasmáticas, aunque sólo ocupa una fracción de los sitios de fijación a las concentraciones habituales.

▲-*Vía y cinética de eliminación:* más del 90% de la dosis ingerida de IB/L-arg se excreta de forma rápida y prácticamente completa por vía renal, en forma de metabolitos mayoritariamente conjugados. La presencia de catabolitos derivados de IB no interfiere de forma significativa en la actividad y farmacocinética de este principio

activo. Se recomienda su empleo con precaución en pacientes con la funcionalidad hepática y/o renal reducidas. En estos casos es aconsejable controlar los parámetros clínicos y de laboratorio.

♣-*Otras vías de eliminación:* debe tenerse en cuenta que IB aparece en la leche materna, por lo que no se recomienda el uso del preparado durante el período de lactancia.

## 2- Posología

La dosificación recomendada en un adulto es de 1200 mg/día, repartidas de 3 a 4 tomas. Si aparecen molestias gástricas, puede administrarse con leche o durante las comidas. En procesos de artritis reumatoides, puede incrementarse la dosis pero no sobrepasando 2.4 g/día.

En pacientes ancianos, la posología debe ser establecida por el médico.

## 3- Actividad farmacologica. Mecanismo de acción

La formulación IB/L-arg equimolar presenta un mecanismo de acción semejante a los fármacos capaces de inhibir la síntesis periférica de PG. Actúa inhibiendo la actividad de la enzima COX, de forma competitiva y reversible.

No existe una relación precisa entre la potencia anticiclooxigenasa y potencia analgésica, ya que ésta última es elevada con una actividad anticiclooxigenasa media.

#### 4- Eficacia clínica

La efectividad de la formulación IB/L-arg (Espidifen®) ha sido estudiada y desarrollada por el GRUPO ZAMBÓN, en adultos de ambos sexos y en diferentes situaciones patológicas. En estos ensayos se ha confirmado la eficacia y seguridad de este medicamento en el tratamiento del dolor agudo, con diferencias significativas en la rapidez y potencia analgésicas frente a los tratamientos de referencia.

Los ensayos clínicos se realizaron comparando este medicamento frente a placebos y otros fármacos analgésicos-antiinflamatorios no esteroideos, de los habitualmente utilizados, tales como naproxeno sódico. En una amplia casuística global, la eficacia del preparado igualó o superó a la de los fármacos de referencia.

#### 5- Reacciones adversas

- A nivel *gastrointestinal*, puede observarse náuseas, vómitos, dispepsia, pirosis gástrica, sensación de molestia abdominal (1-9%), diarrea, microlesiones intestinales, posible activación ulcerosa y hemorrágicas (<<1%).

- En ocasiones puede observarse *cefalea, confusión y somnolencia* (<1%). Raramente se han producido reacciones de *tipo psicótico y depresión*, así como *náuseas, vómitos, fiebre, rigidez del cuello* y una cierta *obnubilación* (<<1%).

- Como reacción de *hipersensibilidad*, se ha observado rash cutáneo, urticarias y exantemas con más o menos prurito y en ocasiones también con fiebre acompañada de dolor abdominal, cefaleas, náuseas y vómitos, signos de disfunción hepática y fenómenos anafilácticos.

- Tras la administración prolongada y a dosis elevadas, el IB puede ocasionar *alteraciones en los elementos corpusculares de la sangre y retención hidrosalina*, con la posible aparición de hinchazón y edemas.

## 6- Teratogenicidad

Los estudios de teratogenicidad y actividad reproductora, así como los de mutagénesis realizados con IB, no han puesto de manifiesto alteraciones significativas tras la administración del fármaco por vía oral. Sin embargo, debido a que puede atravesar la barrera placentaria, no se recomienda su uso durante el embarazo.

## 7- Toxicidad

Los estudios preclínicos relacionados con la toxicología de IB/L-arg demuestran que este nuevo fármaco no modifica la toxicidad del IB cuando se administra a diferentes dosis.

Para evaluar la toxicidad del preparado, se ha realizado en rata el cálculo de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>, toxicidad aguda) y también los efectos que derivan de su administración reiterada, 28 días (toxicidad subaguda). Los resultados se han comparado con grupos tratados con IB sólo.

El estudio de la toxicidad aguda, puso de manifiesto que la DL<sub>50</sub> en rata es de 3017 mg/kg para machos, y 2763 mg/kg para hembras, equivalente a dosis de IB de 1557 y 1435 mg/kg respectivamente. La evaluación del IB determina una DL<sub>50</sub> de 1556 mg/kg para machos y 1520 mg/kg para hembras. En ratón, el rango se mantuvo entre 800-1200 mg/kg.

Fueron evidentes, la postración a dosis subletales y las lesiones gástricas a las dosis más altas.

Para evaluar la toxicidad subaguda, se administraron diariamente a los animales, durante 4 semanas, rangos de dosis comprendidas entre 38 y 346 mg/kg, equivalentes a 20-180 mg/kg de IB.

Los signos más relevantes fueron las lesiones gastrointestinales, postración y reducción de los niveles de hemoglobina, aunque sólo aparecieron cuando se administraron dosis muy elevadas del preparado (115 mg/kg/día - 346 mg/kg/día).

A dosis normales (38 mg/kg/día, que corresponde a 20 mg/kg/día de IB), Espidifen<sup>®</sup> fué perfectamente tolerado, no evidenciándose ningún efecto tóxico (Tabla 4).

En conclusión, IB/L-arg (Espidifen<sup>®</sup>) presenta una toxicidad aguda y subaguda muy baja, apareciendo sólo trastornos evidentes cuando se administran dosis medio-altas y elevadas. Sin embargo, las dosis clínicas no alteraron ninguno de los parámetros evaluados, lo que permite considerarlo un fármaco seguro para el uso humano.

<i>Estudio</i>	<i>Vía de administración</i>	<i>Especie</i>	<i>Dosis IB/L-arg (mg/kg)s</i>	<i>Resultados</i>
<i>Toxicidad aguda</i> (Tolerabilidad tras dosis única)	Oral	Ratas	1925-3465 equivalentes a 1000 a 1800 de IB	-DL <sub>50</sub> fueron similares a dosis equivalentes. -La postración y efectos GI ocurrieron sólo a dosis muy elevadas
<i>Toxicidad subaguda</i> (Tolerabilidad tras dosis repetidas (28 días).	Oral	Ratas	38, 115 y 346 equivalentes a 20, 60 y 180 de IB.	-Dosis normales no produjeron signos de toxicidad. -Dosis medio-altas: descenso de la hemoglobina y trastornos GI. -Dosis elevadas: postración, sangre oculta en heces.

Tabla 4- Resumen de los estudios toxicológicos realizados con Espidifen® en comparación con IB.

## 8-Sobredosis, síntomas principales y tratamientos

En casos de sobredosificación, puede aparecer una sintomatología caracterizada por vértigo, espasmos, hipotensión y reducción de la conciencia. Si ha transcurrido menos de 1h de la ingesta del fármaco, se recomienda practicar un lavado gástrico.

Es efectivo también, el aporte por vía oral de sustancias tales como carbón activado, para reducir la absorción del fármaco.

En el caso de que haya transcurrido más de 1h, hay que corregir los electrolitos hemáticos con la adición de álcalis.

## 9-Indicaciones Clínicas y ventajas de la formulación de IB/L-arg

Espidifen<sup>®</sup> está indicado en el alivio del dolor de diversa etiología: cefaleas, odontalgias, otalgias, dismenorrea primaria, postraumático, postquirúrgico, artritis reumatoide y osteo-artritis.

También está indicado en el alivio de los signos y síntomas de la artritis reumatoide y de la osteo-artritis, así como en aquellas alteraciones músculo-esqueléticas y traumáticas que cursan con dolor e inflamación.

En la especialidad Espidifen<sup>®</sup>, gracias a la inclusión del aminoácido L-arg, se produce una mayor solubilidad de IB y favorece una mejor, más rápida y más elevada absorción del fármaco, significativa frente a otras formas de IB ya comercializadas. Este hecho, así como sus mayores niveles plasmáticos, se traducen en una rápida y potente acción analgésica, lo cual lo convierte en un tratamiento de elección en aquellos casos en que se requiere una acción antálgica rápida, potente y segura en el dolor agudo.

## 10- Contraindicaciones y precauciones

Se consideran contraindicaciones:

- Hipersensibilidad a los fármacos. Úlcera péptica activa y recurrente, o riesgo de hemorragia gastrointestinal. Colitis ulcerosa. Insuficiencia hepática y/o renal de carácter grave. Rinitis o urticaria consecutiva a la administración de inhibidores de la síntesis de PG. Embarazo.

- Debido a la posible reacción alérgica cruzada con AAS u otros AINE, no debe administrarse IB en pacientes con historial de reacción alérgica a estos fármacos, asma, rinitis, urticarias, pólipos nasales y angioedema.

Con especial precaución, se debe administrar:

- En pacientes de riesgo o con alteraciones gastrointestinales debidas al uso de AINE, en pacientes con historial de broncoespasmo, en ancianos o en individuos con función renal y hepática reducida.

- En algunos casos, se ha observado retención hidrosalina tras la administración de IB, por lo que debe administrarse con precaución en pacientes con insuficiencia cardíaca o hipertensión.

- IB puede prolongar el tiempo de hemorragia, por lo que se debe tener cuidado en pacientes con alteraciones de la coagulación sanguínea o tratamiento con anticoagulantes.



## 11- Interacciones e interferencias analíticas

- IB disminuye la eficacia de furosemida y diuréticos tiazídicos, debido a la inhibición de prostaglandinas renales, lo que debe tenerse en cuenta en caso de terapia combinada.

- Potencia el efecto y la toxicidad de digoxina, litio, carbonato y metotrexato.

- Podría potenciar el efecto de los anticoagulantes orales, por lo que es conveniente controlar el tiempo de protrombina durante la primera semana.

- La posibilidad de reducir el efecto hipotensor de fármacos  $\beta$ -bloqueantes, así como de aumentar el efecto ulcerógeno de corticosteroides, debe considerarse en caso de tratamientos concomitantes.

- IB no se debe utilizar en asociación con otros AINE como AAS y paracetamol.

- Puede alterar los valores de algunas determinaciones analíticas: aumento de transaminasas, ALT y AST, creatinina, digoxina y urea; fosfatasa alcalina, bilirrubina y creatinina. Reducción de albúmina, y ácido úrico.

### **III- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **III.1- REACTIVO ANIMAL**

El estudio ha sido realizado con ratas Wistar machos de peso comprendido entre 180-200g, mantenidas a temperatura ambiente de 20-25 °C, 12 horas de luz al día y alimentación controlada. Han sido suministradas por el Servicio de Animales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Sevilla.

24 h antes de comenzar los ensayos, los animales fueron introducidos en jaulas individuales provistas de rejilla metálica de 2 cm de altura sobre el fondo para evitar la coprofagia y retirando la comida, pero con libre acceso al agua.

El número de animales por grupo utilizados en los estudios, ha estado comprendido entre 8-10 animales/grupo.

### III.2- SUSTANCIAS ENSAYADAS. PAUTAS POSOLÓGICAS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

Se han ensayado diferentes dosis de fármacos para determinar la acción protectora de L-arginina frente a dosis equimolares de ibuprofeno:

- \* Ibuprofeno/L-arginina (IB/L-arg, Espidifen<sup>®</sup>; Zambón S.A.): 0.3, 0.6 y 1.20 mM/kg de animal.
- \* Ibuprofeno (IB, sal sódica; Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA): 0.3, 0.6 y 1.20 mM/kg de animal.
- \* L-arginina (L-arg, clorhidrato; Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA): 0.6 mM/kg de animal.

El efecto gastroprotector también se ha comparado con otros fármacos de referencia:

- \* Ranitidina (RAN, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA): 0.05 mM/kg de animal. Antagonista de los receptores H<sub>2</sub>.
- \* Misoprostol (MSP, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA): 0.05·10<sup>-3</sup> mM/kg de animal. Análogo de PGE<sub>2</sub>.
- \* L-lisina (L-lis, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA): 0.6 mM/kg de animal. Aminoácido protector de la mucosa gástrica.
- \* Roxatidina (ROX, Zambón S.A.): 0.05 mM/kg de animal. Antagonista de los receptores H<sub>2</sub> con propiedades además de antisecretoras, citoprotectoras.

Para evaluar el papel del óxido nítrico (NO), en la protección mediada por L-arg, se han realizado los siguientes tratamientos:

- \* D-arginina (D-arg, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA): 0.6 mM/kg de animal. Isómero dextro de la arginina, biológicamente inactivo.

- \* N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA): 0.15 mM/kg de animal. Inhibidor no selectivo de óxido nítrico sintetasa.
- \* Mononitrato de isosorbida (MI, Boehringer Mannheim):  $0.2 \cdot 10^{-2}$  mM/kg de animal. Donador de NO.
- \* Aminoguanidina (AG, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA): 0.4 mM/kg. Inhibidor selectivo de NOSi.
- \* N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (L-NNA, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA): 0.2 mM/kg. Inhibidor selectivo de NOSc.

Todos los tratamientos se han preparado en forma de solución extemporánea, en agua destilada. La administración vía oral, ha sido mediante sonda intragástrica (1ml/100g animal).

Los efectos producidos fueron comparados con distintos grupos controles a los cuales se les administró agua destilada (1mL/100g de animal).

Tratando de valorar el efecto protector de L-arginina en la mucosa gástrica por mecanismos sistémicos frente a una acción tópica directa, se han realizado los siguientes tratamientos:

- \* IB/L-arg: 0.6/0.6 mM/kg, ambos v.o.
- \*IB 0.6 mM/kg, v.o. y simultáneamente L-arg 0.6 mM/kg, i.p.

### **III.3- EQUIPOS ANALÍTICOS UTILIZADOS**

Los equipos analíticos que se han utilizado para las diferentes determinaciones son:

**\* Medidas espectrofotométricas:**

- Espectrofotómetro UV-visible, Perkin-Elmer 1310, Lambda 3.
- Lector de placas Labsystems Multiskan Ex con equipo informático "Genesis".

**\* Radioinmunoanálisis:**

- Contador de centelleo  $\beta$ .
- Contador Compugamma Cs, 1282-003.

**\* Análisis de imágenes de expresión de ARN m:**

- MP-5 Polaroid

### **III.4- EVALUACIÓN DEL DAÑO GÁSTRICO**

#### *III.4.1- ESTUDIO MACROSCÓPICO DE LAS LESIONES: SELECCIÓN DE DOSIS Y TIEMPOS DE TRATAMIENTOS:*

##### **III.4.1.1- EFECTOS INDUCIDOS TRAS LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE LOS FÁRMACOS**

Con objeto de valorar la protección de la asociación IB/L-arg frente a IB solo, se han administrado las diferentes dosis anteriormente indicadas de éstos agentes. Después de 6h de tratamiento, los animales han sido sacrificados por inhalación de éter, los estómagos extraídos, abiertos por la curvatura menor y lavados con solución salina fisiológica (sol. sal. fis.), procediéndose después a valorar el daño. Se han medido los siguientes parámetros:

- Área lesionada (mm<sup>2</sup>)
- Daño gástrico (escala):
  0. Ausencia de lesión
  1. Daño vascular
  2. Úlceras puntuales
  3. Úlceras puntuales y también menores de 3 mm
  4. Varias lesiones > 3 mm.

Estos valores (mm<sup>2</sup> y escala) se expresan como índice de ulceración (IU).

- Porcentaje de daño mucosal (%)
- Estómagos lesionados / Estómagos totales valorados.
- Presencia de hemorragia (escala de 0-2):
  0. Ausencia
  1. Hemorragia escasa
  2. Hemorragia abundante

Para determinar la evolución de las lesiones gástricas en el tiempo, la dosis intermedia de ambos agentes, IB 0.6 mM/kg e IB/L-arg 0.6/0.6 mM/kg fué ensayada a diferentes tiempos: 30 y 90 min, 6 y 12 h. Dicha dosis, así como el tiempo de 6 h, en el que se obtuvo el máximo grado de protección de L-arg, fueron pautas seleccionadas para el resto de los ensayos. Los efectos de la asociación IB/L-arg se compararon con los fármacos de referencia, RAN, MSP, L-lys y ROX.

#### III.4.1.2- EFECTOS PRODUCIDOS TRAS LA ADMINISTRACIÓN PARENTERAL DE L-ARGININA

Con objeto de comparar la acción protectora del aminoácido L-arg bien por efecto sistémico, independiente de la vía de administración, o por un efecto tópico, se ha diseñado el siguiente ensayo:

Un grupo de animales ha sido tratado con IB 0.6 / L-arg 0.6 mM/kg, v.o., y a otro grupo, se le administró IB 0.6 mM/kg, v.o. y al mismo tiempo, L-arg 0.6 mM/kg, i.p.

Transcurrido el tiempo establecido (6h), los animales fueron sacrificados y sus estómagos evaluados según los criterios anteriormente establecidos.



### *III.4.2- ESTUDIO MICROSCOPICO DE LAS LESIONES*

#### **ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS EFECTOS VASCULARES DE L-ARGININA EN DAÑO GÁSTRICO AGUDO EN RATA, INDUCIDO POR IBUPROFENO**

El objetivo de éste estudio ha sido determinar las variaciones que L-arg induce en las lesiones inducidas por IB. Para ello, se ha realizado el estudio histológico de 24 muestras gástricas, tomadas en zonas con daño agudo.

Las muestras procesadas corresponden:

- Control sano (GRUPO I)
- IB 0.6 mM/kg v.o. (GRUPO II)
- L-arg 0.6 mM/kg v.o. (GRUPO III)
- IB 0.6/L-arg 0.6 mm/kg v.o. (GRUPO IV)

Después de 6h de tratamiento, los animales han sido sacrificados por inhalación de éter, los estómagos extraídos, abiertos por la curvatura menor y lavados con sol. sal. fis., procediéndose a extraer un fragmento ( 3x3 mm) de la parte dañada del tejido. Éste es incluido en una solución fijadora de formol tamponado 10% (pH 7.2).

Todas las muestras se incluyeron en parafina, realizándose secciones de 2 mm de grosor. De cada uno de los bloques, se realizaron secciones de 5 micras aproximadamente.

De las muestras pertenecientes al grupo II y IV, se obtuvieron tres preparaciones histológicas, tñiéndose una de ellas con hematoxilina/eosina (H/E). Dichas preparaciones fueron examinadas con un microscopio (Olympus BH), utilizándose los objetivos de 4x, 10x, 40x, y esporádicamente 100x.

El estudio histomorfométrico se llevó a cabo mediante un sistema de análisis semiautomático Videoplan 2 (Zeiss) que permitió realizar el cálculo del área gástrica con daño, así como el área vascular total. Se calculó el porcentaje de microvascularización de las áreas gástricas lesionadas.

La escala empleada para la determinación de las lesiones han sido:

- GRADO 1    lesión gástrica al tercio superficial de la mucosa.
- GRADO 2    lesión gástrica que afecta a todo el espesor de la mucosa, respetando la muscularis mucosae.
- GRADO 3    lesión gástrica que afecta a la mucosa y submucosa, respetando la capa muscular.
- GRADO 4    lesión gástrica que afecta a toda la pared gástrica, respetando la serosa.
- GRADO 5    lesión gástrica que perfora toda la pared gástrica.

## **III.5- MECANISMOS IMPLICADOS**

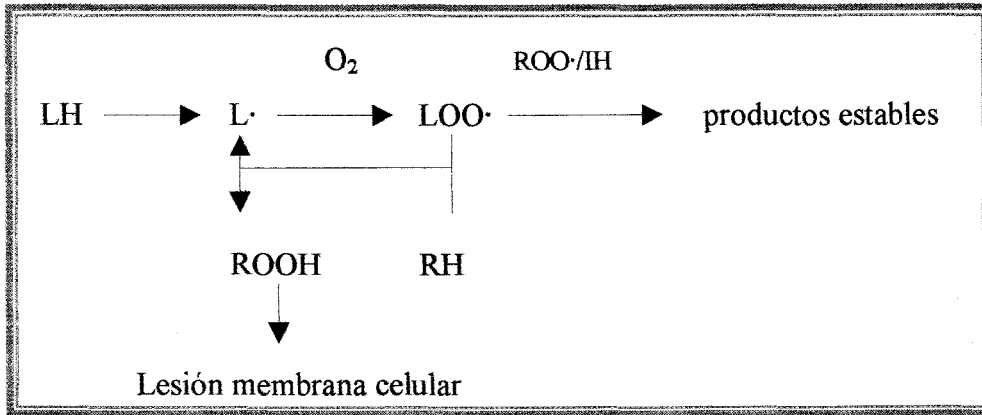
### *III.5.1- MODIFICACIONES INDUCIDAS SOBRE EL METABOLISMO OXIDATIVO*

#### **III.5.1.1- NIVELES DE LIPOPERÓXIDOS EN LA MUCOSA**

Uno de los mecanismos más importante de ataque a la célula es la peroxidación de los ácidos grasos insaturados de la membrana celular.

Los RLO son capaces de desencadenar una reacción en cadena que da origen a la formación de lipoperóxidos y aldehídos altamente tóxicos. Ello induce cambios en la fluidez de la membrana plásmica, alteración de la permeabilidad iónica, y/o modificación del metabolismo del ácido araquidónico. Determinadas situaciones patológicas y algunos agentes, incluidos los AINE, pueden inducir este proceso en las células de la mucosa digestiva causando lesiones gastrointestinales (Huertas y cols., 1991; Comporti, 1993; Bjarnason, 1995).

Los niveles de peróxidos lipídicos han sido determinados mediante la técnica descrita por Ohkawa y cols. (1979). Se basa en la medida espectrofotométrica (535 nm) de los niveles de malonildialdehído (MDA), producto final del proceso degradativo, obtenido tras reacción con el ácido tiobarbitúrico (Figura 26).



**Figura.26** Peroxidación lipídica mediada por radicales libres

*- Descripción de la técnica:*

Al finalizar los diferentes tratamientos, los animales son sacrificados por inhalación de éter, y sus estómagos resecados, abiertos por la curvatura menor y raspados sobre hielo. El raspado, previamente pesado, se homogeniza en 1 mL de cloruro potásico 0.15 M. A una alícuota del homogenizado, 0.25 mL, se le añade secuencialmente: 0.1 ml de laurilsulfato sódico (8.1%), 0.75 mL de ácido acético (20 % a pH 3.5) y 0.75 ml de ácido tiobarbitúrico (0.8 %), ajustándose el volumen final a 2 mL con agua destilada.

Posteriormente se lleva a un baño de agua a 95 °C durante 1 h. Pasado este tiempo se enfría la solución en hielo y se le adiciona 0.5 ml de agua destilada y 2.5 ml de n-butanol, se agita vigorosamente, y se centrifuga a 2665g, 10 min. Se recoge la capa orgánica y se mide la absorbancia a 532 nm.

Los resultados son expresados en nmol MDA / mg de proteína.

La concentración de proteínas en el tejido mucosal se ha determinado aplicando el método de Bradford (1976).

### III.5.1.2- MEDIDA DEL INDICE DE INFILTRACION LEUCOCITARIA. ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA

Los neutrófilos están implicados en una serie de desórdenes gastrointestinales, entre los que se incluyen las lesiones inducidas por AINE (Wallace, 1992; Asako y cols., 1992; Avila y cols., 1996).

La determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO), proteína constitutiva de los neutrófilos, es un método para cuantificar el grado de infiltración leucocitaria inflamatoria. Esta enzima es liberada a los fluidos extracelulares, donde oxida a haluros y tiocianatos a los correspondientes ácidos hipohalurosos (Klebanoff 1988). Estos ácidos reaccionan con los sustratos disponibles, disminuyendo así su reactividad y además, participan en la génesis de cloraminas que son menos oxidantes que el propio ácido (Figura 27, Figura 28).

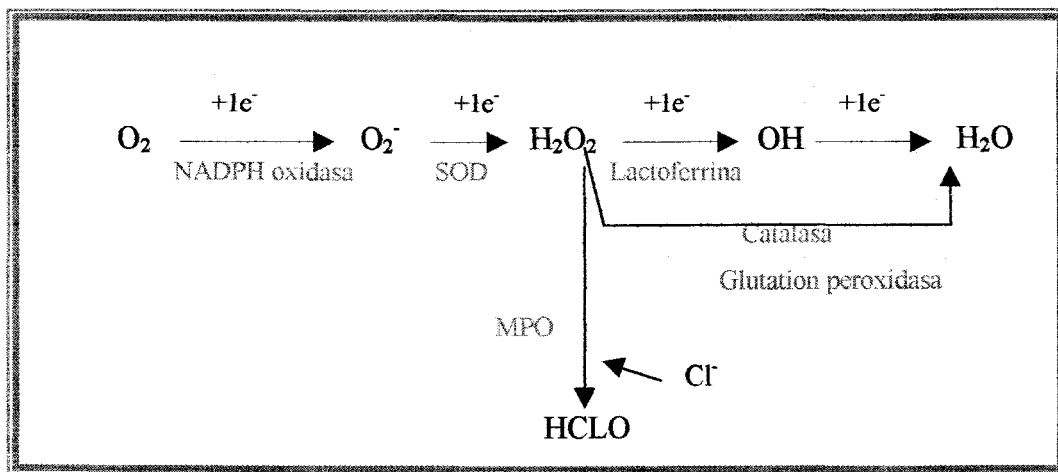
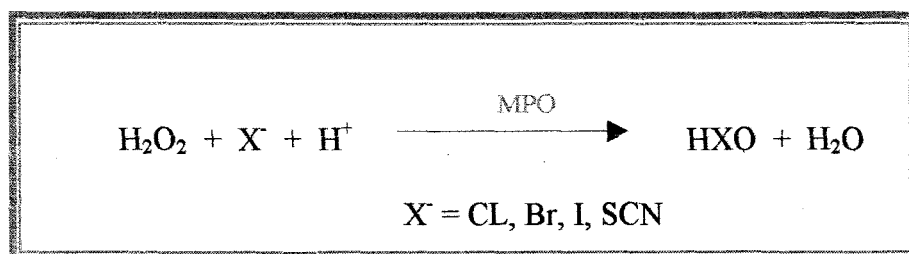


Figura.27- Formación de radicales libres en los neutrófilos y enzimas implicadas.



**Figura.28- Formación de haluros y tiocinatos por la enzima MPO**

Hemos seguido la técnica propuesta por Grisham y cols. (1990), que presenta una serie de ventajas:

- no requiere manipulación *in vivo* de leucocitos.
- es sencilla de realizar.
- cuantifica de forma precisa los leucocitos polimorfonucleares (PMN)

El método está basado en la oxidación, dependiente de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de un donador artificial de electrones, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), con producción de un cromógeno azul cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente.

El tiempo máximo para la determinación de dicha enzima es de 2 semanas (-40°C), período en el que se mantiene inalterada su actividad.

*- Descripción de la técnica:*

Se procesan unos 100 mg de muestra gástrica lesionada. El tejido es lavado en sol. sal. fis, pesado, homogenizado en 10 volúmenes de tampón fosfato potásico, pH

7.4, y centrifugado a 20.000g, 4°C, 20 min. El precipitado se vuelve a homogenizar en 10 volúmenes de tampón fosfato potásico, pH 6.0, que contiene 0.5 % de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HETAB) y 10 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La adición de HETAB ayuda a solubilizar completamente la MPO presente en las membranas e inhibe la actividad pseudoperoxidasa de hemoglobina y mioglobina que podría quedar asociada a las membranas del precipitado. Seguidamente se somete el homogenizado a un ciclo de congelación-descongelación, y a una sonicación durante 15 seg, lo cual favorece la liberación total de la enzima.

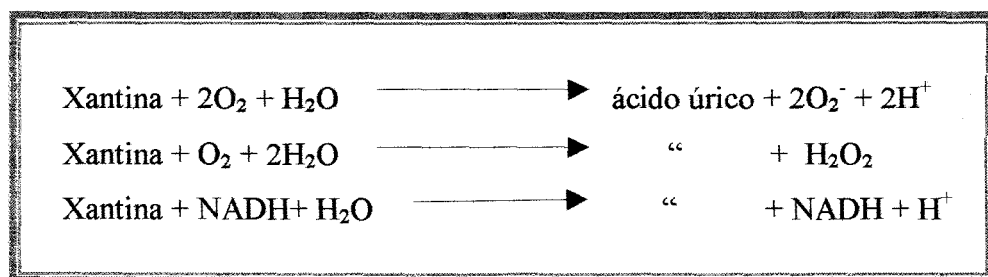
A una alícuota del homogenizado, 100  $\mu$ L, se le añaden 0.5 ml de una solución 80 mM de tampón fosfato potásico, pH 5, que contiene 0.5 % (p/v) de HETAB, y 1.6 mM de TMB obtenido a partir de una solución madre de TMB 10 mM en N,N-dimetilformamida, y se mantiene a 37°C. La reacción se inicia con la adición de 0.8 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3 mM, y finaliza con la adición secuencial de 1.5 ml de catalasa (20 $\mu$ g/ml) y 2 ml de acetato sódico 0.2 M, pH 3, espaciados 3 min. Transcurrido éste tiempo, los viales son colocados en hielo. De este modo la enzima cataliza la oxidación de TMB por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con producción de un cromógeno azul que se mide a una absorbancia de 655 nm.

Los resultados se expresaron como unidad de actividad enzimática (U)/mg proteína.

### III.5.1.3- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD XANTIN-OXIDASA

Xantina oxidasa es una enzima productora de RLO. Cataliza la conversión de xantina a hipoxantina y ácido úrico como producto final de la reacción. Presenta dos isoformas: la forma oxidasa (XO) independiente de  $\text{NAD}^+$  que reduce el oxígeno molecular a superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y la forma deshidrogenasa (XDH) dependiente de  $\text{NAD}^+$ .

La actividad total de la enzima (XO+XDH) se valora cuantificando la producción de ácido úrico, para lo cual se miden los cambios de absorbancias, a 294 nm, en ausencia y presencia de  $\text{NAD}^+$  respectivamente (Devenyi y cols., 1987; Terada y cols., 1990). Estudios recientes valoran los cambios en XO originados por ciertos AINE (Yoshikawa y cols., 1998) (Figura 29).



*Figura 29-Reacciones de XO y XDH.*

#### *- Descripción de la técnica:*

El tejido mucosal gástrico se homogeniza en tampón TRIS 0.1 M que contiene además titriplex (EDTA) 10 mM, parafenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM, ditioneína (DTT) 1 mM y leupeptina 0.5 mg/L, como secuestradores de calcio, inhibidores de proteasas y estabilizadores de puentes disulfuros. Se centrifugan a 4.000g, 4°C, 30 min. Se toman 0.5 mL de sobrenadante que se hace pasar por una



columna cromatográfica en Sephadex (G-25) para eliminar inhibidores de bajo peso molecular. Del eluato recogido, se toman 200  $\mu\text{L}$  y se le adiciona 2.8 mL de tampón que contiene xantina 60  $\mu\text{M}$ , y se mide la absorbancia a 295 nm entre 0 y 10 min, frente al blanco correspondiente.

Una unidad de XO corresponde con la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de ácido úrico por minuto, expresándose los resultados como Unidad de actividad XO (U) / mg proteína.

#### III.5.1.4- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA

Superóxido dismutasa (SOD) es una enzima captadora de radicales libres, capaz de eliminar los radicales superóxido generados en los procesos oxidativos que acompañan al daño celular (Figura 30). Se localiza en el citosol extramitocondrial (dependiente de Cu/Zn), y en la mitocondria (dependiente de Mn). SOD convierte al anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$ .

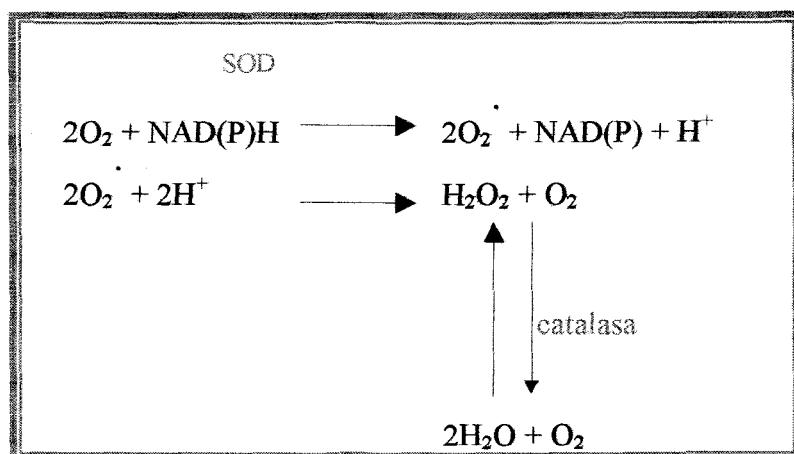
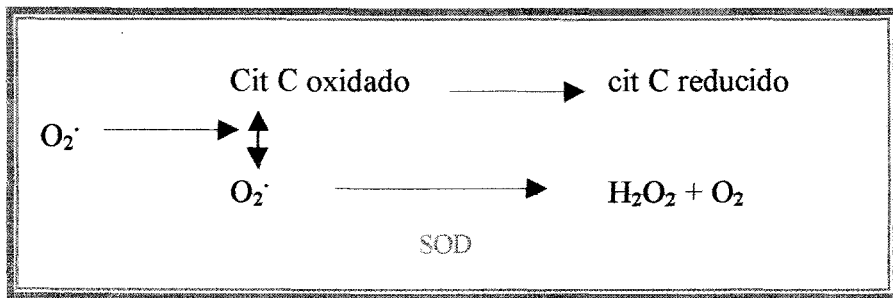


Figura 30.-Actividad de SOD

Se ha determinado esta actividad enzimática siguiendo el método propuesto de McCord y Fridovich (1969), basado en la capacidad del radical ( $O_2^{\cdot -}$ ) de reducir al citocromo C, y siendo ésta reacción inhibida por la SOD, que compite por los radicales ( $O_2^{\cdot -}$ ), llevando a cabo su dismutación. El grado de inhibición de la reducción del citocromo C es un indicador de la capacidad de acción de la enzima (Figura 31).



**Figura 31- Medida de citocromo C reducido como indicador de actividad de la enzima SOD.**

*- Descripción de la técnica:*

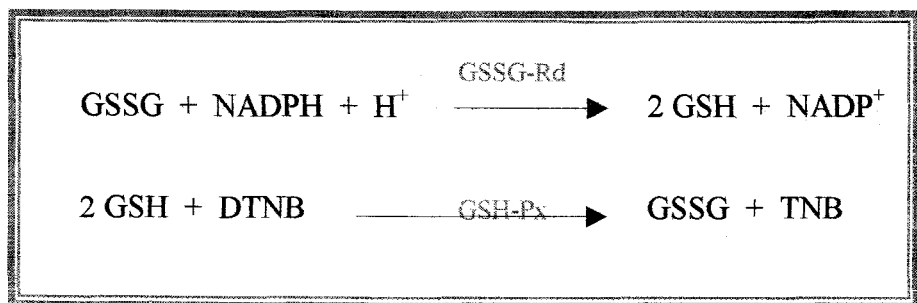
La mucosa es homogenizada en tampón fosfato 50 mM que contiene EDTA 0.1 mM y Tritón 0.1 % (1:150 p/v) pH 7.8. A una alícuota del homogenizado, 10  $\mu$ L, se le añaden secuencialmente, 680  $\mu$ L de tampón fosfato 50 mM, 100  $\mu$ L de cianuro potásico 5  $\mu$ M, 100  $\mu$ L de xantina 6.4 mM, 10  $\mu$ L de catalasa 1U, 100 $\mu$ L de citocromo C 0.1 M, y 10  $\mu$ L de xantina oxidasa (20U/mL en una dilución 1:3). Seguidamente y de forma rápida se agita, y se mide la absorbancia a 550 nm. En cada muestra se midió el incremento de absorbancia por minuto.

Los resultados se expresan como unidades de actividad enzimática (U) / mg proteína, definiéndose U como la cantidad de enzima que produce una inhibición del 50 % sobre la reducción del citocromo C.

### III.5.1.5- CAMBIOS EN EL METABOLISMO DEL GLUTATION

El glutatión (GSH) es un importante neutralizante de los radicales libres oxigenados, siendo su concentración muy alta en el estómago glandular si se compara con otras porciones del tracto gastrointestinal y otros órganos (Boyd y cols., 1979).

La enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) está involucrada en el metabolismo oxidativo, eliminando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos lipídicos. Está acoplada a la oxidación del glutatión (GSSG) molécula captadora de OH<sup>•</sup>, que a su vez puede ser reducido por la glutatión reductasa (GSSG-Rd) en presencia de NADPH (Figura 32). La medida de ambas enzimas, son un factor importante en el estudio del estrés oxidativo.



*Figura 32- Reacción de la GSSG-Rd*

### - Determinación de los niveles de glutatión total

La cuantificación de los niveles de glutatión se ha determinado siguiendo la metodología propuesta por Anderson y cols. (1985), basada en determinar la concentración del ácido 5,5'-ditiobis-2 nitrobenzoico reducido TNB presente en la muestra. En el tejido, GSH, se oxida totalmente a GSSG en presencia de DTNB, el cual se reduce dando coloración a 412 nm. Esta reacción requiere de un período de incubación. GSSG-Rd junto al cofactor NADPH, reduce el GSSG generándose glutatión reducido, GSH, cuya concentración determina la velocidad de reducción del DTNB.

#### - Descripción de la técnica:

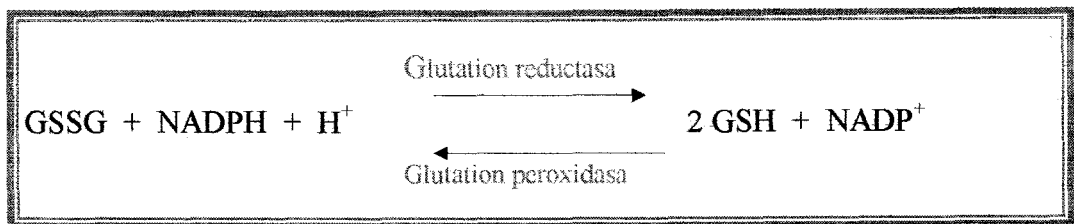
La mucosa gástrica es mantenida en ácido tricloroacético (TCA) 5 % p/v, en frío hasta su homogenización y centrifugación a 20.000g durante 10 min, 4°C. El sobrenadante recogido se vuelve a centrifugar a 9.000g, 5 min, 4°C, separándose el precipitado y conservando el nuevo sobrenadante que debe permanecer en frío hasta su determinación.

Para la medida espectrofotométrica, a 100 µL del mismo se van adicionando: 700 µL NADPH, 75 µL tampón fosfato y 100 µL DTNB, tras agitación e incubación en baño a 30°C durante 10 min se mide la absorbancia 412 nm. El comienzo de la reacción tiene lugar cuando se añade la enzima GSSG-Rd. La medida se realiza durante 3 min.

Los valores se expresan en nmol glutatión / min / g proteínas.

### - Estudio de la actividad glutatión peroxidasa

La enzima GSH-Px está acoplada a la oxidación del glutatión, jugando un papel importante en la eliminación de peróxidos de hidrógeno e hidroperóxidos lipídicos (Yoshikawa y cols., 1993) (Figura 33).



*Figura 33- Cambios asociados a la medida de la enzima glutatión peroxidasa.*

Para evaluar dicha actividad se ha seguido la metodología de Lawrence y Burk, (1976) basada en la disminución de la concentración de NADPH, con un descenso de la absorbancia a 365 nm en el tiempo de reacción.

#### - Descripción de la técnica

La mucosa, es homogenizada en 10 volúmenes de tampón constituido por fosfato monopotásico 0.1 M, hidróxido sódico 0.1 M y cloruro potásico 30 mM, pH 7.8. El homogenizado, es sonicado en frío (4°C) y centrifugado a 20000g, 20 min.

Para el análisis espectrofotométrico, a 100 µL de sobrenadante, se le añade 600 µL de tampón PEA, 100 µL de glutatión reducido 10 mM, 50 µL de NADPH 4 mM, 8 µL de GSH-Rd (equivalente a 1 U de actividad enzimática), y 182 µL de H<sub>2</sub>O destilada.

Se esperan 5 min y se inicia la reacción adicionando 100  $\mu$ L de  $H_2O_2$  0.25 mM, midiéndose el descenso de absorbancia a 365 nm durante 2 min

Los resultados son expresados como nmol NADPH / min / mg proteína.

### III.5.2- PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL EFECTO PROTECTOR DE L-ARGININA

#### III.5.2.1- TRATAMIENTOS CON DONADORES E INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS LESIONES.

El óxido nítrico (NO) es un mediador endógeno con un importante papel a nivel vascular. Se trata de una molécula liposoluble que difunde hasta las células musculares provocando vasodilatación, por activación de la enzima guanililciclasa y el consiguiente aumento de GMPc (Moncada y cols., 1991).

Algunos autores han utilizado L-arg para poner de manifiesto el papel del NO sobre la regulación de la integridad de la mucosa gástrica frente a diferentes modelos de úlcera (Ferraz y cols., 1994; Martín y cols., 1997). Sin embargo, D-arginina (D-arg), isómero dextro, biológicamente inactivo al no ser sustrato de la NOS, no se comporta como precursor (Brzozowski y cols., 1997).

En estos ensayos se han utilizado como fármacos de referencia:

- N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) es un análogo estructural de L-arg, que actúa como un inhibidor no selectivo de NOS (Brzozowski y cols., 1997).
- ° Aminoguanidina (AG) 0.4 mM/kg y N<sup>o</sup> -nitro-L-arginina (L-NNA) 0.2 mM/kg, actúan como inhibidores selectivos de NOS<sub>i</sub> y NOS<sub>c</sub> respectivamente. (Takakura y cols., 1997; Konturek y cols., 1993).

Diferentes grupos de animales recibieron L-NAME 0.15 mM/kg, AG 0.4 mM/kg y L-NNA 0.2 mM/kg, 15 min antes de la administración de IB 0.6 mM/kg e IB 0.6/L-arg 0.6 mM/). En todos los casos, los fármacos se prepararon en forma de suspensión extemporánea y se administraron vía i.p.

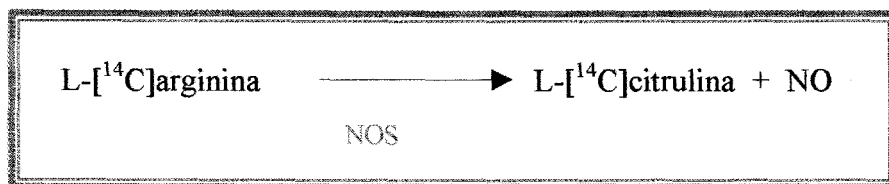
Los animales son sacrificados por inhalación de éter, se extraen los estómagos que se abren por la curvatura menor con el fin de cuantificar las lesiones gástricas.

Como molécula donadora de NO, hemos introducido mononitrato de isosorbida (MI).

### III.5.2.2-EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA.

El metabolito NO se genera tras la activación de la enzima NOS, que transforma L-arginina en NO y L-citrulina en presencia de una serie de cofactores (Tayeh y Marletta, 1989).

El experimento está basado en la cuantificar la formación de L-[<sup>14</sup>C]-citrulina a partir de L-[<sup>14</sup>C]-arginina, según proponen Knowles y cols., (1990) (Figura 34):



**Figura 34- Formación de NO a partir de la enzima NOS.**



*- Descripción de la técnica:*

La mucosa gástrica se homogeniza (1/4) en buffer pH=7.4 que contiene Trizma base 10 mM, DTT 1mM, EDTA-K 1mM, (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (THB), aprotinina (5-10 TIU/mL, actividad 3-7 TIU/mg proteína) y PMSF  $2 \cdot 10^{-4}$  mM. Seguidamente se centrifuga a 20.000g, 20 min, 4°C.

Se obtuvieron 3 alícuotas diferentes: la primera (solución problema) contiene, tampón de ensayo pH 7.4 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2 μM y L-arg 50 mM), NADPH 0.3 mM, L-valina 50 mM y -[<sup>14</sup>C]-L-arg (300mCi/mmol). La segunda solución (solución EGTA) se obtiene añadiendo EGTA 1mM, inhibidor de la NOSc, al actuar como quelante de Ca<sup>2+</sup>. La tercera (solución L-NAME) se prepara añadiendo a la solución problema L-NAME 1 mM, que inhibe la NOS en sus dos formas e indicándonos la actividad conjunta de todas las enzimas que pueden metabolizar el sustrato L-arg, excepto NOS.

A 40 μL del sobrenadante obtenido en la homogenización, se añaden 100 μL por separado de cada una de las tres soluciones anteriores, y se incuba en un baño de agua a 37 °C durante 1 h, para que se desencadene la reacción. El proceso se detiene por adición de agua a baja temperatura seguida de una suspensión 1:1 de resina Dowex en agua. La resina se deja depositar 30 min, y se toman 950 μL del eluato a los que se le añade 10 mL de líquido de centelleo, siendo posteriormente medidos en un contador β.

La medida nos permite determinar la totalidad de la actividad enzimática (NOST) y también la actividad parcial de la isoenzima NOSc. La actividad de NOSi se obtiene por diferencia entre las anteriores.

Para la determinación se utiliza como patrón positivo NOS, tejido cerebral de rata.

La actividad de la enzima se expresa en pmol / min / mg proteínas.

### III.5.2.3- MODIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE GMPc. RELACIÓN TIEMPO-EFECTO.

El nucleótido guanosín monofosfato cíclico (GMPc) está implicado en numerosos procesos de control en el metabolismo como mensajero intracelular en las acciones fisiológicas de numerosas hormonas como oxitocina, insulina, serotonina e histamina, si bien, destaca su participación consecuencia de la activación que el NO realiza sobre la enzima guanilato ciclasa (GC).

#### *- Descripción de la técnica:*

Se ha valorado según Steiner y cols (1973), siguiendo la técnica de radioinmunoanálisis, RIA, [Kit-DDV Diagnostika, Alemania].

Las muestras homogeneizadas en 1mL de TCA al 6 % v/v, se centrifugan a 2500g, 15 min. El sobrenadante se extrae 4 veces con 5 mL de H<sub>2</sub>O saturada de éter, descartando siempre la fase etérea. Finalmente, la fase acuosa es evaporada en un liofilizador y el residuo se disuelve en acetato sódico 0.05 M, pH 6.2, del cual se toman 100 µL para el inmunoensayo.

El principio de la técnica RIA está basado en la competencia que surge entre el analito existente en la muestra biológica y, otro marcado radioactivamente por sitios activos que se encuentran en un número limitado, sobre anticuerpos específicos. A mayor cantidad de compuesto en la muestra, menor unión del reactivo marcado al anticuerpo. Posteriormente, se procede a la separación de anticuerpos, de forma que el radiactivo es cuantificado mediante un contador gamma de centelleo.

El antígeno marcado es I<sup>125</sup> succiniltirosina-metiléster derivado de GMPc (I<sup>125</sup> ScGMP-TME), 0.75 µCi, en solución n-propanol-agua, reconstituido con suero normal de conejo 1%, y tampón acetato sódico 0.05 M pH 6.2.

En el inmunoensayo se añaden de forma consecutiva a 100 µL de muestra, 5 µL de reactivo acetilante (anhídrido acético y trietilamina 1/2), 100 µL de reactivo marcado I<sup>125</sup> ScGMP-TME y 100 µL de thimerosal. Se agita e incuba durante 16-18 h a 2-8 °C. Finalmente, se adiciona 1 mL de buffer acetato sódico con posterior centrifugación en frío 15 min a 2.000g. Se toma el sobrenadante y se procede a la medida en contador gamma.

Los resultados se expresan en pmol GMPc/ mg proteínas.

Con el fin de comprobar los cambios en el tiempo de los niveles de GMPc, diferentes grupos de animales se sacrificaron a distintos períodos de 30 y 90 min, 6 y 12 h.

#### III.5.2.4- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÁSTRICA DE LA ENZIMA NOS

##### - Expresión de mRNA de NOSi y NOSc

Este estudio nos permite el análisis cuantitativo de la expresión génica de ambas isoenzimas a partir del raspado mucosal y bajo condiciones limitadas de amplificación mediante RT-PCR (retrotranscripción y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa) (Liu y cols., 1994) (Figura 35).

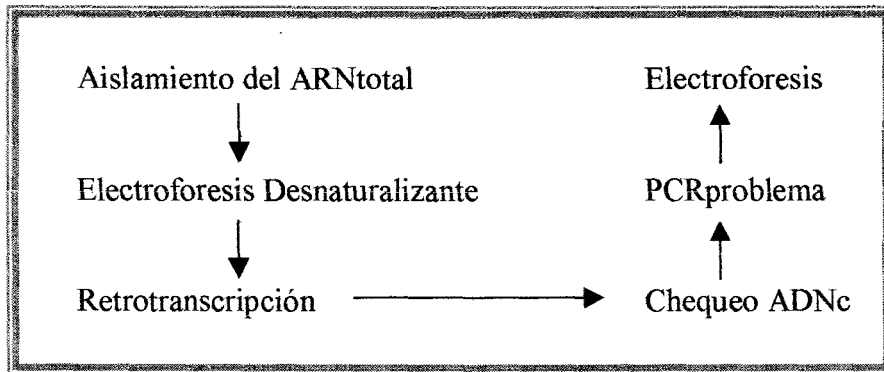


Figura 35- Esquema técnica RT-PCR.

Todo el proceso de extracción se realiza en ausencia de contaminación por ribonucleasas, para ello el material plástico y vidrio es tratado con dietilpirocarbamato (DEPC, 0.01% v/v) en agua destilada durante 4-6 h, seguido de un ciclo de autoclavado de 40 min a 120 °C con CO<sub>2</sub> y etanol, con el fin de degradar el DEPC (inhibidor de la actividad de determinadas enzimas, como ML-MLV retrotranscriptasa y Taq DNA polimerasa).

*- Descripción de la técnica:*

La extracción de ARN total se lleva a cabo en homogeneizados de mucosa gástrica tras fenolización ácida a 4°C en una solución de tiocianato de guanidinio 4 M, sarcosil 0.5% (p/v), citrato sódico 25 mM, (pH 7.0), y 2- betamercaptoetanol (BSH) 100 mM (Chomcynski y Sacchi, 1987). A continuación se añaden 0.1 v de acetato sódico 2 M (pH 4), 1 v de fenol (pH 4.0) saturado con H<sub>2</sub>O destilada y 2 v de cloroformo:isoamil (49:1), agitando vigorosamente durante 10 seg e incubándose durante 15 min a 4°C.

Tras una centrifugación de 20 min a 17000g, se recupera la fase acuosa (aprox. un 40 % del volumen inicial de partida), donde se encuentra soluble el ARN total. En pasos sucesivos purificamos las muestras de contaminaciones por proteínas y sales: a dicha fase, se le añade igual volumen de isopropanol (-20°C), agitando e incubando 60-

90 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ , centrifugándose la mezcla durante 20 min, 17000g y eliminándose el sobrenadante. El precipitado obtenido se lava a temperatura ambiente con 750  $\mu\text{L}$  de etanol  $85^{\circ}$  y se centrifuga 20 min, 17000g, resuspendiéndose con 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de ribonucleasas. Posteriormente se precipita con 0.1 v de acetato sódico 3 M, pH 5.2, y 2.5 v de etanol  $100^{\circ}$ . Se agita y se incuba durante 12 h a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En una tercera fase del ensayo, cuantificamos el ARN total obtenido: centrifugamos 20 min, 17000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ , eliminándose el sobrenadante y lavamos con 750  $\mu\text{L}$  de etanol ( $85^{\circ}$ ) a temperatura ambiente y se repite la operación anterior. Tras 10-20 min a temperatura ambiente para permitir la evaporación del etanol remanente, se resuspende en 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de ribonucleasas. La cuantificación se realiza midiendo la absorbancia a 260 nm (las proteínas presentan un máximo a 280 nm). De ésta forma el ARN puede ser cuantificado por espectrometría, suponiendo que un ARN de elevada calidad es aquel que presenta un cociente  $A_{260}/A_{280}$  entre 1.8-2.

Con el fin de conocer exactamente la calidad del ARN extraído, es necesario llevar a cabo un control de calidad adicional consistente en su visualización tras electroforesis desnaturalizante en presencia de formaldehído. Así, en un eppendorf se carga el volumen correspondiente a 10  $\mu\text{g}$  de ARN total y se lleva al evaporador durante 10 min a temperatura ambiente, quedando un residuo que se trata con una mezcla desnaturalizante formada por formaldehído 2.2M, formamida, MOPS 1X, tampón de carga y bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Se deja incubar durante 15 min a  $68^{\circ}\text{C}$  y pasado este tiempo se enfría rápidamente en hielo. Se aplica al gel de agarosa 1% y se deja correr a 90V, 90 min.

Finalmente por fotodocumentación, valoramos la calidad del ARN ribosómico 28S y 18S como índice de integridad del ARN total de la muestra.

Tras comprobar la integridad y homogeneidad de las muestras, procedemos a la síntesis de ADNc. Para ello se parte de 10  $\mu\text{g}$  de ARNt diluido en  $\text{H}_2\text{O}$  libre de ribonucleasa. La reacción de transcripción incluye: hexámeros dN6 (0.5 $\mu\text{g}$ ), dNTP (1 mM), DTT (20 mM) y tampón 5x (formado por 250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM  $\text{ClMg}_2$ , 50 mM DTT). Se deja 3 min a temperatura ambiente y añadimos 1  $\mu\text{L}$  retrotranscriptasaasa (200 U). Incubamos 60 min. Inactivar y deshibridar los heteroduplex de abrir ARN/ADN durante 5 min, 95 °C. Diluir con 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de ribonucleasas.

El diseño de los oligonucleótidos específicos 5' y 3' usados para el estudio de cada uno de los genes es el utilizado por otros investigadores en sistemas similares (McCafferty y cols., 1997). La reacción de retrotranscripción fue amplificada por PCR. Cargamos 4  $\mu\text{L}$  ADNc y 46  $\mu\text{L}$  de la correspondiente mezcla formada por tampón PCR 10 X,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  25 mM, dNTP 10 mM, Taq Pol (5 U/ $\mu\text{L}$ ) y 12.5 mM del correspondiente *primers* de NOSc, NOSi, y GADPH (10 mM, control de PCR). En el análisis se incluye también un blanco de retrotranscripción (sin ARN) y un blanco PCR (sin ADNc).

Las muestras se ponen en un termociclador cuyas condiciones: para NOSc: 5 min 94°C, 32x [ 1 min 94 °C, 1 min 45 seg 60°C, 1 min 45 sg 72 °C], 10 min 72 °C y para NOSi: 4min 94 °C, 28x [ 1 min 94 °C, 30'' 55°C, 1 min 72 °C], 5 min 72°C.

La evaluación de la amplificación se realiza por electroforesis en gel agarosa 2%, bromuro de etidio y luz ultravioleta.

### III.5.3- IMPLICACION DE LA ENZIMA CICLOOXIGENASA EN LOS MECANISMOS DESARROLLADOS

#### III.5.3.1- MEDIDA DE PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> MUCOSAL

Se han valorado los niveles PGE<sub>2</sub> por radioinmunoanálisis, RIA [PROSTAGLANDIN E<sub>2</sub> <sup>125</sup>I RIA KIT]. El antígeno marcado es [<sup>125</sup>I] PGE<sub>2</sub> trazador de concentración < 0.2 μCi, reconstituido en 10 mL de solución tampón BGG (0.01 M fosfato, 0.1% gamma globulina bovina y 0.1 % azida sódica, pH 7.0).

#### *- Descripción de la técnica:*

Se ha desarrollado según la técnica de Navarro y cols., (1988).

Las muestras de mucosa, recogidas en 500 μL de tampón TEAP, pH 3.2 y un inhibidor de la enzima ciclooxigenasa (acetilsalicilato de lisina, Inyesprin®), son homogenizadas y sonicadas. Posteriormente se centrifugan a 3.500g, 4°C, 15 min. Se separa una cantidad estándar de sobrenadante (400 μL), se añaden 3 v de acetona a -20°C y se agita cuidadosamente. Se vuelve a centrifugar en las condiciones descritas recogiendo todo el sobrenadante, al que se añaden 3 volúmenes de éter de petróleo. Después de agitar, se deja reposar 5 min, diferenciándose 2 fases de las cuales se separa la fase acuosa. Se acidifica con HCl, pH 3-4 y se añaden 1200 μL de etilacetato. De nuevo se produce separación y, la fase etilacetato se evapora con corriente de N<sub>2</sub>, quedando un precipitado blanco apenas visible, que es resuspendido con 500 μL de tampón BGG.

Para el inmunoensayo, se añaden 100 μL de muestra y 100 μL de antisuero (antiPGE<sub>2</sub>) incubándose durante 2 h a 4°C. Se adicionan 100 μL [<sup>125</sup>I] PGE<sub>2</sub> trazador,

volviéndose a incubar entre 16-24 h (4°C). Seguidamente, se añaden 500 µL Mag GAR (Magnetic Goat Anti-Rabbit), dejándose incubar la mezcla 20 min a temperatura ambiente y centrifugándose a 1000g, 15 min, 4°C. Sobre el precipitado resultante se cuantifica la concentración de PGE<sub>2</sub>.

Los resultados son expresados en ng PGE<sub>2</sub> / mg proteínas.

### III.5.3.2- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÁSTRICA DE LA ENZIMA COX

#### - Expresión de las proteínas COX-1 y COX-2

A muestras de mucosa gástrica se les ha valorado los niveles de expresión de proteína COX-1 y COX-2 mediante electroforesis en geles de dodecil sulfato sódico (SDS) / poliacrilamida y posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa (Towbin y cols., 1996), según protocolos estandarizados con pequeñas modificaciones (Rzo y cols., 1996) y análisis inmunológico, usando anticuerpos monoclonales específicos (Western-Blotting).

#### - Descripción de la técnica:

Las muestras son homogeneizadas en tampón HEPES 20 mM (pH 7.4) con bacitracina 0.02 % e inhibidores de proteasas (PMSF 400 mM, benzoamidina 1 M, pepstatina 1 mg/mL, TLCK 100 mM y aprotinina 100 mM). Se centrifugan a 12000 g, 10 min. Sobre una alícuota determinamos la concentración proteica correspondiente.

La separación proteica se realiza empleando geles SDS/poliacrilamida al 7.5 % en condiciones reductoras. Para la electroforesis, se prepara un gel de separación



(Running, pH 8.9) que nos permite la separación de las proteínas, y el gel de concentración (Stacking, pH 6.8), debido a estas diferencias de pH, las proteínas van a partir del mismo lugar. Se montan los cristales y se añade el gel de separación, una vez éste polimerizado, se añade el de concentración. Seguidamente, se cargan las muestras y se dejan 2-3 h a 15 mA constante.

El siguiente paso, es la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (2-3 h, 35V), que será teñida con “*rojo ponceau*” para comprobar la eficacia de la transferencia. Posteriormente, la utilización de leche en polvo al 5% en TTBS (1 mL Tween 0.1 %, 100 mL TBS 10x y 890 mL H<sub>2</sub>O) permite bloquear las posibles uniones no específicas. Se procede entonces, a la incubación con los anticuerpos primarios policlonales específicos COX-1 y COX-2 (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h, en agitación y a temperatura ambiente. La dilución utilizada es 1/2000. Tras sucesivos lavados en TTBS, se deja incubar con el anticuerpo secundario durante 1 h, en agitación y en una dilución 1/6000.

Finalmente, el relevado de los complejos antígeno-anticuerpo se hace por quimioluminiscencia (ECL).

En el ensayo se ha utilizado como control (39 KDa), un anticuerpo monoclonal agonista de la estructura  $\beta$ -actina.

### **III.6- ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.**

Los resultados han sido expresados como la media  $\pm$  error estándar. La significación de las diferencias entre los grupos ha sido evaluada utilizando el Test de Fisher's (Anova) y el Test-  $\chi^2$ .

#### **IV- RESULTADOS**

## IV.1- EFECTOS DE L-ARGININA SOBRE LAS LESIONES GÁSTRICAS INDUCIDAS POR IBUPROFENO

### IV.1.1- VALORACIÓN DEL DAÑO MACROSCÓPICO. RELACIÓN TIEMPO-EFECTO.

El examen de los estómagos una vez transcurrido el período experimental (6 h), demuestra que IB (0.3, 0.6 y 1.2 mM/kg) provoca un aumento progresivo y dosis-dependiente de las lesiones gástricas ( $\text{mm}^2$ :  $4.1 \pm 1.0$ ,  $17.9 \pm 2.7$  y  $66.4 \pm 9.2$ , Figura 36).

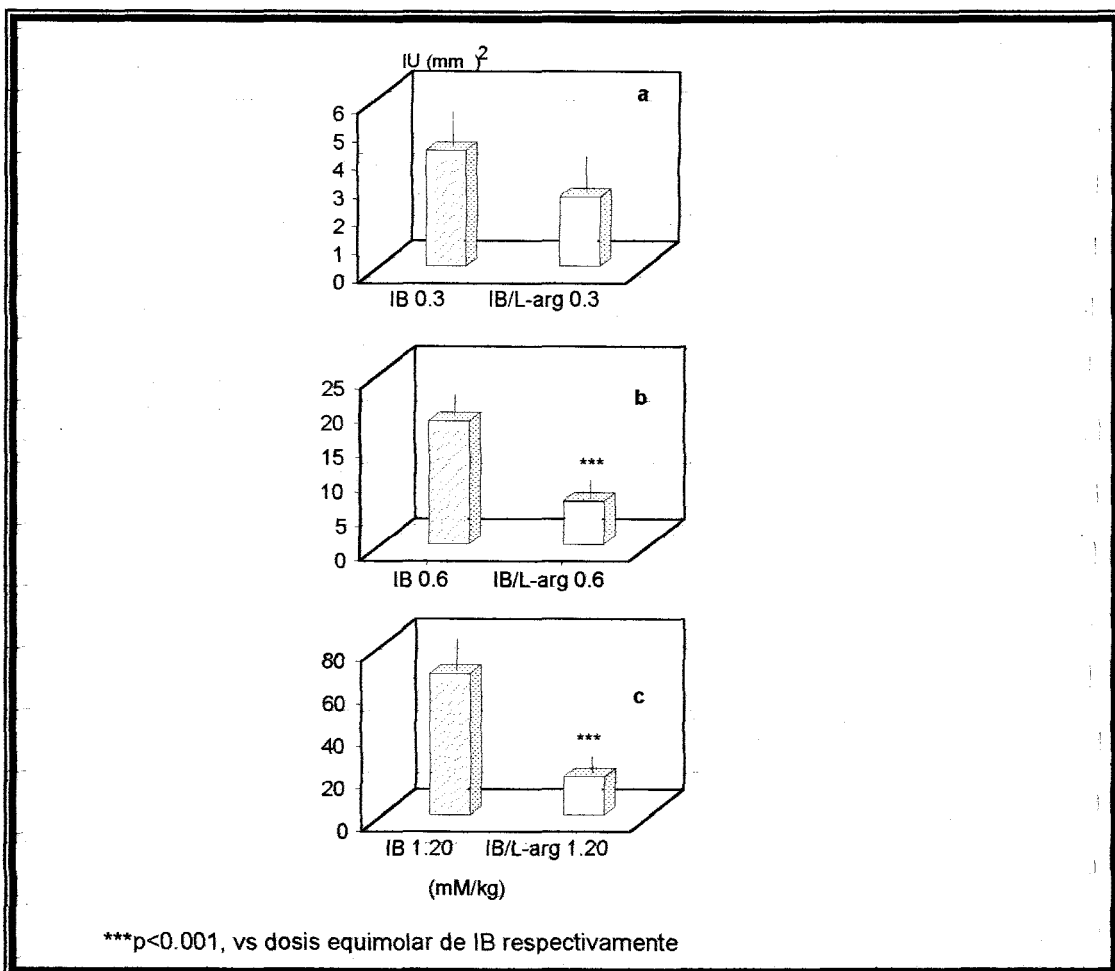


Figura 36- Efectos sobre el índice de ulceración ( $\text{mm}^2$ ) de IB/L-arg (0.3/0.3<sup>a</sup>, 0.6/0.6<sup>b</sup>, 1.20/1.20<sup>c</sup> mM/kg) vs dosis equimolar de IB después de 6 h de tratamiento

La administración oral de dosis equimolares de L-arg (IB/L-arg 0.3/0.3, 0.6/0.6 y 1.20/1.20 mM/kg), redujo considerablemente no sólo el índice de ulceración vs IB ( $p<0.001$ ), sino también el porcentaje de la mucosa dañada (59.8%, 35% y 27% respectivamente,  $p<0.001$ ) y el grado de hemorragia que descendió, desde un nivel moderado-severo con el AINE (IB 0.3 mM/kg:  $0.2\pm0.06$ , IB 0.6 mM/kg:  $1.0\pm0.1$ , IB 1.20 mM/kg:  $1.8\pm0.1$ ) hasta valores significativamente menores tras la administración simultánea de L-arg (IB 0.3/L-arg 0.3 mM/kg:  $0.1\pm0.04$ , IB 0.6/L-arg 0.6 mM/kg:  $0.3\pm0.1$ , IB 1.2/L-arg 1.2 mM/kg:  $0.2\pm0.1$ ,  $p<0.001$ ) (Tabla 5).

**Tabla 5: Protección gástrica de diferentes dosis de L-arginina (L-arg: 0.3, 0.6 and 1.20 mM/kg), en presencia de dosis equimolares de ibuprofeno (IB: 0.3, 0.6 and 1.20 mM/kg), después de 6 h del tratamiento.**

TRATAMIENTO (mM/kg)	HEMORRAGIA (escala)	SUPERFICIE ULCERADA (mm <sup>2</sup> )	DAÑO MUCOSAL (%)	ESTOMAGOS LESIONADOS/ TOTAL ESTOMAGOS EVALUADOS (%)	SUPERFICIE ULCERADA (escala)
<b>IB 0.3</b>	$0.2\pm0.06$	$4.1\pm1.0$	100	95	$2.2\pm0.2$
<b>IB 0.3/L-arg 0.3</b>	$0.1\pm0.04$	$2.5\pm0.7$	59.8	95	$1.9\pm0.2$
<b>IB 0.6</b>	$1.0\pm0.1$	$17.9\pm2.7$	100	100	$3.2\pm0.1$
<b>IB 0.6/L-arg 0.6</b>	$0.3\pm0.1$ ***	$6.3\pm1.3$ ***	35.2	100	$2.3\pm0.1$ ***
<b>IB 1.20</b>	$1.8\pm0.1$	$66.4\pm9.2$	100	100	$4.0\pm0.01$
<b>IB 1.20/L-arg 1.20</b>	$0.2\pm0.1$ ***	$17.9\pm4.2$ ***	27.1	95	$2.5\pm0.2$ ***

\*\*\*  $p<0.001$ , IB / L-arg vs dosis equimolar de IB (Test-Fisher).

El aspecto de las mucosas tras los distintos tratamientos, se ilustran en las figuras siguientes, en las que claramente se aprecian las lesiones sangrantes inducidas por IB (Figura 38) y la práctica ausencia de las mismas, en los animales que recibieron conjuntamente L-arg (Figura 39).

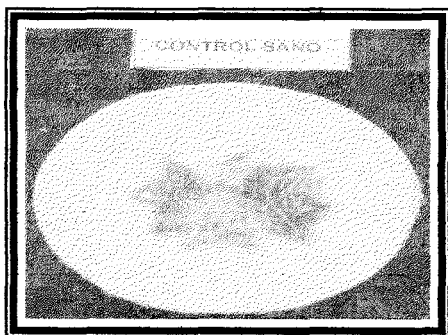


Figura 37- Mucosa gástrica de un animal que sólo ha recibido el vehículo.

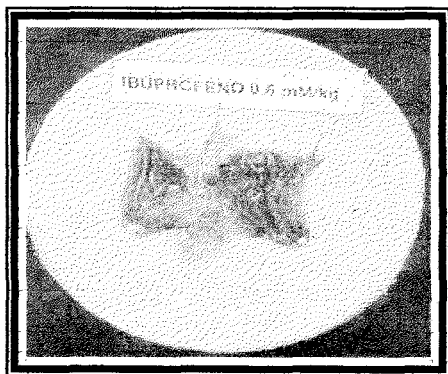
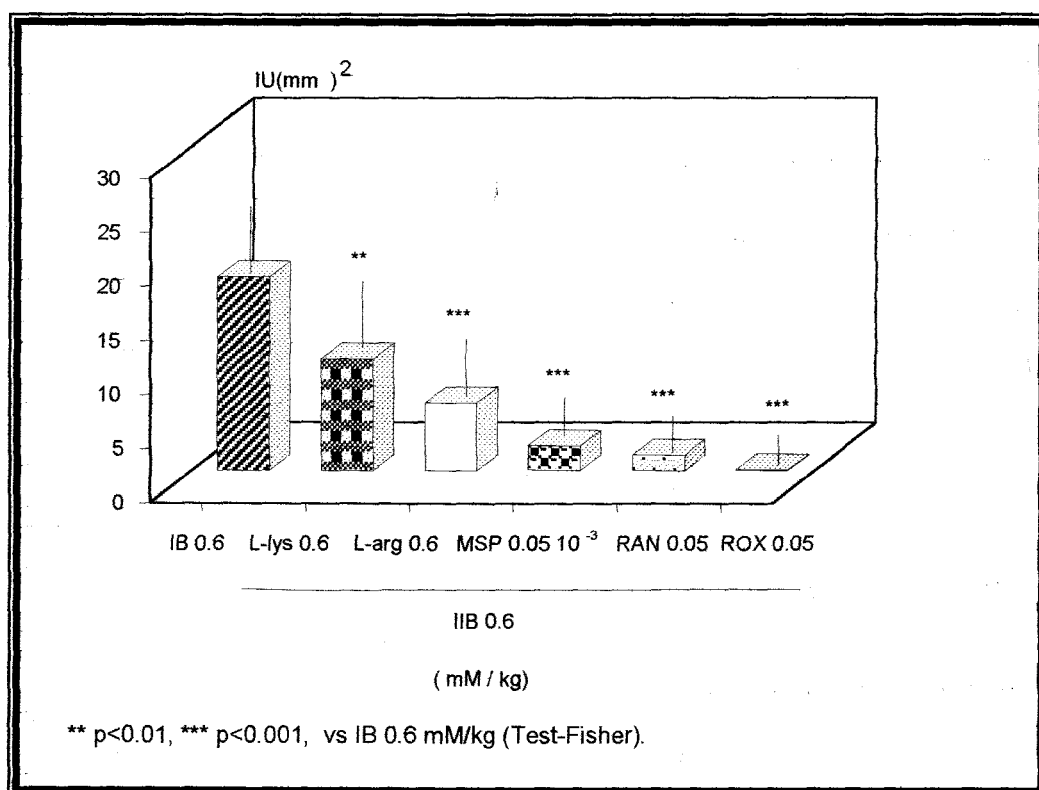


Figura 38- Aspecto de la mucosa gástrica de un animal tratado con IB 0.6 mM/kg, v.o. (después de 6 h).



Figura 39- Aspecto de la mucosa gástrica de un animal tratado con IB/L-arg 0.6/0.6 mM/kg, v.o. (después de 6 h).

El efecto gastroprotector del aminoácido (L-arg 0.6 mM/kg) fue comparable al de los fármacos utilizados como referencia, MSP, RAN, ROX y L-lys que administrados junto a IB disminuyeron claramente ( $p < 0.001$ ) el área de superficie ulcerada (IU,  $\text{mm}^2$ ) provocada por el AINE (Figura 40). La eficacia de L-arg también fue similar a la de los antiulcerosos ensayados, en la disminución de la escala de hemorragia ( $p < 0.001$ , Tabla 6).



**Figura 40- Efectos protectores de L-arg (0.6 mM/kg), MSP (0.05·10<sup>-3</sup> mM/kg), RAN (0.05 mM/kg), ROX (0.05 mM/kg) y L-lys (0.6 mM/kg) vs IB (0.6 mM/kg). Tiempo de tratamiento, 6 h.**

**Tabla 6: Efectos de diferentes tratamientos protectores en presencia de Ibuprofeno (IB 0.6mM/kg): L-arginina (L-arg 0.6mM/kg), Ranitidina (RAN 0.05 mM/kg), Roxatidina (ROX 0.05 mM/kg), Misoprostol (MSP 0.05·10<sup>3</sup> mM/kg) y L-lisina (L-lys 0.6 mM/kg) . Tiempo transcurrido desde la administración de los fármacos, 6 h.**

TRATAMIENTO (mM/kg)	HEMORRAGIA (escala)	SUPERFICIE ULCERADA (mm <sup>2</sup> )	DAÑO MUCOSAL (%)	ESTOMAGOS LESIONADOS/ TOTAL ESTOMAGOS EVALUADOS (%)	SUPERFICIE ULCERADA (escala)
IB 0.6	1.0±0.1	17.9±2.7	100	100	3.2±0.1
IB 0.6/ L-arg 0.6	0.3±0.1 ***	6.3±1.3 ***	35.2	100	2.3±0.1 ***
IB 0.6/ MSP 0.05 10 <sup>-3</sup>	0.1±0.06 ***	2.3±0.8 ***	12.6	89.5	1.9±0.2 ***
IB 0.6/ RAN 0.05	0.1±0.05 ***	1.4±0.6 ***	8.0	68.4 +	1.5±0.3 ***
IB 0.05/ ROX 0.05	0.1±0.02 ***	0.1±0.07 ***	0.8	66.7 +	1.0±0.3 ***
IB 0.6/ L-lys 0.6	0.6±0.2 ***	10.33±3.3 ***	57.8	100	4.2±0.5 ***

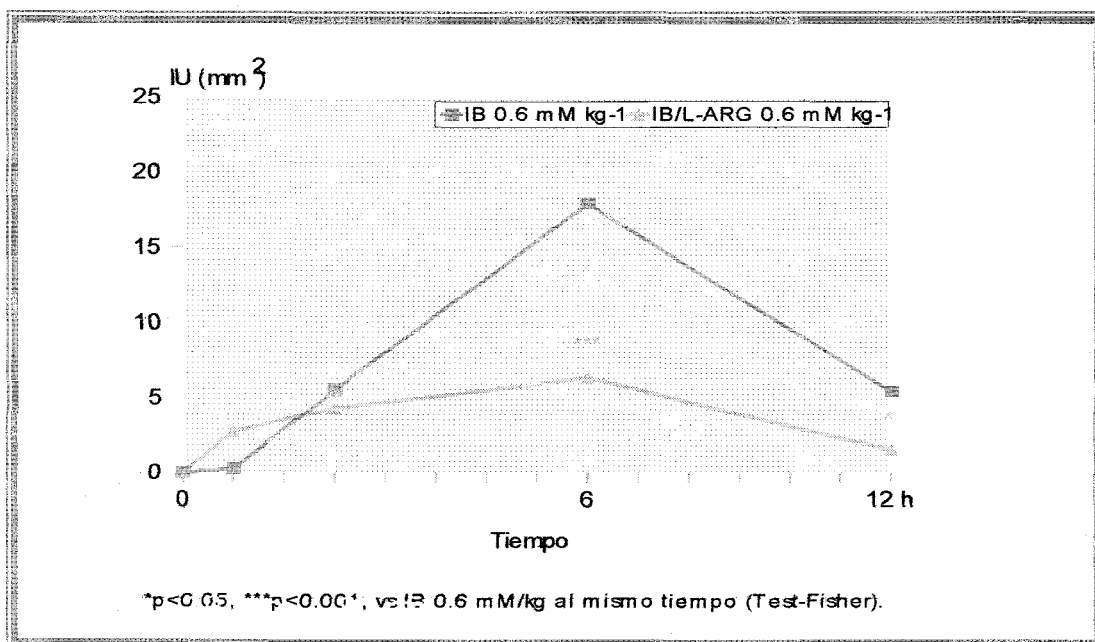
\*\*\*p<0.001, vs IB 0.6 mM/kg (Test-Fisher).

+p<0.01, vs IB 0.6 mM/kg,  $\chi^2$  test.



Sin embargo, a diferencia de ellos, la totalidad de los estómagos examinados, presentaron lesiones macroscópicas (100%), sí bién, la mayor parte de ellas eran muy débiles. El mismo resultado se observó cuando el tratamiento se realizó con el aminoácido L-lys, si bién en este caso el daño fue de mayor calibre, como puede apreciarse tanto por los valores de IU ( $\text{mm}^2$  y escala), como por el grado de hemorragia (Tabla 6, Figura 40)

La evolución en el tiempo del efecto lesivo de la dosis seleccionada de IB (0.6 mM/kg), se muestra en la Figura 41. El máximo daño aparece después de 6 h de la ingesta del fármaco ( $17.9 \pm 2.7 \text{ mm}^2$ ) y al mismo tiempo también se observa la protección más alta de L-arg ( $6.3 \pm 1.3 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0.001$ ). Aunque el IU producido por IB es menor transcurridos 12 h, se mantiene el efecto protector de L-arg ( $p < 0.05$ ).



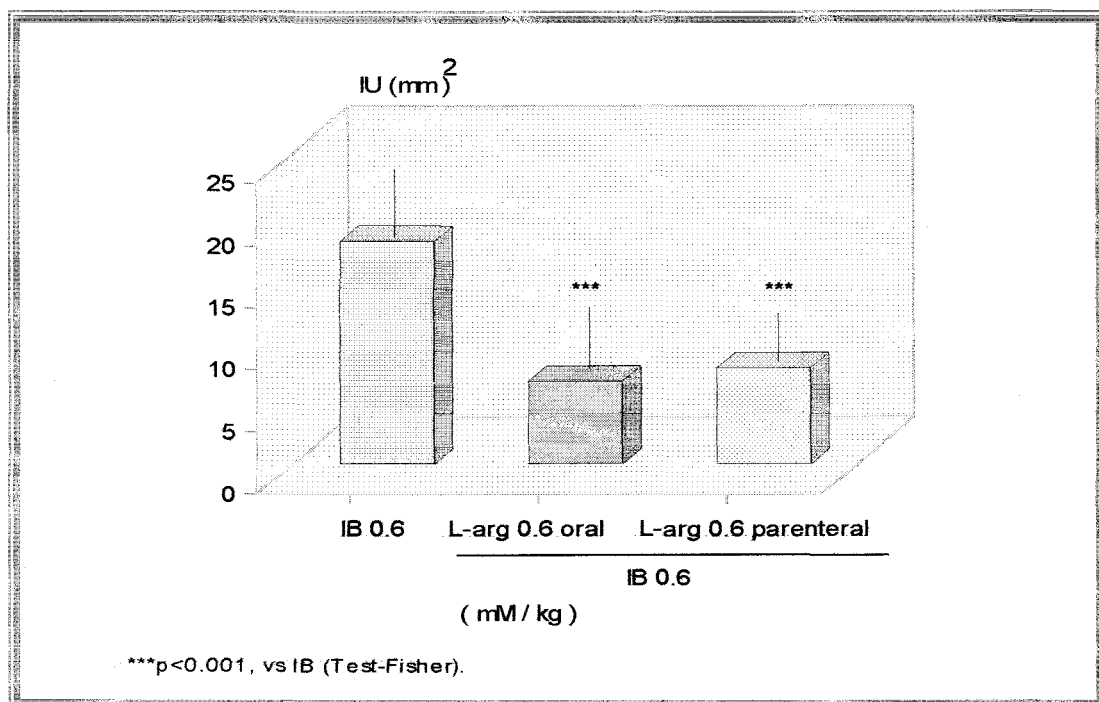
**Figura 41- Efectos sobre el índice de ulceración (IU,  $\text{mm}^2$ ) de IB 0.6/L-arg 0.6 mM/kg vs IB 0.6 mM/kg después de 30 y 90 min, 6 y 12 h de tratamiento.**

No se produce variaciones en ninguno de los parámetros evaluados cuando se administra L-arg vía parenteral (Tabla 7), manteniéndose el efecto protector independientemente de la vía de administración (Figura 42).

**Tabla 7: Efectos de L-arg (0.6 mM/kg) tras su administración oral y parenteral, sobre el daño gástrico producido por dosis equimolares de IB, después de 6 h de tratamiento.**

TRATAMIENTOS (mM/kg)	HEMORRAGIA (escala)	SUPERFICIE ULCERADA (mm <sup>2</sup> )	DAÑO MUCOSAL (%)	ESTOMAGOS LESIONADOS/ TOTAL ESTOMAGOS EVALUADOS (%)	SUPERFICIE ULCERADA (escala)
Control sano	-	-	-	-	-
IB 0.6	1.0±0.1	17.9±2.7	100	100	3.2±0.1
IB 0.6/L-arg 0.6 Oral	0.3±0.1 ***	6.6±2.3 ***	35.2	100	2.3±0.1 ***
IB 0.6/L-arg 0.6 parenteral	0.3±0.1 ***	7.7±1.2 ***	39.4	100	2.0±0.1 ***

\*\*\* p<0.001, vs IB 0.6 mM/kg (Test-Fisher).



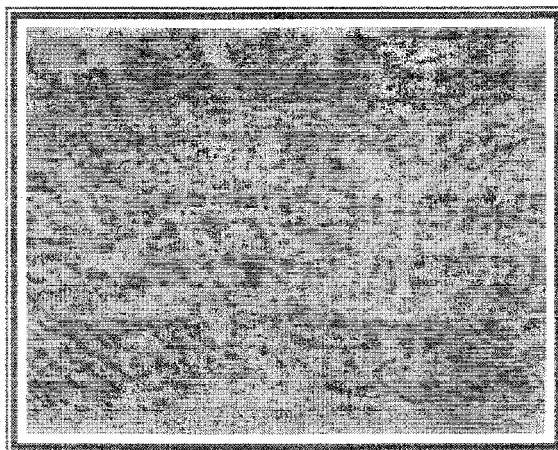
*Figura 42- Efectos de L-arg (0.6 mM/kg) tras su administración oral o parenteral, sobre el daño gástrico vs IB (0.6 mM/kg) después de 6 h de tratamiento.*

#### IV.1.2- VALORACIÓN DEL DAÑO MICROSCÓPICO

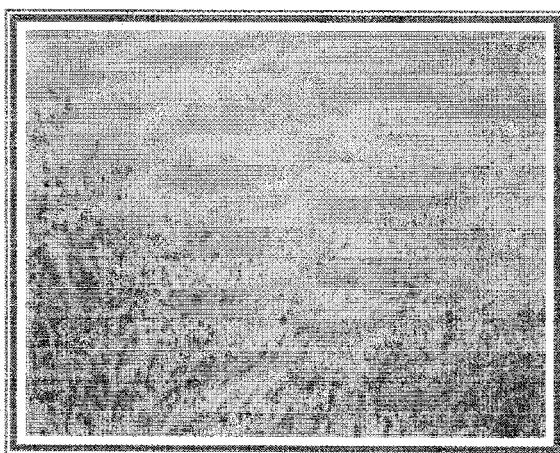
El examen histomorfométrico de las mucosas de los animales tratados confirman los resultados macroscópicos. Transcurridas 6 h de la administración de IB (0.6 mM/kg) se aprecia un daño severo con importante reducción de la capa mucosal, que en algunos casos llega a ser completa (Figura 44, preparación valorada con grado 2), contrastando claramente el aspecto de la misma con la de un animal control (Figura 43).

La administración conjunta de IB/L-arg (0.6/0.6 mM/kg) protege del daño, observándose lesiones de menor intensidad que sólo afectan la capa más externa de la glándula gástrica, con un grado de descamación de células mucosecretoras correspondiente a valor 1 de la escala utilizada (Figura 45).

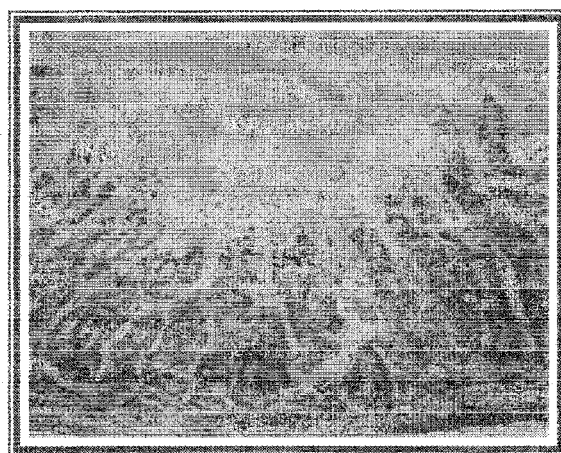
En ninguno de los grupos analizados, pudimos encontrar afectación de la muscularis mucosa que conserva intacto el lecho vascular (Figuras 46 y 47).



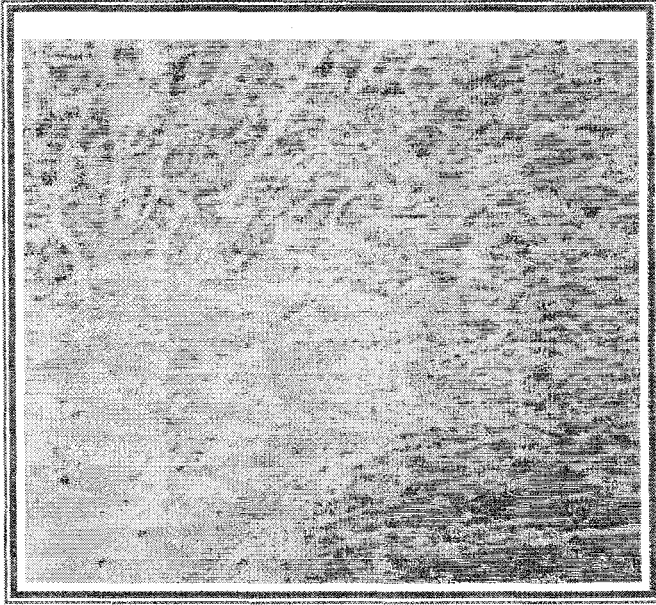
*Figura 43- Mucosa gástrica intacta de rata, zona corpus (H/E, 100x).*



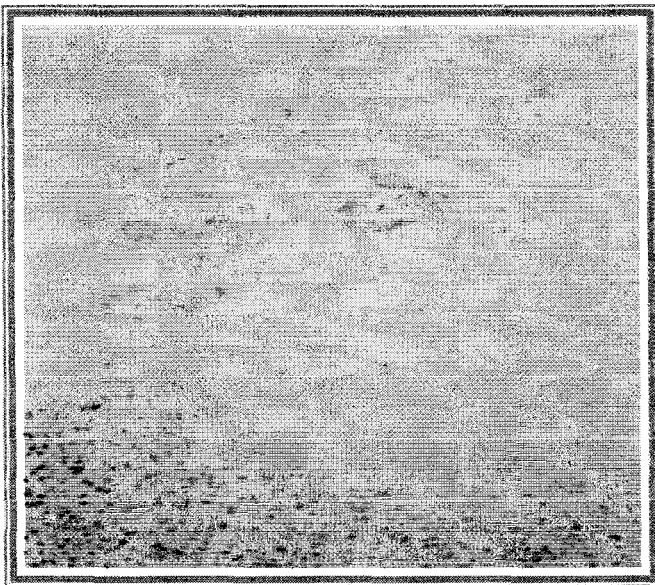
*Figura 44- Lesión de grado 2 según la escala propuesta (IB 0.6 mM/kg). (H/E, 100x)*



*Figura 45- Lesión de grado 1 según la escala propuesta (IB/L-arg 0.6/0.6 mM/kg). (H/E, 100x)*



*Figura 46- Detalle de los vasos localizados en la muscularis mucosa  
(IB 0.6/L-arg 0.6 mM/kg). H/E, 100x*



*Figura 47- Ampliación del detalle de los vasos de la figura 46.*

#### IV.2- MODIFICACIONES INDUCIDAS POR IBUPROFENO Y L-ARGININA SOBRE EL METABOLISMO OXIDATIVO DE LA MUCOSA GÁSTRICA.

La Tabla 8 compara la actividad MPO como índice de infiltrado neutrofílico en muestras de mucosa de animales control, con las obtenidas después de diferentes tratamientos: IB (0.3 y 0.6 mM/kg), L-arg (0.6 mM/kg) e IB/L-arg (0.3/0.3 y 0.6/0.6 mM/kg).

Las medidas obtenidas transcurrido el período experimental, 6 h, revelan que el aminoácido no modifica la actividad enzimática, pero ésta sí aumentó significativamente tras la administración de IB ( $p < 0.05$ ), sin diferencias entre las dosis ensayadas. Este incremento del infiltrado neutrofílico no fué inhibido con la administración simultánea de L-arg.

*Tabla 8- Efectos de IB (0.3, 0.6 mM/kg), L-arg (0.6 mM/kg) e IB/L-arg (0.3/0.3 y 0.6/0.6 mM/kg) sobre la actividad MPO después de 6 h de tratamiento.*

TRATAMIENTOS (mM/kg)	MPO (U/mg prot)x10 <sup>-2</sup>	MPO (%)
Control sano	19.0±1.2	99.9
L-arg 0.6	20.0±2.7	107.4
IB 0.3	29.1±2.3 *	192.4
IB 0.6	28.1±2.7 *	182.4
IB/L-arg 0.3	28.0±2.3 *	179.9
IB/L-arg 0.6	32.0±3.0 *** &	194.8

\*  $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , vs control (Test-Fisher)  
&  $p < 0.05$ , vs L-arg 0.6 mM/kg (Test-Fisher).

Los resultados obtenidos revelan que no existe correlación entre el IU inducido por IB y el infiltrado inflamatorio de la mucosa (Figura 48). Mientras el primero es dosis-dependiente, no se observan variaciones de la actividad enzimática en relación a la dosis. El tratamiento con IB/L-arg, si bien indujo un descenso significativo de la totalidad de superficie gástrica ulcerada, siguió sin provocar modificaciones patentes sobre la actividad neutrofílica.

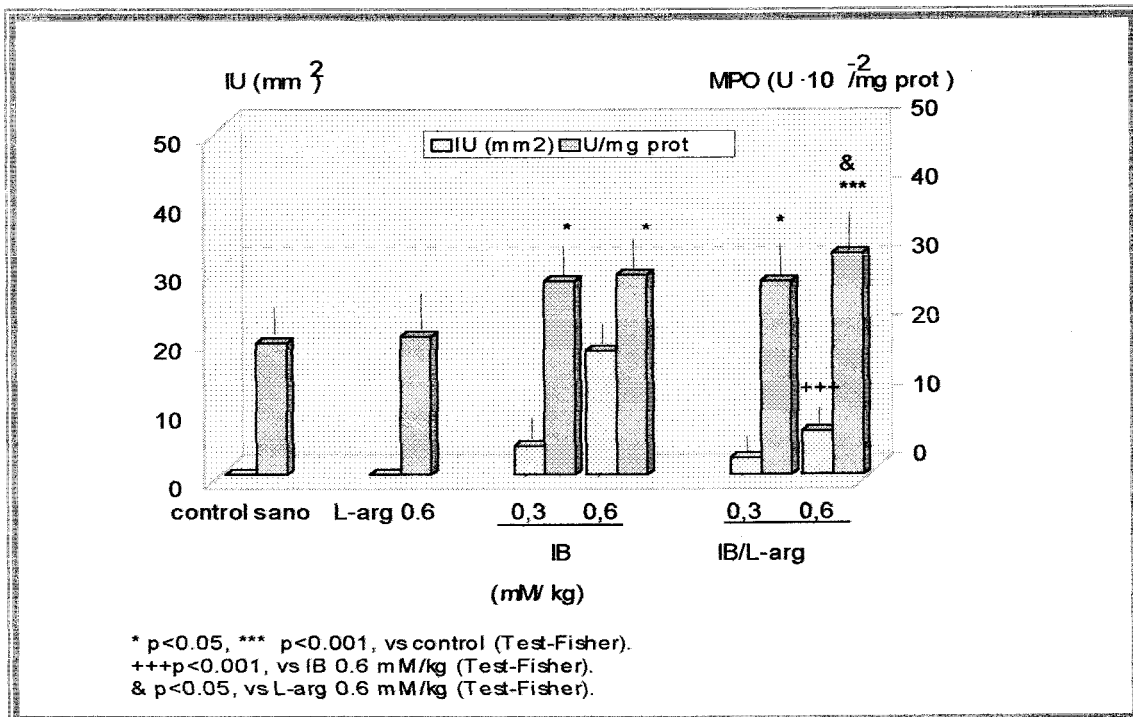


Figura 48- Efectos sobre el índice de ulceración (IU, mm<sup>2</sup>) y la actividad mieloperoxidasa (MPO) de IB/L-arg (0.3/0.3 y 0.6/0.6 mM/kg) vs dosis equimolares de IB, después de 6 h de tratamiento



La concentración de MDA en mucosa, como índice de peroxidación lipídica, aumentó de forma manifiesta en el grupo que recibió IB 0.6 mM/kg ( $p < 0.05$ , Figura 49). Sin embargo, en los estómagos de los animales tratados solamente con el aminoácido (L-arg 0.6 mM/kg) se pudo apreciar un descenso de lipoperóxidos ( $p < 0.001$ ) que también se encontró en el grupo IB/L-arg (0.6/0.6 mM/kg) en el que el aminoácido claramente revierte la respuesta inducida por el AINE ( $p < 0.001$  vs IB).

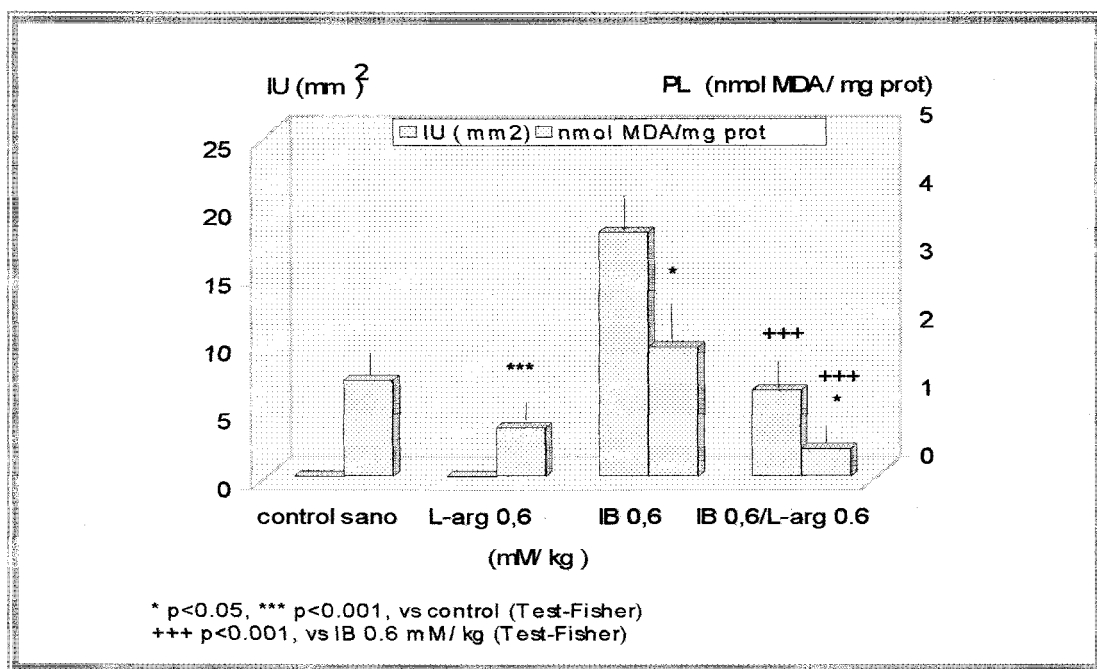
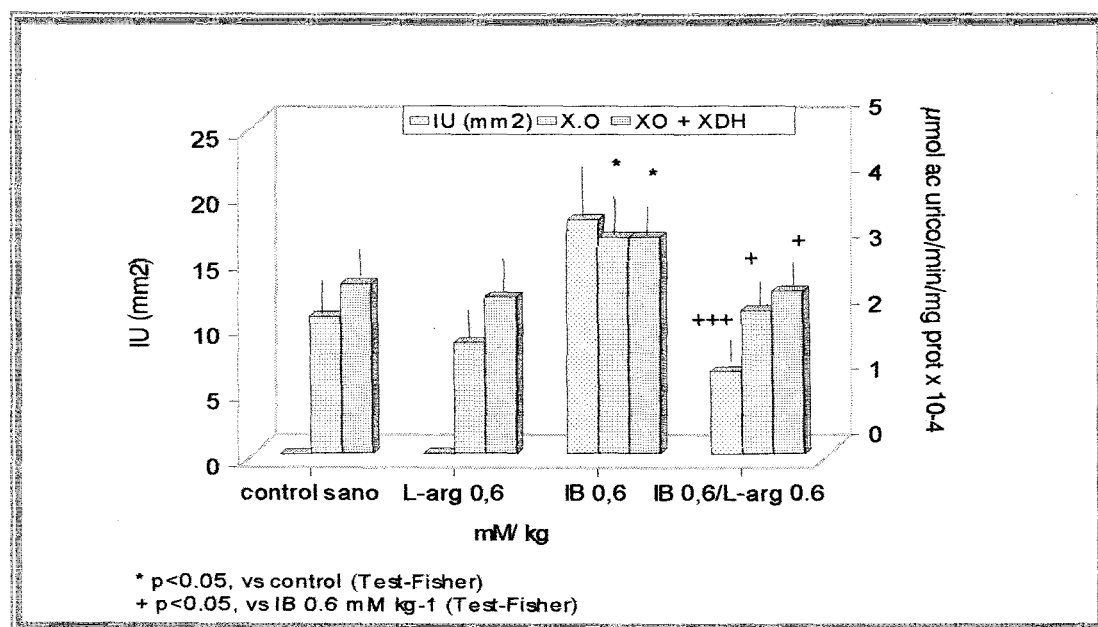


Figura 49- Índice de ulceración (IU, mm<sup>2</sup>) y efectos sobre la peroxidación lipídica (PL) en mucosa gástrica tras 6 h de tratamiento.

La medida de la concentración de ácido úrico, producto final de la actividad XO, también puso de manifiesto que IB induce un incremento significativo de la actividad enzimática con respecto a los animales control ( $p < 0.05$ , Figura 50). Aunque el grupo tratado únicamente con L-arg no modifica los valores normales, la administración conjunta de ambos agentes, IB/L-arg, revierte significativamente ( $p < 0.05$ ) el resultado de IB.

En este caso se produce una correlación directa entre aumento del daño y de la actividad tanto XO como la total del sistema XO/XDH.



**Figura 50- Efectos de IB 0.6/L-arginina 0.6 mM/kg sobre el índice de ulceración (IU, mm<sup>2</sup>) y las actividades de las enzimas xantina oxidasa (XO) y xantina deshidrogenasa (XDH) tras 6 h de tratamiento.**

En la Tabla 9, que recoge todos los parámetros relacionados con el *estrés oxidativo*, se puede apreciar como el incremento de PL asociado al tratamiento con IB, puede ser debido a una mayor producción de RLO derivados de los neutrófilos (aumento de la actividad MPO) y de la vía xantina-XO (aumento de la concentración de ácido úrico). Sin embargo, la administración simultánea de L-arg induce una caída de lipoperóxidos ( $p<0.001$ ) que se puede relacionar con la inhibición de la respuesta isquémica inducida por el AINE (inhibición de la actividad XO,  $p<0.05$ ), pero sin disminuir la actividad de la enzima MPO asociada a la estimulación de los PMN.

**Tabla 9: Efecto de L-arg (0.6 mM/kg), IB (0.6 mM/kg) y de la administración simultánea de ambos (IB/L-arg 0.6/0.6 mM/kg) sobre los niveles de peroxidación lipídica (PL), actividad xantina oxidasa (XO) y mieloperoxidasa (MPO), después de 6h de tratamiento.**

TRATAMIENTOS (mM/kg)	PL mol MDA / mg prot	XO $\mu\text{mol uric ac. / min / mg prot} \times 10^{-4}$	MPO U/ mg prot $\times 10^{-2}$
Control sano	1.4 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.2	19.0 $\pm$ 1.2
L-arg 0.6	0.7 $\pm$ 0.1 ***	1.7 $\pm$ 0.1	20.0 $\pm$ 2.7
IB 0.6	1.9 $\pm$ 0.6 *	3.3 $\pm$ 0.4 *	28.0 $\pm$ 2.7 *
IB/L-arg 0.6	0.4 $\pm$ 0.1 * +++	2.2 $\pm$ 0.2 +	32.0 $\pm$ 3.0 **

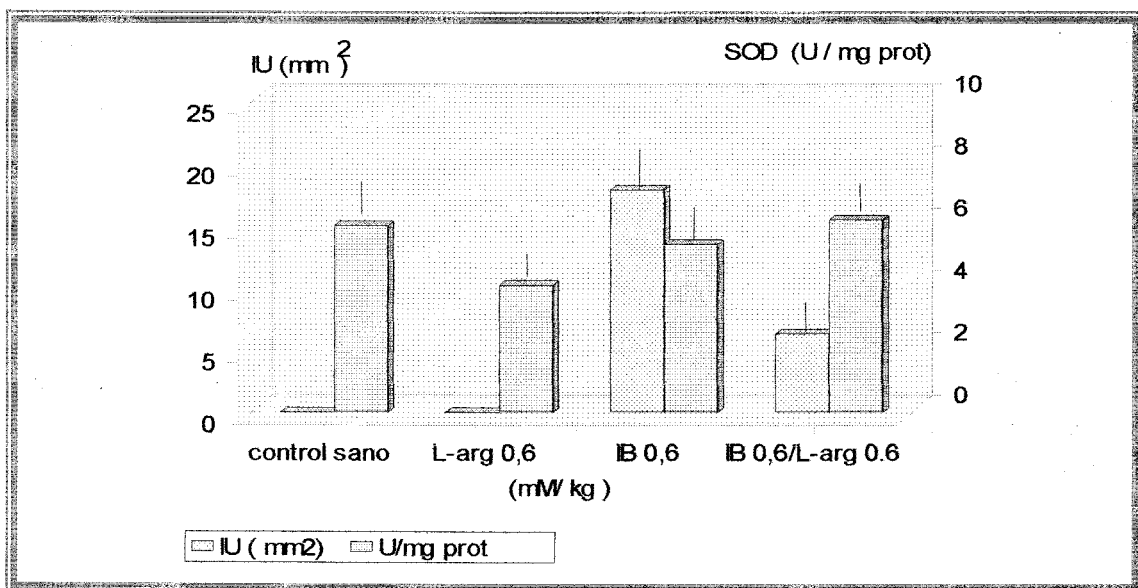
\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , vs control (Test-Fisher).

+ $p<0.05$ , +++ $p<0.001$ , vs IB 0.6 mM/kg (Test-Fisher).

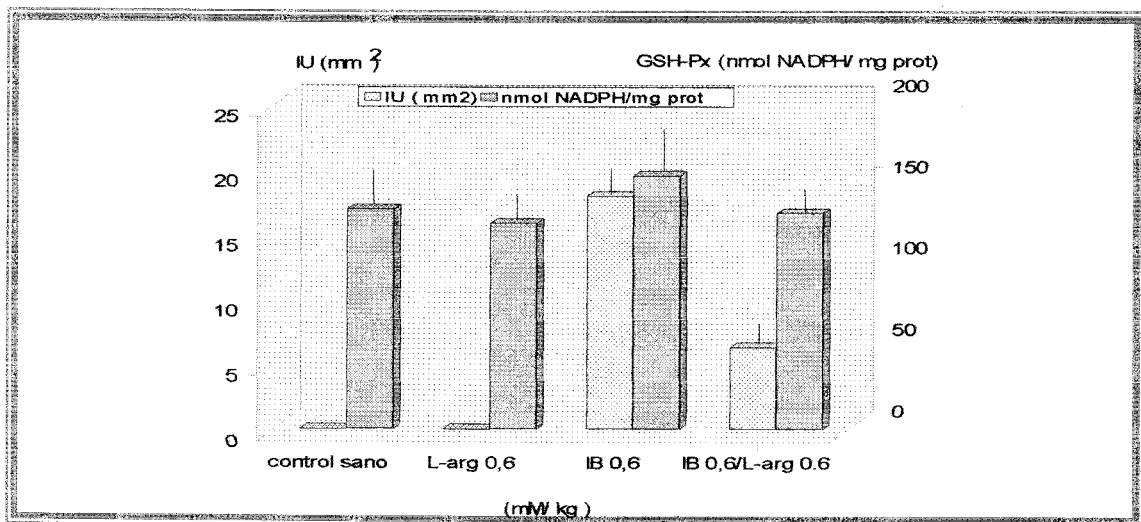
Respecto a los efectos de los tratamientos sobre la actividad de los agentes antioxidantes endógenos evaluados (enzima SOD y GSH-Px, y GSht), ninguna de las dosis administradas indujeron cambios manifiestos (Tabla 10, Figura 51). Si bien, IB provoca un incremento de la actividad GSH-Px, respecto al grupo control y al tratado con L-arg, dicho aumento no fue significativo (Figura 52)

*Tabla 10: Efectos de L-arg (0.6 mM/kg), IB (0.6 mM/kg) e IB/L-arg (0.6/0.6 mM/kg) sobre la concentración mucosal de glutatión total (GSht), actividad glutatión peroxidasa (GSH-Px) y superóxido dismutasa (SOD).*

TRATAMIENTO (mM/kg)	GSht nmol GSH/mg prot	GSH-Px nmol NADPH/min/mg prot	SOD U/mg prot
Control sano	6.9±1.9	134.9±15.2	6.0±1.0
L-arg 0.6	10.2±1.5	126.6±15.7	4.1±0.3
IB 0.6	8.6±2.5	155.8±18.0	5.4±0.9
IB/L-arg 0.6	7.5±1.1	132.9±10.6	6.2±0.4



**Figura 51- Efectos sobre el índice de ulceración (IU, mm<sup>2</sup>) y la actividad superóxido dismutasa (SOD) tras 6 h de tratamiento**



**Figura 52- Efectos sobre el índice de ulceración (IU, mm<sup>2</sup>) y la actividad glutatión peroxidasa (GSH-Px) tras 6 h de tratamiento.**

### IV.3- IMPLICACIONES DEL ÓXIDO NITRICO EN EL EFECTO PROTECTOR DE L-ARGININA

#### IV.3.1- RESPUESTA ANTE DONADORES E INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE ÓXIDO NITRICO. VALORACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS LESIONES

El tratamiento con D-arg (0.6 mM/kg), precursor no activo en la síntesis de NO, no produce efectos destacables en los resultados obtenidos tras la valoración macroscópica; los valores de IU ( $\text{mm}^2$ ) son del mismo rango que los observados para IB sólo (Figura 53).

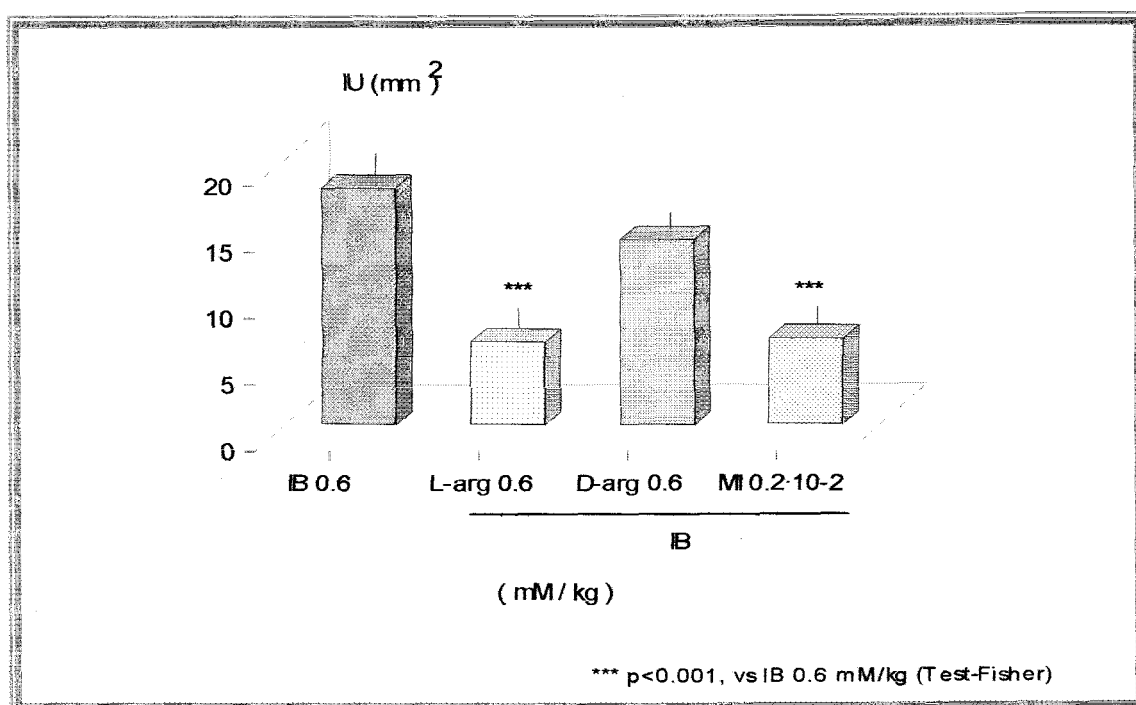
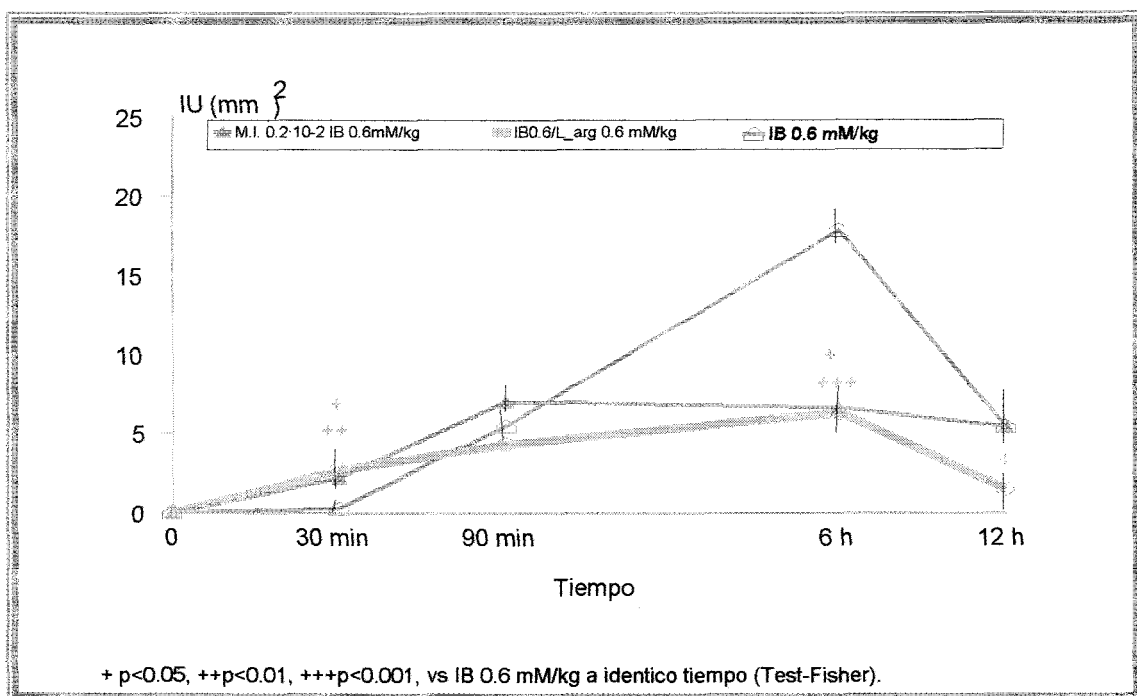


Figura 53- Cambios observados en la superficie ulcerada (IU,  $\text{mm}^2$ ) después de 6 h de tratamientos: D-arg (0.6 mM/kg) y MI (0.2-10<sup>2</sup> mM/kg) frente a los obtenidos con L-arg (0.6 mM/kg). Todos fueron aplicados v.o. al mismo tiempo que IB (0.6 mM/kg).

MI ( $0.2 \cdot 10^{-2}$  mM/kg) utilizado como fármaco de referencia, por su capacidad donadora de NO, provocó una reducción significativa en los valores de ulceración igualando los obtenidos con L-arg ( $p < 0.001$ ).

Los tratamientos realizados a diferentes tiempos nos permitieron valorar cambios importantes en la superficie ulcerada. Tanto MI  $0.2 \cdot 10^{-2}$  mM/kg como IB 0.6/L-arg 0.6 mM/kg mostraron un efecto protector a partir de los 90 min, y siendo máximo tras 6 h de la administración ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$  vs IB 0.6 mM/kg) (Figura 54).



**Figura 54-** Valores de superficie ulcerada (IU, mm<sup>2</sup>) obtenidos con IB/L-arg (0.6/0.6 mM/kg) y MI ( $0.2 \cdot 10^{-2}$  mM/kg) vs IB (0.6 mM/kg) en los diferentes tiempos estudiados (30 y 90 min, 6 y 12 h).

En la Tabla 11 mostramos los resultados obtenidos tras los diferentes pre-tratamientos con agentes que presentan capacidad inhibitoria selectiva de las diferentes isoformas de NOS. En el estudio hemos valorado los cambios macroscópicos, según los tiempos seleccionados (90 min y 6h), que provocan AG (molécula inhibidora selectiva de NOS<sub>i</sub>, 0.4mM/Kg), L-NNA (inhibidor preferente de NOS<sub>e</sub>, 0.2 mM/Kg) y L-NAME (inhibidor no selectivo de ambas, 0.15 mM/Kg). Todos los tratamientos, 6 h después de su administración, causaron un ligero descenso de la superficie total lesionada, siendo la aplicación conjunta de L-arg quién mantuvo las características protectoras observadas, aunque diferencias estadísticamente significativas sólo aparecieron tras 6 h de tratamiento (Figura 55).

Es interesante mencionar que, sin haberse modificado el valor de IU expresado como superficie total lesionada (mm<sup>2</sup>), en todos los grupos de animales tratados con L-NNA, la apariencia general de estas mucosas coincidía con un aspecto macroscópico alterado con intensa hiperemia y edema asociado.



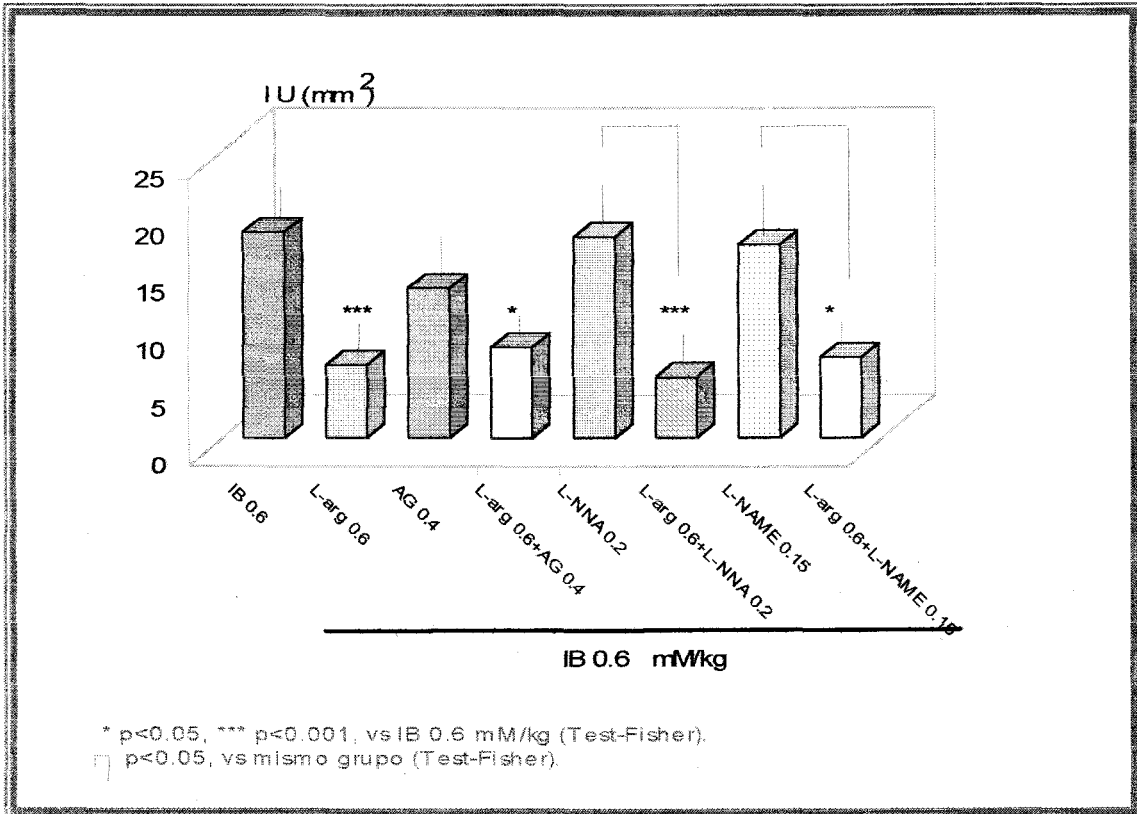
**Tabla 11- Medida de índice de ulceración (IU, mm<sup>2</sup>) en los grupos de animales tratados con diferentes inhibidores selectivos de NOSi (AG 0.4 mM/kg) y NOSc (L-NNA 0.2 mM/kg) y el inhibidor no-selectivo L-NAME (0.15 mM/kg).**

<b>TRATAMIENTOS mM/kg</b>	<b>IU (mm<sup>2</sup>) 90 min</b>	<b>IU (mm<sup>2</sup>) 6h</b>
IB 0.6	5.5±2.8	17.9±2.7
IB 0.6 / L-arg 0.6	4.2±1.9	6.3±1.3 ***
IB 0.6 / AG 0.4	1.7±1.3	13.0±3.5
IB 0.6 / L-arg 0.6 / AG 0.4	1.2±0.9	7.9±1.9 *
IB 0.6 / L-NNA 0.2	1.5±0.9*	17.5±2.8*
IB 0.6 / L-arg 0.6 / L-NNA 0.2	1.9±1.2*	5.3±1.2* ***
IB 0.6 / L-NAME 0.15	5.2±2.6	16.8±2.8
IB 0.6 / L-arg 0.6 / L-NAME 0.15	2.1±1.2	7.0±2.1 *

\* p< 0.05, \*\*\* p<0.001, vs IB 0.6 mM/kg (Test-Fisher).

] p< 0.05, vs mismo grupo (Test-Fisher).

\* mucosas hiperemicas y edematosas.



**Figura 55- Valores de superficie ulcerada (IU, mm<sup>2</sup>) obtenidos con animales tratados con inhibidores selectivos-no selectivos de la síntesis de NO y sacrificados después de 6 h de su administración.**

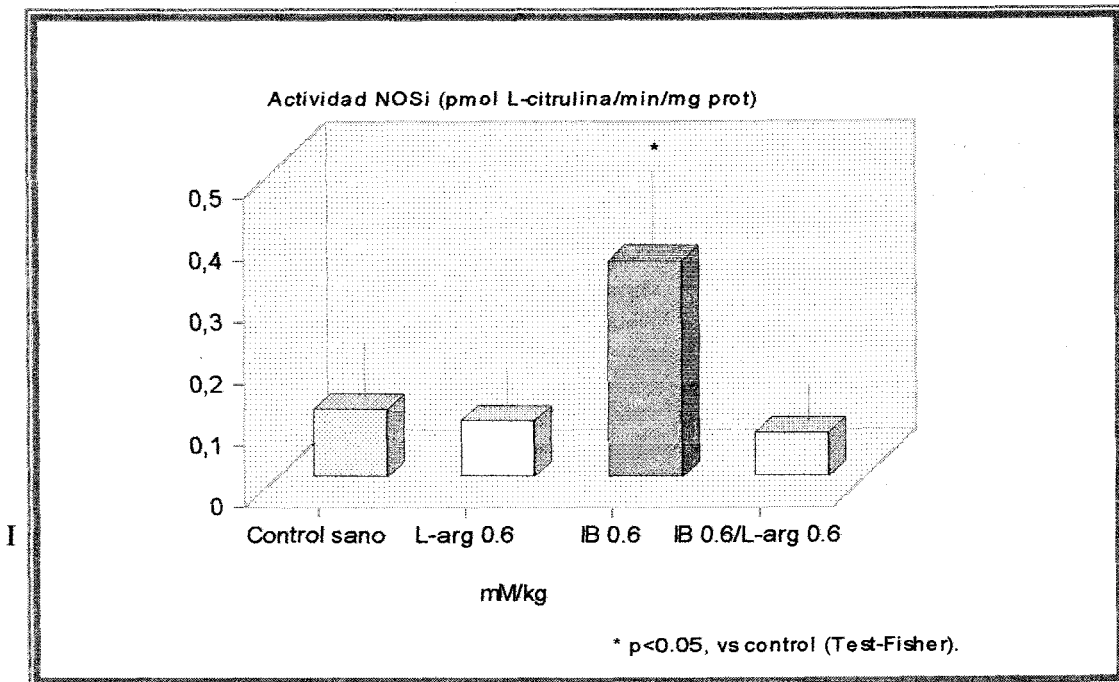
#### IV.3.2-EVALUACION<sup>DE</sup> PARÁMETROS BIOQUÍMICOS INDICADORES DE ACTIVIDAD OXIDO NITRICO

Los resultados del estudio de actividades NOS se muestran en la Tabla 12. La medida de producción de  $^{14}\text{C}$ -L-citrulina nos permite valorar como 6h después de administrar IB (0.6mM/Kg) aparece incrementada la actividad de la isoforma NOSi (IB  $0.35\pm 0.12$ , control  $0.11\pm 0.04$  pmol/min/mg prot;  $p < 0.05$ ), cambio que por otro lado es revertido por L-arg ( $0.07\pm 0.01$ ) (Figura 56). Por el contrario, no encontramos importantes variaciones en las actividades NOSc en los diferentes grupos estudiados.

*Tabla 12- Actividad óxido nítrico sintetasa inducible (NOSi) y constitutiva (NOSc) después de 6 h de tratamiento con IB (0.6 mM/kg) e IB/L-arg (0.6/0.6 mM/kg).*

TRATAMIENTOS (mm2)	NOSi (pmol/min/mg prot)	NOSc (pmol/min/mg prot)	NOS <sub>t</sub> (pmol/min/mg prot)
Control sano	$0.11\pm 0.04$	$0.22\pm 0.04$	$0.34\pm 0.06$
L-arg 0.6	$0.09\pm 0.03$	$0.21\pm 0.03$	$0.30\pm 0.06$
IB 0.6	$0.35\pm 0.12$ *	$0.21\pm 0.05$	$0.53\pm 0.12$
IB 0.6 / L-arg 0.6	$0.07\pm 0.01$	$0.18\pm 0.03$	$0.25\pm 0.04$ *

\*  $p < 0.05$ , vs control (Test-Fisher).



**Figura 56-** Medida de la actividad NOSi (pmol L-citrulina/mg prot) en animales tratados con IB (0.6 mM/kg) e IB/L-arg (0.6/0.6 mM/kg), después de 6 h de la administración.

La activación de la enzima GC por parte del NO provoca un aumento fácilmente cuantificable, mediante RIA, de los niveles de GPMc. En nuestro estudio hemos valorado la producción tisular de este mediador, a diferentes tiempos, en presencia de L-arg y de MI. Los resultados obtenidos muestran como ambas moléculas, precursora y donadora, promueven *per se* un incremento significativo del nucleótido a los 90 min, y éste aumento es reproducido tras la administración conjunta de IB. Se encuentran valores significativos estadísticamente a los 30 y 90 min para MI 0.2·10-2/IB 0.6 mM/kg ( $p < 0.05$ ), y a los 90 min y 6 h para IB 0.6/L-arg 0.6 mm/kg ( $p < 0.05$  y  $p < 0.001$  respectivamente) (Tabla 13, Figura 57).

**Tabla 13- Variaciones en el tiempo (30 y 90 min, 6 y 12 h) de los niveles mucosales de GMPc ( $\mu\text{mol}/\text{mg prot}$ ) tras los distintos tratamientos.**

<b>TRATAMIENTOS (mM/kg)</b>	<b>30 min</b>	<b>90 min</b>	<b>6h</b>	<b>12h</b>
Control sano	0.72±0.09	0.72±0.09	0.72±0.09	0.72±0.09
L-arg 0.6	0.84±0.15	1.40±0.18 *	1.00±0.11	0.75±0.10
IB 0.6	0.99±0.06	0.92±0.14	0.72±0.05	0.63±0.10
IB 0.6/L-arg 0.6	1.10±0.15	1.60±0.16 *	2.0±0.5 **	0.65±0.11
M.I. 0.2·10 <sup>-2</sup>	1.07±0.13	1.93±0.26 ***	0.85±0.15	0.85±0.13
M.I. 0.2/IB 0.6	1.31±0.19 *	1.29±0.23 *	0.94±0.21	0.92±0.20

\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, vs control (Test-Fisher).

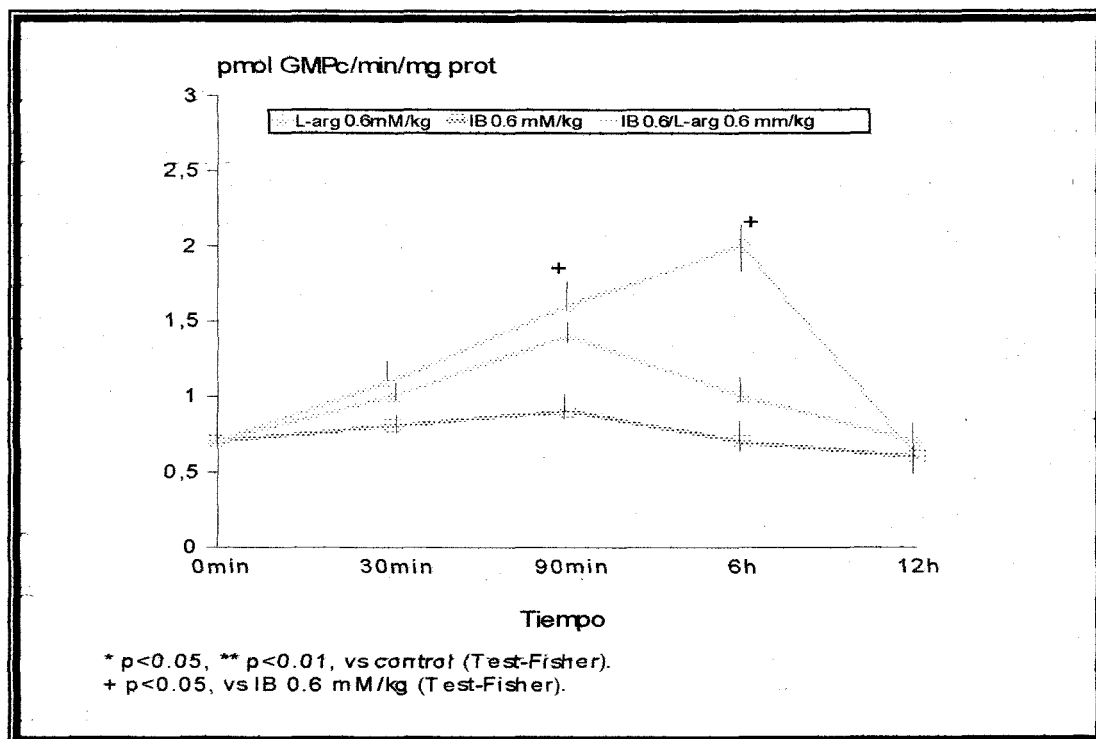
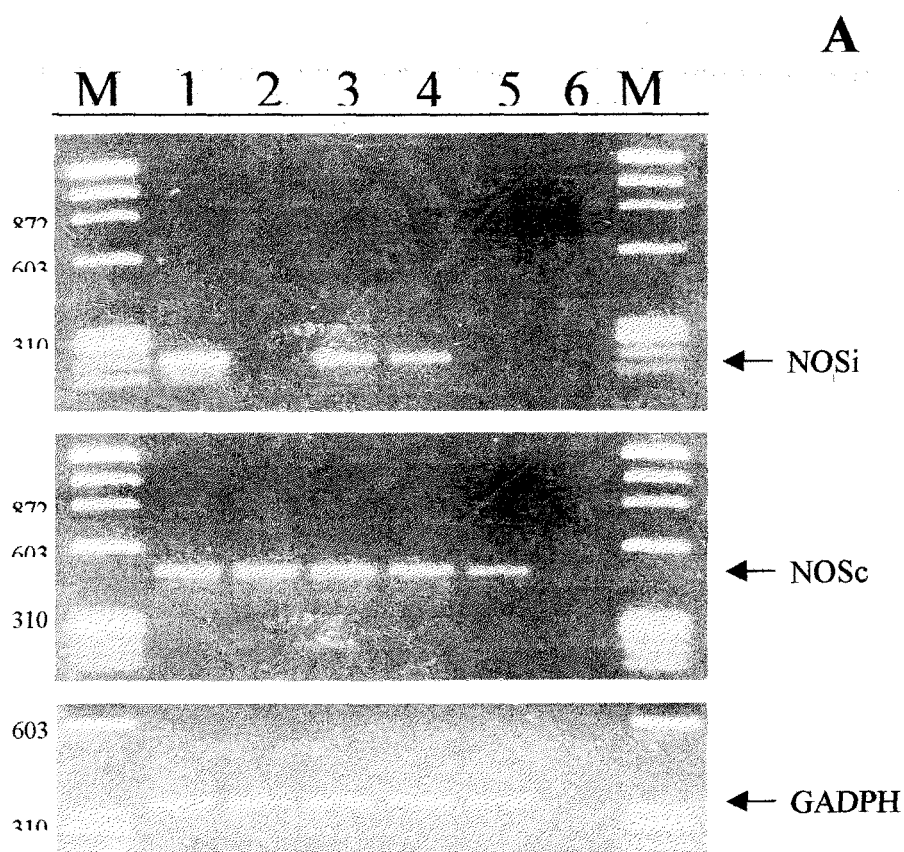
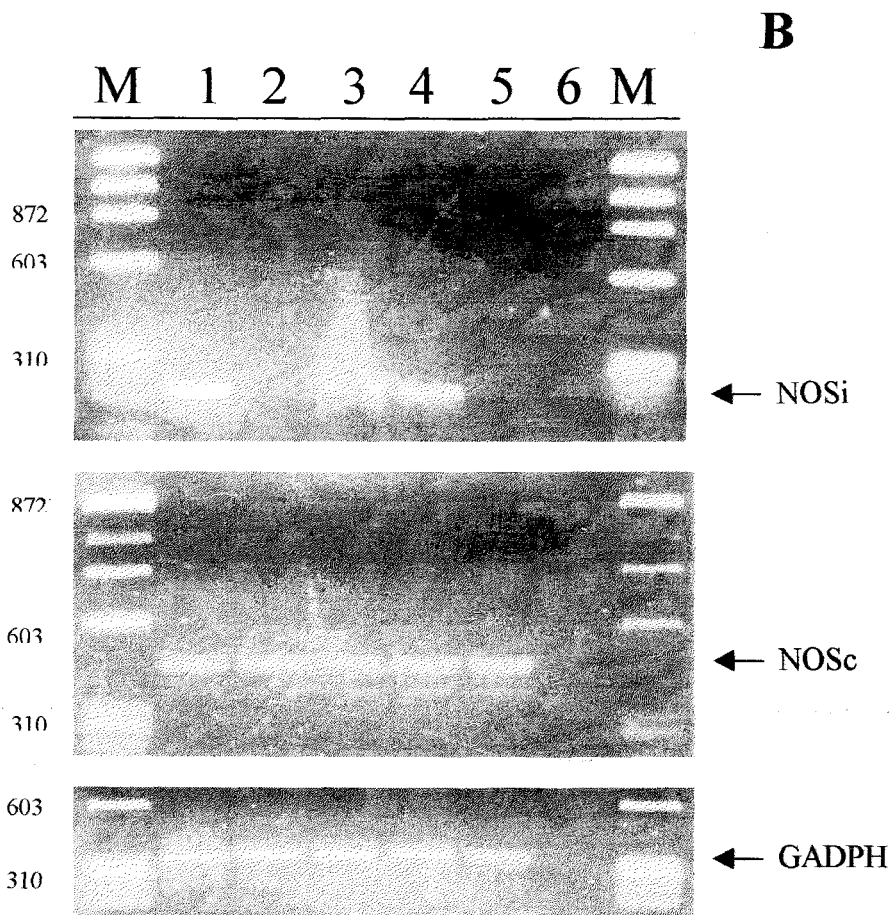


Figura 57- Evolución de los niveles gástricos de GMPc en animales tratados con IB (0.6 mM/kg), L-arg (0.6 mM/kg) e IB/L-arg (0.6/0.6 mM/kg) en los diferentes tiempos (30 y 90 min, 6 y 12 h).

## IV.3.3- EXPRESIÓN DE LA ENZIMA NOS

los resultados anteriores, mayor actividad NOSi valorada e incremento en la concentración tisular de GMPc, nos sugirieron el interés de profundizar en el mecanismo NO-dependiente de L-arg y analizar cambios transcripcionales inducidos por el aminoácido. Los niveles de expresión ARNm tanto a los 90 min como después de 6h, mostraron diferencias significativas entre los grupos de IB 0.6 mM/kg e IB 0.6/L-arg 0.6 mM/kg ya que la señal patente de NOSi obtenida mediante el estudio de RT-PCR inducido en animales tratados con IB, fue reducida por L-arg en un 28 % después de 90 min (Figura 58 A) y hasta un 37 % en aquellas mucosas obtenidas 6 h después de tratar con el aminoácido (Figura 58 B). Por el contrario, y según lo esperado, no pudimos observar cambios en la expresión de ARNm NOSc para ningún grupo ni tiempo ensayado.





**Figura 18-** Análisis de la expresión de NOSi y NOSc en mucosa gástrica de rata tras 90 min (A) y 6 h (B) de tratamiento. Los carriles corresponden: 1-LPS 3 mg/kg i.p., 2-vehículo, 3- IB 0.6 mM/kg oral, 4- IB/L-arg (0.6/0.6 mM/kg) oral, 5- L-arg 0.6 mM/kg oral, 6- PCR control. GADPH es el gen de referencia como control de carga y expresión.



#### IV.4- ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CICLOOXIGENASA

Los resultados del estudio sobre posibles variaciones inducidas por L-arg en la actividad de la enzima COX de muestras gástricas de animales tratados con IB, en los tiempos seleccionados, aparecen reflejados en la Figura 59. La medida por RIA de los niveles tisulares de PGE<sub>2</sub>, después de 90 min, indica una inhibición máxima de la actividad COX en el grupo de animales tratado con el fármaco (IB: 0.05±0.02, control: 1.47±0.4 ng/mg prot; p<0.05). Sin embargo, la administración de L-arg sola o asociada al AINE mantiene los valores de eicosanoide no solo similares, sino incluso mayores que los cuantificados en el grupo control (L-arg 2.3±0.4, IB/L-arg 2.0±0.7 ng/mg prot, Figura 59<sup>a</sup>). Por el contrario, después de 6 h la presencia del aminoácido no modifica la profunda inhibición en los niveles de PGE<sub>2</sub> que induce IB (Figura 20<sup>b</sup>).

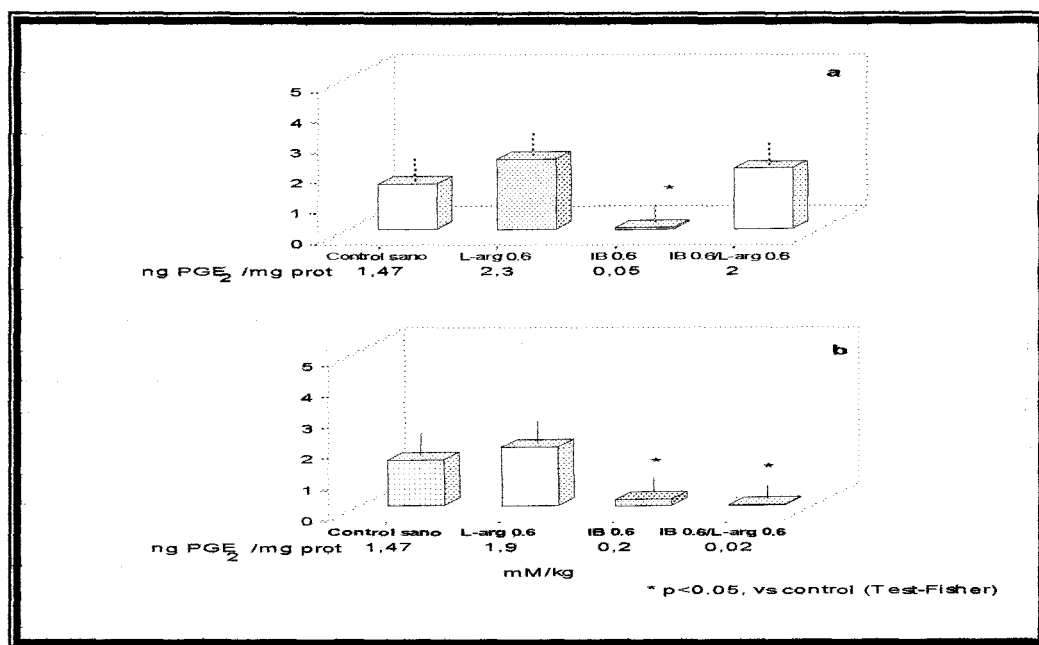
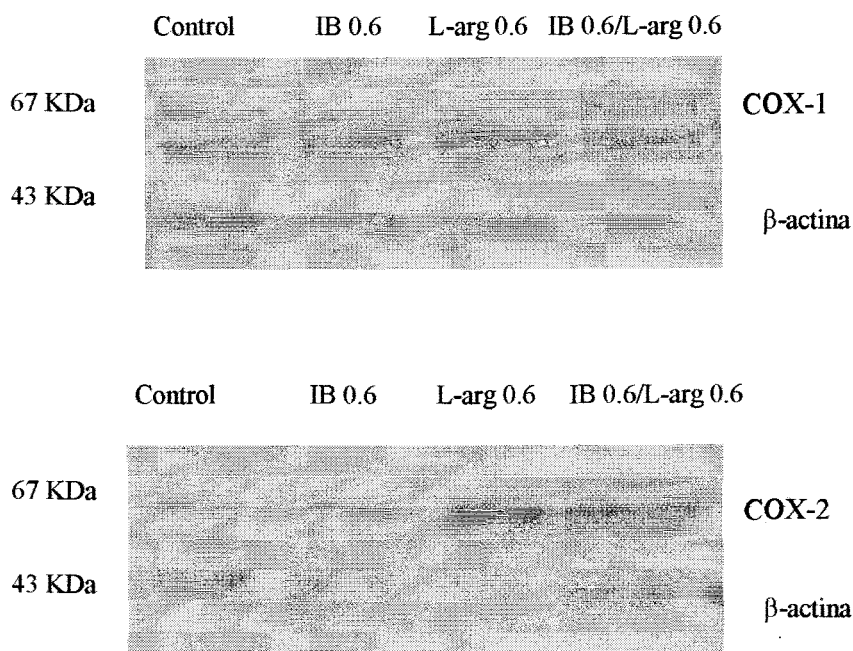


Figura 59- Niveles gástricos de PGE<sub>2</sub> (ng/mg proteína) como medida de actividad COX en animales tratados con IB (0.6 mM/kg) e IB/L-arg (0.6/0.6 mM/kg) después de 90 min (a) y 6h (b) de tratamiento.

Estas investigaciones han sido complementadas con estudios inmunológicos de *Wester-Blotting* con la finalidad de analizar cualitativamente posibles modificaciones transcripcionales-translacionales en la proteína COX (isoforma COX-1 o constitutiva e isoforma COX-2 o inducible) promovidos por L-arg en relación a IB.

En la Figura 60 mostramos las señales obtenidas con ambas isoformas en los raspados mucosales gástricos de animales, tratados con IB 0.6 mM/kg e IB 0.6/L-arg 0.6 mM/kg después de 6 h de tratamiento.

Estos resultados previos indican como la proteína COX-1 se corresponde con una banda a 67 KDa y presente con unos niveles próximos en todas las muestras analizadas (Figura 60 A). Sin embargo, la enzima inducible COX-2, a 67 KDa, presentaba una banda algo más visible quizás en aquellos muestras de animales tratados con L-arg (en presencia y ausencia de IB) (Figura 60 B).



**Figura 60- Análisis de la expresión de las proteínas COX-1 y COX-2 en mucosa gástrica de rata después de 6 h de tratamiento**

## **V- DISCUSIÓN**

En 1992 la prestigiosa revista Science consideraba molécula del año al óxido nítrico (NO) con un título en portada "*NO news is good news*". El premio Nobel de Medicina del año 1998 fue compartido por los investigadores norteamericanos Robert Furchgott, Louis Ignarro y Ferid Murad por sus descubrimientos independientes que desembocaron en la identificación del NO como molécula clave con importantes funciones cardiovasculares destacando su capacidad reguladora de la presión sanguínea. La consulta en la base de datos MED-LINE revela que, por ejemplo, desde el año 1990 hasta la actualidad se han publicado 20000 trabajos relacionados con el NO, de los cuales un número suficientemente representativo han sido realizados por grupos españoles. Reflejamos estos datos tratando de mostrar el interés de la comunidad científica por un gas que, considerado hasta hace pocos años como contaminante ambiental tóxico, en la actualidad se le atribuyen funciones fundamentales en el organismo.

Hemos comentado ampliamente en esta memoria la importancia de éste agente y su papel mediador en numerosas funciones fisiológicas y fisiopatológicas.

A nivel GI existen numerosos trabajos que muestran una distribución amplia NO, reflejando su papel regulador de funciones homeostáticas relacionadas con la motilidad, la secreción o la microcirculación de la pared digestiva (Calatayud y cols., 1998). En condiciones fisiológicas el gas, junto con las prostaglandinas, interacciona con neuropéptidos liberados por fibras sensoriales abundantes en el TGI favoreciendo el mantenimiento de la integridad mucosal (Whittle y cols., 1990; Brzozowski y cols., 1995). En los últimos años se han publicado importantes datos proponiendo a este gas como agente protector capaz de preservar la integridad de la mucosa en diferentes modelos experimentales incluyendo CIH (Kitagawa y cols., 1990), isquemia (Andrews y cols., 1994), PAF (Boughton Smith y cols., 1992) o endotoxina (Boughton Smith y cols., 1990).

En este sentido los AINE son candidatos idóneos. Ya hemos indicado la problemática que supone la elevada toxicidad GI derivada del consumo de este grupo de fármacos. A pesar de ser frecuentemente utilizados en el tratamiento de la artritis y otras patologías osteoarticulares, con frecuencia provocan efectos deletéreos sobre el tracto digestivo, que

incluyen síntomas dispépticos, erosiones, úlceras y complicaciones más serias como, hemorragia y perforación. Cálculos recientes estiman que entre el 20-50 % de los pacientes consumidores de AINE, desarrollan complicaciones digestivas y de ellos el 1-2 % necesitan hospitalización(Aly, 1997; Singh 1998).

En la patogénesis del daño están involucrados una serie de mecanismos, siendo uno de los más destacados a nivel gástrico, la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (PG), vía inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX), encargadas del mantenimiento de los factores defensivos de la mucosa. En adición a ésta vía, en los últimos años se han propuesto otros mecanismos alternativos relacionados con los cambios que la mayor parte de estos fármacos inducen sobre la microvasculatura digestiva. Numerosas estrategias se han diseñado para prevenir la gastroenteropatía inducida por AINE, que incluyen la administración de análogos de PG, antagonistas de los receptores H<sub>2</sub> de la histamina o inhibidores de la bomba de protones. Estos agentes actuando por diferentes mecanismos, restauración de los niveles de prostanoïdes protectores o inhibición de la secreción ácido-péptica, consiguen evitar los efectos deletéreos digestivos de los AINE. Más recientemente la introducción de los nuevos inhibidores preferentes o selectivos de la isoforma inducible de la ciclooxigenasa COX-2 o las moléculas donadoras de NO, están contribuyendo a proteger la mucosa gástrica.

En éste sentido, diferentes fármacos incluyendo AAS, diclofenaco, naproxeno y flurbiprofeno han sido formulados como derivados nitrados con capacidad de liberar NO. Estos NO-AINE mantienen sus propiedades inhibitorias sobre COX y por tanto su eficacia antiinflamatoria, o sus efectos antitrobóticos (Mitchel y cols., 1994; Wallace y cols., 1994; Del Soldato y cols., 1996; Davies y cols., 1997). La capacidad de gliceril trinitrato de acelerar la curación de las lesiones aumenta la evidencia sobre las posibilidades preventivas de estas nuevas asociaciones (Konturek y cols., 1993; Elliot y cols., 1995). Aún más, datos recientes publicados por Saha y cols. (1997) sobre la posibilidades de S-nitrosoglutation, en modelos experimentales agudos y crónicos, han demostrado como este compuesto administrado junto a piroxicam disminuye las lesiones en más de un 70%. No obstante, aunque los datos

experimentales sugieren importantes ventajas de estas asociaciones, se necesitarían una mayor evidencia clínica que confirmara sus aportaciones reales.

Paradójicamente, aunque NO es sintetizado a partir de L-arg, el rol de éste aminoácido, sustrato de NOS, no ha sido muy estudiado en el gastroprotección. Recientemente se ha demostrado que el pretratamiento con L-arg causa una disminución dosis-dependiente de las lesiones inducidas en rata por HCl 0.6 N, etanol absoluto, estrés o AAS (Takeuchi y cols., 1993; Brzozowski y cols., 1997) y que ésta reducción vino acompañada de un gradual incremento del flujo sanguíneo.

Ha sido claramente demostrado que la formulación IB/L-arg a dosis equimolares, favorece los parámetros farmacocinéticos del preparado lográndose una más rápida y eficaz absorción que propicia un efecto analgésico más rápido y de mayor intensidad (Cooper, 1984). Sin embargo, no ha sido estudiado, si L-arg además, podría inhibir en alguna forma la toxicidad GI de IB.

Todos estos antecedentes nos han inducido a profundizar en las características protectoras del aminoácido y su posible relación con el NO. Los resultados obtenidos confirman que L-arg, efectivamente disminuye de forma significativa el daño inducido por IB sobre mucosa gástrica de rata. El AINE provoca lesiones que aumentan en extensión y profundidad con la dosis, siendo máximas después de 6h de la administración oral y manteniéndose hasta las 12 h. L-arg inhibe dichas lesiones (superficie de mucosa ulcerada y grado de hemorragia) en todos los tratamientos ensayados. Brzozowski y cols. (1997), que han comprobado como L-arg protege la mucosa gástrica de rata frente a diferentes tipos de agresión, indican que el aminoácido actúa localmente como un irritante suave estimulando la citoprotección adaptativa, ya que cuando la administraron por otras vías diferentes a la intragástrica, e.g. tratamiento sistémico (i.v.), no fue capaz de impedir ni minimizar el daño causado por etanol 100 %. Sin embargo, cuando la producción de PG endógenas se suprimió completamente con AAS acidificado, ellos sugieren que en la inhibición de las lesiones que ocurre tras la administración de L-arg, podría estar involucrada la hiperemia gástrica mediada por NO. Nuestras experiencias indican que en ambos casos, la administración oral e i.p. del

aminoácido protege la mucosa de las lesiones inducidas por IB, sugiriendo que la gastroprotección no sólo sería debida a un efecto tópico directo sobre las células mucosales, sino que también estarían involucrados mecanismos sistémicos.

Que la acción antiulcerogénica de L-arg es importante, lo demuestra el hecho de que cuando se administra junto a IB provoca una inhibición del daño similar a la que inducen MSP (análogo de PGI<sub>2</sub>) o los antiseoretos antagonistas H<sub>2</sub>, RAN y ROX. También hemos comparado sus efectos con los de otro aminoácido, L-lys, utilizado con la misma finalidad, es decir, mejorar los parámetros farmacocinéticos de IB y conseguir un efecto analgésico más rápido y eficaz. En nuestras condiciones experimentales, L-lys no ejerce ningún efecto sobre la mucosa gástrica y tras la ingesta simultánea del aminoácido con el AINE, aquel no modifica el efecto gastrolesivo de éste. Este dato, nos sugiere la hipótesis de que en la actividad antiulcerogénica de L-arg podría estar involucrado algún mecanismo NO-dependiente.

Ya hemos comentado que, además de la caída de PG vía inhibición COX, otros factores alternativos están relacionados con la toxicidad GI de los AINE. En nuestra experiencia, las lesiones mucosales inducidas por IB se acompañan de un incremento significativo del infiltrado de neutrófilos, de la actividad XO y de la concentración de lipoperóxidos. Estos resultados están en concordancia con la hipótesis de que tanto los granulocitos como los radicales libres oxigenados producidos por alteraciones microvasculares, constituyen pasos fundamentales en el proceso gastrolesivo de los AINE.

Este podría iniciarse como consecuencia de una alteración bioquímica específica en el lugar de la absorción, provocada por el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial y la inhibición del transporte de electrones. La consecuencia inmediata sería una reducción de la producción de ATP y aumento de los niveles de ADP-AMP, que se correlacionan con un incremento de Ca<sup>2+</sup> en el citosol. Los efectos derivados de ésta situación serían entre otros: daño mitocondrial e incremento de la producción de RLO; alteración del balance Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y por lo tanto del balance osmótico y, pérdida del control celular. Todos estos cambios sería los responsables de una alteración de la permeabilidad, permitiendo que los

factores agresivos lumbales gástricos e intestinales (ácido, bilis, pepsina, enzimas hidrolíticas y proteolíticas, etc) accedan a la mucosa provocando, en último término, necrosis celular (Yoshikawa y cols., 1993).

A su vez, algunas de éstas sustancias actúan como quimiotácticos favoreciendo la migración de los neutrófilos al área de la lesión. En los últimos años se han ido acumulando datos que implican a estos leucocitos en la patogénesis del daño GI (Whittle y cols., 1991; Prince y cols., 1994). La migración se inicia con la expresión de moléculas de adhesión en su membrana que reconocen otras moléculas complementarias de la célula endotelial. Después de un proceso de rodamiento o giro, se produce un puente de unión entre ambas permitiendo el anclaje del neutrófilo sobre el endotelio (Kitagawa y cols., 1990; Whittle y cols., 1990). Simultáneamente se inducen modificaciones morfológicas en el leucocito que junto al incremento de la permeabilidad vascular, facilitan su extravasación. Fuera del espacio vascular, los neutrófilos siguen un gradiente de quimiotácticos hasta el lugar del daño liberando distintos mediadores proinflamatorios, tales como RLO y enzimas con actividad proteolítica que afectan al tono y permeabilidad vascular(Whittle y cols., 1990).

Además de las enzimas proteolíticas, se han observado dos sistemas oxidativos relacionados con la actividad lesiva leucocitaria, el sistema dependiente de nicotín adenín difosfato oxidasa (NADPH-oxidasa) y la MPO. NADPH-oxidasa, localizada en la membrana plasmática, es la responsable de la generación de al menos tres metabolitos oxigenados:  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^-$ . Los aniones  $O_2^-$  generados pueden ser dismutados de forma espontánea a  $H_2O_2$ , fuente de ácido hipocloroso en el neutrófilo, actuando como bactericida al convertir las aminas primarias en N-cloraminas. MPO se encuentra en grandes cantidades en los gránulos neutrofilicos desde donde puede ser liberada a los flujos extracelulares. En ellos oxida haluros, principalmente  $Cl^-$ , así como al tiocianato a su correspondiente ácido hipohaluroso.

La disminución del flujo sanguíneo local asociado al consumo de AINE podría perjudicar la capacidad de la mucosa de resistir la retrodifusión de ácido favoreciendo la necrosis tisular. La falta de aporte energético, a su vez aumenta el consumo de ATP, que en su proceso de degradación provoca un incremento intracelular de los nucleótidos de purina,



fundamentalmente de adenosina, inosina e hipoxantina. También afecta a los sistemas enzimáticos encargados de mantener el gradiente iónico a través de la membrana, y se incrementan considerablemente los niveles intracelulares de calcio. Este aumento, provoca la activación de proteasas capaces de convertir la XDH en XO.

La mayor parte del daño se produce durante el proceso de reperfusión en el que se liberan especies reactivas tales como el  $O_2^-$  y el radical  $OH^\cdot$ , generados vía xantina-XO y/o a través de los neutrófilos activados (Yoshikawa y Naito, 1994). La xantín oxidoreductasa es responsable de la oxidación de purinas. Existen dos isoenzimas catalíticas activas: la XDH que utiliza como cofactor  $NAD^+$  y es la forma que se encuentra habitualmente en la célula no sometidas a situaciones de isquemia, y la XO que utiliza como aceptor de electrones el  $O_2$ , en lugar del  $NAD^+$ , y es la isoenzima activa en condiciones isquémicas. Habitualmente se encarga de catalizar el paso de la xantina a ácido úrico, pero también puede utilizar como sustrato a la hipoxantina, generando los metabolitos oxidativos indicados. En comparación con otros tejidos, la mucosa gástrica posee una marcada capacidad para oxidar hipoxantina vía XO. El anión  $O_2^-$  puede reaccionar rápidamente con moléculas orgánicas y producir un daño reductor al liberarse del electrón sobrante. También interactúa con el  $H_2O_2$  favoreciendo la aparición de radical  $OH^\cdot$ , e incluso con el NO, formando  $ONOO^-$ , altamente tóxico por su capacidad de generar nuevamente  $OH^\cdot$ .

La presencia de RLO, constituye uno de los factores que más puede alterar los procesos fisiológicos. Entre los efectos dañinos más importantes destacan la inactivación de enzimas, ataque al material genético y peroxidación de lípidos de membrana, que provoca profundas alteraciones en las propiedades de ésta con graves repercusiones para el funcionamiento celular, incluyendo los procesos de transporte, el mantenimiento de los gradientes de iones y metabolitos o las señales de trasducción mediadas por los receptores (Wallace y cols., 1990). Todos estos procesos implican, por tanto lesiones tisulares.

Existen numerosas evidencias de que los compuestos sulfidrílicos tales como el glutatión reducido, protegen la mucosa gástrica del efecto deletéreo de las especies reactivas oxigenadas por su elevada capacidad para secuestrar los radicales libres generados por

agentes nocivos, incluidos el alcohol y los AINE (Konturek y cols., 1993; López-Belmonte y cols., 1997). GSH es el antioxidante endógeno más importante del organismo y se encuentra presente en elevadas concentraciones en el estómago e intestino de roedores y del hombre. GSH-Px es una importante enzima que juega un destacado papel en la eliminación del  $H_2O_2$  y también de hidropéroxidos lípidicos en las células mucosales GI. Su actividad antioxidante está asociada a su intervención en el metabolismo del glutatión, ya que oxida a la forma reducida del mismo (GSH) originando GSSG, el cual, subsecuentemente puede volver a la forma original por la actividad glutatión reductasa, GSSG-Rd, en presencia de NADPH como agente reductor.

Otra enzima con demostradas propiedades antioxidantes, es SOD, la cual facilita la dismutación de radicales  $O_2^{\cdot}$  a  $H_2O_2$ . En este sentido, agentes capaces de estimular su actividad, han mostrado un efecto beneficioso sobre la mucosa gástrica (Martín, 1998). Aunque la depleción de glutatión endógeno, así como de las actividades GSH-Px o SOD, se ha relacionado con la gastroenteropatía inducida por el AINE, en nuestras condiciones experimentales IB no induce cambios en ninguno de éstos parámetros respecto del grupo control, indicando que el efecto ulcerogénico de éste fármaco no lo podemos asociar con cambios en el metabolismo del glutatión o con una disminución de la actividad SOD.

Actualmente se acepta que el efecto protector que NO induce sobre la mucosa gástrica es consecuencia de su efecto dilatador y su respuesta hiperémica frente a agentes nocivos, pero también se ha comprobado que la reducción del daño en el proceso de isquemia-reperfusión o tras la ingesta de AINE, procesos en los que se liberan numerosas especies reactivas, está relacionada con su capacidad para inactivarlas, incluyendo los aniones  $O_2^{\cdot}$ ,  $OH^{\cdot}$  y  $H_2O_2$  (Kitagawa y cols., 1990). Más aún, ha sido demostrado que la inhibición de la producción de NO favorece la adhesión de los leucocitos al endotelio de los microvasos, permite la vasoconstricción y suprime la hiperemia en las zonas próximas a la úlcera, retrasando la curación de las lesiones. Todos estos mecanismos, están favorecidos por una inactivación simultánea de las propiedades antioxidantes. Por el contrario, los agentes donadores de NO, ya mencionados, como la nitroglicerina, nitroprusiato o la nueva

generación de NO-AINE, protegen claramente frente a las erosiones provocadas por diversos agentes ulcerogénicos (López-Belmonte y cols., 1993; Wallace y cols., 1997; Muscara, 1998).

Respecto a L-arg, se han demostrado importantes funciones biológicas incluyendo restauración del balance de nitrógeno tisular, control de determinadas respuestas inmunológicas o mejoría de lesiones gastrointestinales (Brzozowski y cols., 1997). La administración sistémica del aminoácido tiene capacidad de revertir el efecto deletéreo que inhibidores de la síntesis NO como L-NAME o L-NNA provocan sobre la mucosa digestiva (Konturek y cols., 1992; Brzozowski y cols., 1993). Sobre células gástricas aisladas de conejo el pretratamiento con L-arg también previno el incremento de la producción de lipoperóxidos inducido por isquemia-reoxigenación, y favoreció la síntesis y secreción de moco (Kim y Kim, 1998).

Los datos obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto que la administración simultánea de IB/L-arg no sólo reduce significativamente el número y la intensidad de las lesiones, sino también los niveles de PL y la actividad del sistema xantina-XO. Es más, cuando comparamos los efectos de ambos tratamientos, IB e IB/L-arg sobre este sistema, se puede comprobar que con el AINE toda la actividad es XO lo que indica un estado isquémico importante. Sin embargo L-arg revierte, en parte, esta situación, inhibe dicha vía, y se recupera la actividad XDH prácticamente hasta valores basales, presuponiéndose la vuelta de la mucosa a un estado normal. Sin embargo, no modifica el incremento de actividad MPO inducido por el AINE, ni como era de esperar altera sustancialmente la actividad de los principales sistemas antioxidantes endógenos: enzimas GSH-Px y SOD, y GSht, que por otra parte tampoco habían sufrido alteración con IB.

Una posible explicación de la importante reducción del daño de la asociación IB/L-arg respecto al AINE sólo, es que el aminoácido favorezca la producción de NO. Los resultados de este estudio nos permite sugerir un mecanismo NO-dependiente en la protección conferida por el aminoácido.

En primer lugar, observamos que la respuesta de L-arg es de rango similar a la valorada con la molécula donadora de NO, MI. Hemos comentado las publicaciones recientes que analizan las ventajas de la asociación donador de NO con un AINE. Estos grupos de moléculas podrían ser clasificados según su naturaleza química en nitratos orgánicos ( $R_3C-ONO_2$ , como gliceril trinitrato o el propio MI), nitritos orgánicos ( $R_3C-ONO$ , como nitrito de amilo), compuestos inorgánicos nitrosos ( $[(CN)_5FE^{2+}]NO$ , como nitropusiato de sodio), sidoniminas (como molsidomina y su metabolito 3-morfolinosidonionina o SIN-1) y S-nitrosotioles ( $R_3C-S-NO$ , como Nitroso-N-acetil-penicilamina) (Bauer y cols., 1995; Moncada y Higgs, 1995). Todos estos donadores actúan como profármacos ejerciendo sus efectos después de su biotransformación en NO. En diferentes enfermedades cardiovasculares tales como angina, infarto de miocardio o vasoespasmo coronario son de gran utilidad aprovechando sus cualidades vasodilatadoras aumentando el flujo sanguíneo coronario. A nivel GI, y administrados junto a antiinflamatorios, además de sus características relajantes vasculares y por tanto dilatadoras vasculares, habría que incluir sus efectos antiadhesivos leucocitarios, inhibidores en la producción de RLO o formadores de mucus (Wallace, 1997).

Respecto a L-arg, si bien a nivel digestivo los datos existentes son escasos, en otros sistemas y tejidos los resultados son interesantes. En humanos sanos y en ciertos animales, la administración del aminoácido induce hipotensión debida a la formación de NO (Cooke y cols., 1992; Cohen, 1995) y en pacientes hipertensos su aplicación i.v. disminuye la presión arterial y la resistencia periférica con incremento de cronotropismo y del gasto cardiaco (Hishikawa y cols., 1993). En un modelo experimental de músculo esquelético sometido a síndrome de I/R, la aplicación de L-arg previene la excesiva liberación de  $O_2^{\cdot}$  y preserva de la caída importante en los niveles de NO necesarios para el mantenimiento de un tono vascular adecuado (Huk y cols., 1996).

Konturek y cols., encuentran que la inhibición de NOS por L-NNA no modifica prácticamente la respuesta del aminoácido si bien reduce la hiperemia asociada y concluyen

que la mayor velocidad en la curación de las lesiones se debe a un incremento del flujo sanguíneo en los márgenes de la úlcera.

En esta memoria también reflejamos los resultados encontrados tras la administración de D-arg, isómero no activo, no mostrando efecto protector alguno. Este dato aportaría nuevas evidencias sobre la vinculación de NO protegiendo frente al daño de IB. Resultados similares se obtienen en otros estudios (Brozowski y cols., 1997). Sin embargo, Takeuchi y cols., (1993) en un modelo basado en la aplicación de CIH 0.6N, encontraron ciertos efectos protectores mediados por el isómero dextro. Las discrepancias entre nuestros resultados y los de este grupo podrían estar relacionados con las elevadas dosis empleadas por ellos (hasta 750 mg/Kg animal) en comparación con las utilizadas por nosotros (100 mg/Kg animal).

La utilización de inhibidores mas o menos selectivos de NOS es una estrategia bastante frecuente por su utilidad al permitir valorar la actuación de NOS<sub>c</sub> frente a NOS<sub>i</sub>. Nuestras investigaciones se han basado en el empleo v.o. de tres moléculas diferentes, según datos consultados en la literatura al respecto. Así pues, AG es un destacado inhibidor de NOS<sub>i</sub> frente a L-NNA, preferentemente inhibidor de la isoforma constitutiva, o L-NAME, molécula igualmente activa para ambas formas de la enzima (Brzowski y cols., 1997; Takakura y cols., 1997; Yamamoto y cols., 1998). La inhibición de NOS<sub>i</sub> por AG reduce, aunque no significativamente, la severidad de las lesiones en la valoración realizada a las 6 h. Este resultado podría sugerir la participación de la forma inducible consecuencia de la administración de IB. Por otro lado, la respuesta provocada por inhibición selectiva de NOS<sub>c</sub> aplicando 0.2mM/Kg de L-NNA, si bien no modifica cuantitativamente los valores de IU en mm<sup>2</sup>, la descripción cualitativa de las lesiones observadas propone cambios relacionados con una mucosa edematosa y enrojecida aún en presencia del aminoácido y para los tiempos estudiados (90 min y 6h). Este tipo de respuesta indica la importancia que el NO liberado por NOS<sub>c</sub> tendría en el mantenimiento homeostático de la pared digestiva. L-arg, en su administración conjunta con los diferentes inhibidores, mantiene su capacidad protectora óptima 6 h después de su administración lo que sugiere la posible participación de otros mecanismos independientes del NO.

La confirmación de los datos anteriormente expuestos la obtuvimos mediante el estudio de la actividad enzimática de las formas constitutiva e inducible de NOS, así como su grado de expresión y de los niveles de GMPc.

La administración de IB provoca un incremento significativo de la actividad NOSi lo que podría significar un exceso de producción de NO (del grado de nmoles) capaz de reaccionar con los metabolitos oxigenados liberados por el AINE y posterior formación de ONNO' altamente lesivo. El tratamiento conjunto con L-arg revierte ésta situación hasta los valores control y ello se refleja en el grado de inhibición, hasta de un 37 % después de 6 h, lo que pone de manifiesto el efecto beneficioso del aminoácido.

Tras la evaluación de los niveles de GMPc, segundo mensajero relacionado con los mecanismos vasodilatadores de NO, también se observa su incremento en los grupos que recibieron MI y L-arg, lo que demuestra claramente la participación del mediador.

Respecto a la implicación del mecanismo prostaglandín-dependientes en el efecto gastroprotector de L-arg, nuestros datos indican que impide la inactivación de COX por IB durante el primer período de su administración (90 min) como se puede apreciar por los niveles de PGE<sub>2</sub> encontrados, pero su acción sobre la enzima se pierde a lo largo del tiempo, manteniéndose después de 6 h la inhibición de la síntesis del prostanoide inducida por el AINE.

El posible aumento de la expresión COX-2 asociado al tratamiento con L-arg en el mismo período, necesitaría su confirmación en estudios más detallados.

## **VI- CONCLUSIONES**

Después de evaluar el efecto que la asociación IB/L-arg induce sobre la mucosa gástrica, los resultados obtenidos en esta memoria nos permiten proponer las siguientes conclusiones:

1-IB provoca lesiones gástricas que aumentan en extensión y profundidad con la dosis, siendo máximas después de 6 h de la administración oral. L-arg disminuye tanto la superficie total de la mucosa ulcerada como el grado de hemorragia, en todos los tratamientos ensayados, y en grado comparable al de citoprotectores y antiseoretos clásicos. El hecho de que la gastroprotección se produzca indistintamente vía oral y parenteral, nos hace pensar que no sólo es debida a un efecto tópico directo, sino también a mecanismos sistémicos.

2-Entre los posibles mecanismos protectores de L-arg, destacamos la inhibición que produce sobre el estrés oxidativo de la mucosa inducido por el AINE. Las lesiones gástricas de IB se asocian con un incremento significativo de los niveles de lipoperóxidos, y de las actividades enzimáticas MPO y XO. Esto indica que la producción de RLO es debida tanto al estado isquémico de la mucosa como a un aumento del infiltrado inflamatorio. La administración de L-arg disminuye significativamente la PL y recupera la actividad XDH, sin embargo no inhibe la infiltración leucocitaria, lo que hace suponer que favorece la vasodilatación, pero no impide la activación neutrofílica.

3-Ni IB ni la asociación IB/L-arg modifican sustancialmente la actividad ni la concentración de los principales antioxidantes endógenos mucosales, SOD, GSH-Px y glutatión total.

4-La participación del NO en el efecto gastroprotector también queda demostrada. L-arg, pero no D-arg, disminuye el daño mucosal producido por IB. Los tratamientos con inhibidores selectivos y no selectivos de NOS, también inducen lesiones gástricas similares al AINE. Sin embargo cuando se administra



simultáneamente L-arg, éstas disminuyen significativamente. Además, el aminoácido inhibe la actividad y la expresión de la sintasa inducible, aumentadas tras la ingesta de IB, y también incrementa los niveles de GMPc.

5-Los mecanismos antiulcerogénicos de L-arg también podrían estar relacionados con el aumento de la actividad COX, como lo demuestra el hecho de la recuperación hasta valores normales de la concentración de PGE<sub>2</sub> en mucosa, drásticamente disminuída por IB.

## **VII- BIBLIOGRAFÍA**

- Aeberhard EE, Henderson SA, Arabolos NS, Griscavage JM, Castro FE, Barret CT, Ignarro LJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit expression of the inducible nitric oxide gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 208: 1053-1059.
- Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reichner JS. Nitric oxide mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 1997; 150: 5080-5085.
- Aly. NSAID-induced ulcer and its complications. *Nord Med* 1997; 112: 195-197.
- Anderson ME, Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Meth Enzymol* 1985; 113: 548-555.
- Andrews FJ, Malcontenti C, O'Brien PE. Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 366-373.
- Anggard E. Óxido nítrico: mediador, asesino y medicamento a la vez. *Lancet* 1994; 343: 1199-1206.
- Aoki C, Rhee J, Lubin M, Dawson TM. NMDA-R1 subunit of the cerebral cortex co-localizes with neuronal nitric oxide synthase at pre- and postsynaptic sites and in spines. *Brain Res* 1997; 750: 25-40.
- Asako H, Kubes P, Wallace JL, Wolf RE, Granger DN. Modulation of leukocyte adherence in rat mesenteric venules by aspirin and salicylate. *Gastroenterology* 1992; 103: 146-152.
- Avila JR, Alarcón de la Lastra C, Martín MJ, Motilva V, Luque I, Delgado D, Esteban J, Herrerías J. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophils infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflamm Res* 1996; 45: 83-88.
- Aycock DG. Ibuprofen: a monograph. *Am Pharm* 1991; 31: 46-49.
- Baader SL, Schilling K. Glutamate receptors mediate dynamic regulation of nitric oxide synthase expression in cerebellar granule cells. *J Neurosci* 1996; 16: 1440-1449.
- Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B. Inhibitors of endogenous nitrosation: mechanisms and implications in human cancer prevention. *Mutat Res* 1988; 202: 307-324.

- Bauer JA, Booth BP, Fung HL. Nitric oxide donors: biochemical pharmacology and therapeutics. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 361-381.
- Beckmam JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271 (5 Pt 1): C1424-1437.
- Belmont HM, Levartovsky D, Goel A, Amin A, Giorno R, Rediske J. Increased nitric oxide production accompanied by the up-regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40 (10): 1810-1816.
- Benjamin N, Pattullo S, Weller R, Smith L, Ormerod A. Wound licking and nitric oxide. *Lancet* 1997; 349: 1776.
- Bhat GK, Mahesh VB, Lamar CA, Ping L, Aguan K, Brann DW. Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus: association with gonadotropin-releasing hormone neurons and co-localization with N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroendocrinology* 1995; 62: 187-197.
- Billiar TR. Nitric oxide: novel biology with clinical relevance. *Ann Surg* 1995; 221: 339-349.
- Bjarnason I, Somasundaram S, Hayllar H, Rafi S, Wrigglesworth JM, Macpherson AJ. The biochemical basis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced damage to the gastrointestinal. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30 (4): 289-299.
- Bogle RG, Baydoun AR, Pearson JD, Mann GE. Regulation of l-arginine transport and nitric oxide release in superfused porcine aortic endothelial cells. *J Physiol* 1996; 490: 229-241.
- Boucher JL, Custot J, Vadon S, Delaforge M, Lepoivre M, Tenu JP, Yapo A, Mansuy D. N-hydroxyarginine, an intermediate in the L-arginine to NO pathways, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 1614-1621.
- Boughton S, Hutcheson IR, Deakin AM, Whittle BJ, Moncada S. Protective effect of S-nitroso-N-acetyl-penicillamine in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Eur J Pharmacol* 1990; 191: 485-488.

- Boughton S, Deakin AM, Whittle BJ. Actions of nitric oxide on the acute gastrointestinal damage induced by PAF in the rat. *Agents Actions* 1992; 3-9.
- Boyd SC, Sasame HA, Boyd MR. High concentration of glutathione in glandular stomach: possible implications for carcinogenesis. *Science* 1979; 205: 1010-1012.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682-685.
- Brown JF, Tepperman BL, Hanson PJ, Whittle BJ, Moncada S. Differential distribution of nitric oxide synthase between cell fractions isolated from the rat gastric mucosa. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 184: 680-685.
- Brown JF, Keates AC, Hanson PJ, Whittle BJ. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *Am J Physiol* 1993; 265: 418-422.
- Brzozowski T, Drozdowicz D, Szlachcic A. Role of nitric oxide and prostaglandins in gastroprotection induced by capsaicin and papaverine. *Digestion* 1993; 54: 24-31.
- Brzozowski T, Konturek SJ, Sliwowski Z, Szlachcic A, Hahn EG, Konturek SJ. Adaptative cytoprotection by ammonia and urea-urease system in the rat gastric mucosa. *J Physiol Pharmacol* 1995; 46: 471-488.
- Brzozowski T, Konturek SJ, Drozdowicz D, Dembinski A, Stachura J. Healing of chronic gastric ulcerations by L-arginine. Role of nitric oxide, prostaglandins, gastrin and polyamines. *Digestion* 1995; 56: 463-471.
- Brzozowski T, Konturek SJ, Sliwowski Z, Drozdowicz D, Zaczek M, Kedra D. Role of L-arginine, a substrate for nitric oxide synthase, in gastroprotection and ulcer healing. *J Gastroenterol* 1997; 32: 442-452.
- Buga GM, Griscavage JM, Rogers EN, Ignarro LJ. Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ Res* 1993; 73: 808-812.
- Buga GM, Singh R, Pervin S, Rogers NE, Schmitz DA, Jenkinson CP, Cederbaum SD, Ignarro LJ. Arginase activity in endothelial cells: inhibition by N-

hydroxyarginine during high-output NO production. *Am J Physiol* 1996; H1988-H1998.

- Busconi L, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem* 1993; 268: 8410-8413.
- Calatayud S, Ramírez MC, García Zaragoza E, Esplugues JV. Protección de la gastropatía por AINE mediante donadores de óxido nítrico. *Gastroenterología y Hepatología* 1998; 21; 26-33.
- Ceccatelli S, Grandison L, Scott RE, Pfaff DW, Kow LM. Estradiol regulation of nitric oxide synthase mRNAs in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1996; 64: 357-363.
- Clancy R, Abramson SB, Kohne C, Rediske J. Nitric oxide attenuates cellular hexose monophosphate shunt response to oxidants in articular chondrocytes and acts to promote oxidant injury. *J Cell Physiol* 1997; 172: 183-191.
- Cochran FR, Selph J, Sherman P. Insights into the role of nitric oxide in inflammatory arthritis. *Med Res Rev* 1996; 16 (6): 547-563.
- Cohen RA. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38: 105-128.
- Comporti M. Lipid peroxidation. Biopathological significance. *Mol Aspects Med* 1993; 14: 199-207.
- Cooke JP, Singer AH, Tsao PS, Zera P, Kowan RA, Billingham ME. Antiatherogenic effects of l-arginine in the hypercholesterolemic rabbits. *J Clin Invest* 1992; 90: 1168-1172.
- Cooper SA. Five studies on ibuprofen for postsurgical dental pain. *Am J Med* 1984; 77: 70-77.
- Cynober L. Can arginine and ornithine support gut functions. *Gut* 1994; 35 (1): S42-S45.
- Chang RH, Feng MH, Liu WH, Lai MZ. Nitric oxide increased interleukin-4 expression in T lymphocytes. *Immunology* 1997; 90: 364-369.

- Chomczynski P y Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
- Daghigh F, Fukuto JM, Ash DE. Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, N-hydroxyarginine: implications for the regulation of NO by arginase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202: 174-180.
- Davies NM, Seth AG, Appleyard CB. NO-naproxen vs naproxen: ulcerogenic, analgesic and antiinflammatory effects. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 69-79.
- Dawson TM, Steiner SP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR, Snyder SH. Immunosuppressant FK 506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1993; 90: 9808-9812.
- Del Soldato, Cuzzolin L, Adami A. Nitric oxide releasing NSAIDs, a novel class of safe and effective antiinflammatory agents. *Inflammopharmacology* 1996; 4: 181-188.
- Dembinska KA, Pallapies D, Simmet T, Peskar BM, Peskar BA. Effect of carbenoxolone on the biological activity of nitric oxide: relation to gastroprotection. *Br J Pharmacol* 1991; 104: 811-816.
- Desai K, Sessa W, Vane J. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* 1991; 351: 477-479.
- Devenyi ZJ, Orcharf JL, Powers RE, Xanthine oxidase activity in mouse pancreas: effects of caerulein-induced acute pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 149: 841-845.
- Elliot SN, Mcknight W, Cirino G, Wallace JL. A nitric oxide releasing nonsteroidal antiinflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology* 1995; 109: 524-530.
- Esteban Carretero J, Herrerías Esteban JM, Herrerías Gutiérrez JM. Oxido nítrico y metabolismo oxidativo: cara y cruz en patología inflamatoria gástrica. *Rev. Esp Enf Digest* 1996; 88 (6): 423-430.
- Farrell AJ, Blake DR. Nitric oxide. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 7-20.

- Ferraz JPG, Tigley A, Wallace JL. Paradoxical effects of L-arginine on gastric mucosal integrity. *Eur J Pharmacol* 1994; 260: 107-111.
- Fleming I, Busse R. Control and consequences of endothelial nitric oxide formation. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 187-206.
- Franco L y Doria D. Nitric oxide enhances prostaglandin production in ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Eur J Pharmacol* 1998; 348: 247-256.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
- Furchgott RF. The role of the endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1984; 24: 175-197.
- Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. *Vasodilation* 1988; IV; 401-414.
- García Gonzalez MA, Peña AS. Óxido nítrico y enfermedad inflamatoria intestinal. *Rev Esp Dig* 1998; 90 (12): 870-876.
- Green LC, Luzuriaga KR, Wagner DA. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7764-7768.
- Grisham MB, Granger DN, Benoit JN. Assessment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion of the intestine. *Methods in enzymology. Oxygen radicals in biological systems.* Packer I, Glazer AN (Eds). Academic Press, San Diego 1990; 729-741.
- Guidry JB, Ogburn CL, Griffin FM. Fatal autoimmune hemolytic anaemia associated with ibuprofen *JAMA* 1979; 242: 68-69.
- Halpern SM, Fitzpatrick R, Volans GN. Ibuprofen toxicity. A review of adverse reactions and overdose. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 1993; 12: 107-128.
- Hassall CJ, Saffrey MJ, Belai A, Hoyle CH, Moules EW, Moss J, Schmidt HH, Murad F, Forstermann U, Burnstock G. Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase activity in a subpopulation of intrinsic neurones of the guinea pig heart. *Neurosci Lett* 1992; 143: 65-68.



- Hatakeyama S, Kawai Y, Ueyama T, Senba E. Nitric oxide synthase-containing magnocellular neurons of the rat hypothalamus synthesize oxytocin and vasopresin and express fos following stress stimuli. *J Chem Neuroanat* 1996; 11: 243-256.
- Hecker M, Sessa W, Harris H, Ánggard E, Vane J. The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 8612-8616.
- Hecker M, Lückhoff A, Busse R. Modulation of endothelial autacoid release by protein kinase C: feed-back inhibition or non specific attenuation of receptor-dependent cell activation. *J Cell Physiol* 1993; 156: 571-578.
- Herdegen T, Brecht S, Mayer B, Leah J, Kummer W, Bravo R, Zimmermann M. Long-lasting expression of jun and krox transcription factors and nitric oxide synthase in intrinsic neurons of the rat brain following axotomy. *J Neurosci* 1993; 13: 4130-4145.
- Hishikawa K, Nakaki T, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Role of L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension. *J Hypertens* 1993; 11: 639-645.
- Holstad M, Jansson L, Sandler S. Inhibition of nitric oxide formation by aminoguanidine: an attempt to prevent insulin-dependent diabetes mellitus. *Gen Pharmacol* 1997; 29 (5): 697-700.
- Huertas JR, Battino M, Mataix FJ, Lenaz C. Cytochrome oxidase induction after oxidative stress induced by adriamycin in liver of rats fed with dietary olive oils. *Colloids* 1991.
- Huk I, Nanobashvili J, Punz A, Lassner H, Mueller M, Siegl H, Neumayer CH, Mittloboeck M, Roth E. Influence of a short-term acute ischemia and reperfusion on skeletal muscle metabolism and morphology in rabbits. *Int J Angiol* 1996; 5: 59-63.
- Hussar DA, Hodge NA. Ibuprofen. *Am Pharm* 1985; 25: 51-54.
- Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25: 171-191.

- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide elicited vascular smooth muscle relaxation. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 1988; 244 (1): 181-189.
- Ignarro LJ. Transcriptional regulation of inflammatory nitric oxide synthase by antioxidants, metal chelators, proteasome inhibitors and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Nitric oxide: from discovery to the clinic* 1998:37.
- James G, Paul K, Fuller J. Urinary nitrite and urinary tract infection. *Am J Clin Pathol* 1978; 70: 671-678.
- Kenneth KW. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol* 1995; 33: 179-207.
- Kervin JF, Lancaster JR, Feldman PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 1995; 38: 4343-4362.
- Kiechle FL, Malinski T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 567-575.
- Kim H, Kim KH. Role of nitric oxide in oxidative damage in isolated rabbit gastric cells exposed to hypoxia-reoxygenation. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1042-1049.
- Kitagawa H, Takeda F, Kohei H. Effect of endothelium-derived relaxing factor on the gastric lesion induced by HCl in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253: 1133-1137.
- Klebanoff SJ. Phagocytic cells: Products of oxygen metabolism. *En Inflammation: basic principles and clinical correlates*. Gallin JL, Goldstein MI, Snyderman R (eds) Raven Press, New York 1988: 391-444.
- Knowels RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5159-5162.
- Knowels RG, Merret M, Salter M, Moncada S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J* 1990; 270: 833-836.

- Konturek SJ, Brzozowski T, Majka J, Czarnobilski K. Role of nitric oxide and prostaglandins in sucralfate-induced gastroprotection. *Eur J Pharmacol* 1992; 211: 277-279.
- Konturek SJ, Brzozowski T, Majka J, Pytko-Polonczyk J, Stachura J. Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers. *Eur J Pharmacol* 1993; 239: 215-217.
- Konturek PC, Brzozowski T, Sliwowski Z, Pajdo R, Stachura J, Hahn EG, Konturek SJ. Involvement of nitric oxide and prostaglandins in gastroprotection induced by bacterial lipopolysaccharide. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 691-700.1998.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc natl Acad Sci USA* 1991; 88 (11): 4651-4655.
- Kwon NS, Stuehr DJ, Nathan CF. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med* 1991; 174: 761-767.
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1992; 89: 6348-6352.
- Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952-958.
- Liew FY. Interactions between cytokines and nitric oxide. *Adv Neuroimmunol* 1995; 5 (2): 201-209.
- Liew FY. Nitric oxide in infectious and autoimmune diseases. *Ciba Found Symp* 1995; 195: 234-239.
- Liu Q, Arkins S, Biragyn A, Minshall C, Parnet P, Dantzer R, Kelley KW. Competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction using a synthetic internal RNA standard to quantitate transcripts for leukocyte-derived hormones. *Neuroimmun* 1994; 1: 33-41.
- López Belmonte J, Whittle BJR, Moncada S. The actions of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the gastric mucosa. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 73-78.

- López Belmonte J. Aminoguanidine provoked leukocyte adherence to rat mesenteric venules: role of constitutive nitric oxide synthase inhibition. *Br J Pharmacol* 1995; 116 (6): 2710-2714.
- Luk GD. Essential role of polyamine metabolism in hepatic regeneration. *Gastroenterology* 1986; 90: 1261-1267.
- Lundberg JON, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K. Intra-gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* 1994; 35: 1543-1546.
- Lyons CR. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol* 1995; 60: 323-371.
- Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988; 27: 8706-8711.
- Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FASEB Lett* 1992; 307: 287-293.
- Martín MJ, Jiménez MD, Alarcón De La Lastra C, La Casa C, Herrerías JM, Bruseghini L, Esteras A, Motilva V. Protective effect of L-arginine against ibuprofen-induced gastric injury in rats. *Pharm Sci* 1997; 3: 609-612.
- Martín MJ, La Casa C, Alarcón de la Lastra C, Cabeza J, Villegas I, Motilva V. Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. *Z Naturforsch* 1998; 53c: 82-88.
- Martínez-Cuesta MA, Barrachina MD, Whittle BJR, Piqué JM, Esplugues JV. Involvement of neuronal processes and nitric oxide in the inhibition by endotoxin of pentagastrin-stimulated gastric acid secretion. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 1994; 349: S23-S27.
- McCafferty D, Mudgett M, Swain M, Kubes P. Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation. *Gastroenterology* 1997.
- McCord CP, Fridovich I. Superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1989; 244: 6049-55.

- Melkova Z, Lee SB, Rodriguez D, Esteban M. Bcl-2 prevents nitric oxide mediated apoptosis and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. *FEBS Lett* 1997; 403: 273-278.
- Merryman PF, Clancy RM, He XY, Abramson SB. Modulation of human T cell responses by nitric oxide and its derivative, S-nitrosoglutathione. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1414-1422.
- Mills CD. Molecular basis of "suppressor" macrophages: arginine metabolism via the nitric oxide synthase pathway. *J Immunol* 1991; 146: 2719-2723.
- Mitchell J, Cirino G, Akarasereenont P. Flurbiprofen: a novel anti-inflammatory drug devoid of ulcerogenic activity, inhibits cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72: 270.
- Mitjavila MT, Carbonell T. Un nuevo mediador de la inflamación. *Mundo científico* 1997; 177: 275-277.
- Miyamoto S, Verma IM. Rel/NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B story. *Adv Canc Res* 1995; 66: 255-292.
- Moncada S, López Jaramillo P. La actividad biológica del endotelio vascular. *Investigación y Ciencia* 1991; 176: 60-66.
- Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995; 9: 1319-1330.
- Muscara MN. Effect of a nitric oxide releasing naproxen derivative on hypertension and gastric damage induced by chronic nitric oxide inhibition in rat. *Life Sci* 1998; 62: 235-240.
- Nagoshi S, Ohta Y, Matsui A, Fujiwara K. Protective action of putrescine against rat liver injury 1994; 29: 166-171.
- Nakaki T, Kato R. Beneficial circulatory effect of L-arginine. *Jpn J Pharmacol* 1994; 66: 167-171.
- Nakane M, Mitchell J, Forstermann U, Murad F. Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C vasodilation in patients with to oxide synthase. *Biochem Biophys Res commun* 1991; 180: 1396-1402.

- Nathan C, Xie Q. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 13725-13728.
- Nathan C. Perspectives series: nitric oxide and nitric oxidesynthases. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?. *J Clin Invest* 1997; 100: 2417-2423.
- Navarro C, Escolar G, Baños JE, Casanovas CJ, Bulbena O. Effect of zinc acexamate on gastric mucosal production of prostaglandin E2 in normal and stressed rats. *Essencial Fatty Acids* 1988; 33: 75-80.
- Navin A, Paterson WG. Role of nitric oxide in esophageal peristalsis. *Am J Physiol* 1994; 266: G123-G131.
- Neurath MF, Pettersson S, meyer Zum Buschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF- $\kappa$ B abrogates established experimental colitis in mice. *Nature Med* 1996; 2 (9): 998-1004.
- Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 2092-2096.
- Nussler Ak, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993; 54 (2): 171-178.
- O'Brien WM, Bagby GF. Rare adverse reactions to nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Rheumatol* 1985; 12: 13-20.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxide for animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.
- Moncada S, Palmer M, Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.

- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric Oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
- Palmer RM, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158: 348-352.
- Parkinson JF, Mitrovic B, Merrill JE. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *J Mol Med* 1997; 75 (3): 174-186.
- Pérez Sala D, Díaz Cazorla M, Navarro Antolín J, Saura M, Lamas S. Modulatory roles of tetrahydrobiopterin and nitric oxide on gene expression in mesangial and endothelial cells. *Nitric oxide: from discovery to the clinic* 1998:30.
- Piqué JM, Whittle BJ, Esplugues JV. The vasodilatador role of endogenous nitric oxide in the rat gastric microcirculation. *Eur J Pharmacol* 1989; 174: 293-296.
- Pozo D, Segura J, Carrero I, Guijarro L, Prieto J, Calvo J. Characterization of adenylyl cyclase stimulated by VIP in rat and mouse peritoneal macrophage membranes. *Biochem Biophys Act* 1996; 1312: 249-254.
- Prince J, Hanson PJ, Whittle BJR. Stimulation by carbachol of mucus gel thickness in rat stomach involves nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1994; 263: 199-202.
- Ragheb M. Ibuprofen can increase serum lithium level in lithium-treated patients. *J Clin Psychiatr* 1987; 48: 161-163.
- Rand M. NANC transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic neuro-effector transmission. *Clin Exp Pharma Physiol* 1992; 184: 680-685.
- Redack KL, Deck CC, Bloomfield SS. Ibuprofen interferes with the efficacy of antihypertensive drugs: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ibuprofen compared with acetaminophen. *Ann Intern Med* 1987; 107: 628-635.
- Reis DJ, Li G, Regunathan S. Endogenous ligands of imidazoline receptors: classic and immunoreactive clonidine displacing substance (CDS) and agmatine. *Ann NY Acad Sci* 1995; 763: 295-313.
- Rengasamy A, Johns RA. Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Mol Pharmacol* 1993; 44: 124-128.

- Richter C, Gogvadze V, Schlapbach R, Schweizer M, Schlegel J. Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1143-1150.
- Robinson LJ. The constitutive endothelial NO synthase gene: implications for its evolution and cellular regulation. In the biology of nitric oxide, S. Moncada (ed), Portland Press (London), 1995.
- Rogler G, Vogl D, Brand K, Hofmeister R, Andus T, Schoelmerich J. Transcription nuclear factor kappa B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1997; 112 (4): A 1077.
- Salvemini D, Misko T, Masferrer J, Seibert K, Currie M, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7240-7244.
- Sanders KM y Eard S. Nitric oxide as a mediator of non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 1992; 262: G379-G392.
- Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell* 1994; 78 (6): 919-925.
- Snyder SH, Brecht DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* 1992; 266: 68-71.
- Snyder SH, Brecht DS. Funciones biológicas del óxido nítrico. *Investigación y Ciencia* 1992: 12-20.
- Spiegelhalter B, Eisenbrand G, Preussman R. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Cosmet Toxicol* 1976; 14: 545-548.
- Stark ME y Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology* 1992; 103: 1928-1949.
- Steiner AL, Racine-Weisbuch MS, Delaage MA. *Anal Biol Chem* 1973; 56: 304-309.
- Stuehr DJ, Gross SS, Sakuma I, Levi R, Nathan CF. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J Exp Med* 1989; 169: 1011-1020.
- Singh G. Recent considerations in nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Am J Med* 1998; 27: 31S-38S.



- Szabó C. The role of peroxynitrite in the pathophysiology of shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 1996; 6: 79-88.
- Takakura K, Hasegawa K, Goto Y, Muramatsu I. Nitric oxide produced by inducible nitric oxide synthase delays gastric emptying in lipopolysaccharide-treated rats. *Anesthesiology* 1997; 87: 652-657.
- Takeuchi K, Ohuchi T, Miyake H, Sugawara H, Okade S. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on gastric alkaline secretion in rats. *JPN Pharmacol* 1992; 60: 303-305.
- Takeuchi K, Tomohisa O, Shinichi K, Okabe S. Cytoprotective action of L-arginine against HCl-induced gastric injury in rats: Involvement of nitric oxide?. *Jpn J Pharmacol* 1993; 61: 13-21.
- Takeuchi K, Ohuchi T, Miyake H, Okade S. Stimulation by nitric oxide synthase inhibitors of gastric and duodenal  $\text{HCO}_3^-$  secretion in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 266: 1512-1519.
- Tannenbaum SR, Sisnkey AJ, Weissman M, Bioshop W. Nitrite in human saliva. Its possible relationship to nitrosamine formation. *J Cancer Inst* 1974; 53: 79-84.
- Tannenbaum SR, Weissman M, Fett D. The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Food Cosmet Toxicol* 1976; 14: 549-552.
- Tayeh MA, Marletta MA. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate. *J Biol Chem* 1989; 264: 19654-19658.
- Terada LS, Leff JA, Repine JE. Measurement of xanthine oxidase in biological tissue. *Merh Enzymol.* 1990; 186:651-657.
- Torres G y Rivier C. Induction of c-fos in rat brain by acute cocaine and fenfluramine exposure: a comparasion study. *Brain Res* 1994; 647: 1-9.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 7350-4354.
- Ukawa H, Yamakuni H, Kato S, Takeuchi K. Effects of cyclooxygenase-2 selective and nitric oxide releasng nonsteroidal antiinflammatory drugs on mucosal

ulcerogenic and healing responses of the stomach. *Dig Dis Sci* 1998; 43 (9): 2003-2011.

- Vane JR, Mitchell JA, Apleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxyall J, Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and NO synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2046-2050.
- Wallace JL, Keenan CM, Granger DN. Gastric ulceration induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *Am J Physiol* 1990; 259: G462-G467.
- Wallace JL, Granger DN. Pathogenesis of NSAID gastropathy: are neutrophils the culprits?. *TIPS* 1992; 13: 129-131.
- Wallace JL, Reuter B, Cicala C. Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat. *Gastroenterology* 1994; 107: 173-179.
- Wallace JL, McKnight W, Wilson TL, Del Soldato P, Cirino G. Reduction of shock-induced gastric damage by nitric oxide releasing aspirin derivate: role of neutrophils. *Am J Physiol* 1997; 273: G246-G251.
- Wallace JL. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology* 1997; 112: 1000-1016.
- Welch G y Loscalzo J. Nitric oxide and the cardiovascular system. *J Cardiovascular Surg* 1994; 9: 361-371.
- Weller R, Pattullo S, Smith L, Golden M, Ormerod A, Benjamin N. Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 327-331.
- Whelton A, Stout RL, Spilman PS. Renal effects of ibuprofen, piroxicam and sulindac in patients with asymptomatic renal failure. *Ann Intern Med* 1990; 112: 568-576.
- Whiteside ST, Epinat JC, Rice NR, Israel A, I kappa B epsilon, a novel member of the I-kappa B family, controls relA and c-Rel NF-kappa B activity. *EMBO Journal* 1997; 16 (6): 1413-1426.

- Whittle BJR, López Belmonte J, Moncada S. Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 99: 607-611.
- Whittle BJR, Tepperman BL. Role of the endogenous vasoactive mediators, nitric oxide, prostanoids and sensory neuropeptides in the regulation of gastric blood flow and mucosal integrity. In *Mechanism of injury, protection and repair of the upper gastrointestinal tract* (ed. A. Garner, P. E. O'Brien) 1991, John Wiley and Sons, Chichester, 127-137.
- Whittle BJ, López Belmonte J, Moncada S. Nitric oxide mediates rat mucosal vasodilation induced by intragastric capsaicin. *Eur J Pharmacol* 1992; 218: 339-341.
- Whittle BJ. Nitric oxide in gastrointestinal physiology and pathology. En: Johnson LR, editos. *Physiology of the gastrointestinal tract* (3ª ed.). Nueva York: Raven Press, 1994; 267-294.
- Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313 (Pt1): 17-29.
- Worthington DJ, Rosemeyer MY. Human glutathione reductase: Purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur J Biochem* 1974; 48: 167-177.
- Wu W, Schinco Y. Expression of c-jun and neuronal nitric oxide synthase in rat spinal motoneurons following axonal injury. *Neurosci Lett* 1994; 179: 157-161.
- Xu DL, Martín PY, John J, tsai P, Summer SN, Ohara M, Kim JK, Schrier RW. Upregulation of endothelial and neuronal constitutive nitric oxide synthase in pregnant rats. *Am J Physiol* 1996; 271: R1739-R1745.
- Yamada T, Grisham M. Pathogenesis of tissue injury: role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen. In: targan-SR SF, ed. *Inflammatory bowel disease: from beach to bedside*, baltimore: Williams and Wilkins; 1994: 133-150.
- Yamamoto H, Hirata T, Sugawa Y, Kato S, Takeuchi K. Inducible types of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in adaptive citoprotection rat stomachs. *Dig Dis Week* 1998, 16-22.

- Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Linuma S, Ichikawa H, Yasuda M, Takahashi S, Kondo M. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut* 1993; 34: 732-737.
- Yoshikawa T, Naito Y. Reperfusion injury in gastric mucosa. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 273: 208-217.
- Yoshikawa T, Yoshida N, Sugimoto N, Kondo M. Neutrophil-endothelial cell interactions in gastrointestinal diseases. *Nippon Rinsho* 1998; 56 (9): 2240-2246.
-

## **VIII- NOMENCLATURA**

AG	Aminoguanidina	IL-2 $\alpha$	Interleucina 2 alfa
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos	IL-8	Interleucina 8
ATP	Adenosín-trifosfato	L-arg	L-arginina
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina	L-lys	L-lisina
BSH	2 $\beta$ - mercaptoetanol	L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina-metil-éster
CaM	Complejo calcio-calmodulina	L-NMMA	N <sup>G</sup> -monometil-L-arginina
Cit C	Citocromo c	L-NNA	N <sup>o</sup> -nitro-L-arginina
COX	Ciclooxigenasa	LPS	Lipopolisacárido
D-arg	D-arginina	LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
DTNB	5,5' -ditiobis-2 nitrobenzoico	MDA	Malonildialdehido
DTT	Ditiotreitinoína	MI	Mononitrto de isosorbida
EDRF	Factor Relajante Derivado del Endotelio	MPO	Mieloperoxidasa
EDTA	Etilen-diamino-tetraacético	MSP	Misoprostol
EGTA	Etilenglicol bis( $\beta$ -aminoetil eter) N,N, N',N' -tetraacético	NANC	Fibras noradrenergicas nocolinérgicas
FSM	Flujo sanguineo mucosal	NF- $\kappa$ $\beta$	Factor nuclear kappa beta
GCs	Guanililciclaza soluble	NMDA	N-metil-D-aspartato
Glu	Glutamato	NO	Oxido nítrico
GMPC	Guanidín monofosfato cíclico	NOS	Oxido nítrico sintetasa
GSH	Glutation reducido	NOSe	Oxido nitrico sintetasa endotelial
GSH-Px	Glutation peroxidasa	NOSi	Oxido nitrico inducible
GSSG	Glutation oxidado	NOSn	Oxido nitrico sintetasa neuronal
GSSG-Rd	Glutation reducido	NOS <sub>t</sub>	Oxido nítrico sintetasa total
H/E	Hematoxilina-eosina	O <sub>2</sub> '	Radical superóxido
HETAB	Bromuro de hexadecil-trimetilamonio	PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
HNO	Acido. nitroso	PKC	Protein- quinasa C
I $\kappa$ $\beta$	Inhibidores kappa beta	PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
IB	Ibuprofeno	PMN	Neutrófilos
IB/L-arg	Ibuprofeno/L-arginina	PMSF	polimorfonucleares
IFN- $\gamma$	Interferón gamma	RAN	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta	RIA	Ranitidina
IL-2	Interleucina 2		Radioinmunoanálisis

RLO	Radicales libres de oxígeno
ROX	Roxatidina
RT-PCR	Retrotranscripción y amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Tricloroacético
TGI	Tracto gastrointestinal
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa.
XDH	Xantina deshidrogenasa
XO	Xantina oxidasa

**IX- TABLAS Y FIGURAS**



## TABLAS

Tabla 1- Aspectos diferenciales de la NOS.....	3
Tabla 2- Procesos fisiológicos gástricos en los que participa el NO.....	36
Tabla 3- Parámetros farmacocinéticos de IB/L-arg 400 mg.....	51
Tabla 4- Estudios toxicológicos de Espidifen <sup>®</sup> vs IB.....	58
Tabla 5- Protección gástrica de diferentes dosis de L-arginina en presencia de IB.....	97
Tabla 6- Efectos protectores de L-arginina y fármacos de referencia.....	100
Tabla 7- Efectos de L-arginina tras su administración oral e intraperitoneal.....	102
Tabla 8- Efectos de diferentes dosis de IB/L-arg vs IB sobre la actividad MPO.....	107
Tabla 9- Efectos sobre PL, XO y MPO de IB/L-arg vs IB.....	111
Tabla 10- Efectos sobre el metabolismo del glutation de IB/L-arg vs IB.....	112
Tabla 11- IU tras la administración de inhibidores selectivos- no selectivos de NOS.....	117
Tabla 12- Actividad de NOS <sub>e</sub> y NOS <sub>i</sub> .....	119
Tabla 13- Variaciones de GMP <sub>c</sub> a lo largo del tiempo.....	121

## FIGURAS

Figura 1- Reacción de síntesis del óxido nítrico.....	8
Figura 2- Estructura de los dominios de NOS <sub>e</sub> , NOS <sub>n</sub> , NOS <sub>i</sub> .....	9
Figura 3- Acciones relacionadas con la actividad NOS.....	14
Figura 4- Modelo de activación del NFκB.....	15
Figura 5- Mecanismo de acción del NO sintetizado por NOS <sub>e</sub> .....	19
Figura 6- Receptor del NO, enzima GC.....	21
Figura 7- Mecanismos relacionados con la activación de receptores glutamato.....	23
Figura 8- Consecuencias del aumento en los niveles de NO mediado por NOS <sub>i</sub> .....	24
Figura 9- Vía de activación de NOS <sub>i</sub> y mecanismo de acción de NO.....	25

Figura 10- El óxido nítrico es un híbrido de resonancia.....	26
Figura 11- Formación de NO y anión superóxido. Formación de peroxinitritos.....	27
Figura 12- Activación e inhibición de NO por macrófagos y neutrófilos.....	29
Figura 13- Vías de reducción de los nitratos a NO <i>in vivo</i> .....	30
Figura 14- Ruta biosintética de NO a partir de compuestos de la dieta.....	31
Figura 15- Producción de ácido dehidroascórbico en presencia de NO y vitamina C.....	31
Figura 16- Producción de NO no enzimático.....	32
Figura 17- Vías de generación y efectos antibacterianos del NO.....	34
Figura 18- Modelo de regulación de la actividad COX por el NO.....	39
Figura 19- Interacciones de las isoformas COX y NOS.....	40
Figura 20- Estructura del aminoácido L-arginina.....	42
Figura 21- Síntesis de poliaminas a partir de ornitina.....	43
Figura 22- Formación de prolina .....	43
Figura 23- Concentración plasmática de IB 400 e IB 200 mg.....	46
Figura 24- IB 400 mg vs paracetamol y codeína.....	50
Figura 25- Curvas de absorción de IB/L-arg vs IB.....	53
Figura 26- Peroxidación lipídica mediada por radicales libres.....	72
Figura 27- Formación de RL en neutrófilos y enzimas implicadas.....	73
Figura 28- Formación de haluros y tiocianatos por la enzima MPO.....	74
Figura 29- Reacciones de XO y XDH.....	77
Figura 30- Actividad de SOD.....	77
Figura 31- Medida de citocromo c reducido.....	78
Figura 32- Reacción de la GSSG-Rd.....	79
Figura 33- Cambios asociados a la enzima GSH-Px.....	81
Figura 34- Formación de NO a partir de NOS.....	84
Figura 35- Técnica de PCR.....	88
Figura 36- Efectos sobre el IU (mm <sup>2</sup> ) de diferentes dosis de IB/L-arg e IB.....	96
Figura 37- Mucosa gástrica de un animal tratado sólo con el vehículo.....	98
Figura 38- Mucosa gástrica de un animal tratado con IB 0.6 mM/kg.....	98
Figura 39- Mucosa gástrica de un animal tratado con IB 0.6/L-arg 0.6 mM/kg.....	98

Figura 40- Efectos protectores de L-arg y fármacos de referencia.....	99
Figura 41- Efectos sobre el IU de IB/L-arg vs IB a lo largo del tiempo.....	101
Figura 42- Efectos de L-arg tras su administración oral e intraperitoneal.....	103
Figura 43- Mucosa gástrica intacta de rata, zona corpus (H/E 100x).....	105
Figura 44- Lesión de IB 0.6 mM/kg (H/E 100x).....	105
Figura 45- Lesión de IB 0.6/L-arg 0.6 mM/kg (H/E 100x).....	105
Figura 46- Detalle de los vasos localizados en la muscularis mucosa.....	106
Figura 47- Ampliación del detalle de los vasos localizados en la muscularis mucosa.....	106
Figura 48- Efectos sobre el IU y MPO de diferentes dosis de IB/L-arg vs IB.....	108
Figura 49- Efectos sobre el IU y PL de IB/L-arg vs IB tras 6 h de tratamiento.....	109
Figura 50- Efectos sobre el IU, XO y XDH IB/L-arg vs IB tras 6 h de tratamiento.....	110
Figura 51- Efectos sobre el IU y actividad SOD de IB/L-arg vs IB tras 6 h.....	113
Figura 52- Efectos sobre el IU y actividad GSH-Px de IB/L-arg vs IB tras 6 h.....	113
Figura 53- Respuesta ante donadores e inhibidores de NOS.....	114
Figura 54- IU obtenidos con MI/IB, IB/L-arg vs IB a diferentes tiempos.....	115
Figura 55- Valores de IU tras la administración de inhibidores selectivos-no selectivos de NOS.....	118
Figura 56- Medida de actividad NOSi con IB/L-arg e IB.....	120
Figura 57- Evolución de GMPc a diferentes tiempos.....	122
Figura 58 A- Expresión NOSi después de 90 min de tratamiento.....	123
Figura 58 B- Expresión NOSi después de 6 h de tratamiento.....	124
Figura 59- Niveles gástricos de PGE <sub>2</sub> , después de 90 min y 6 h de tratamiento.....	125
Figura 60- Expresión COX-1 y COX-2 después de 6 h de tratamiento.....	126

No Dices Timonet Corallo  
Necessarios Emplicados en lo Jastro-  
proteccion Mecanica Per Duploteo-  
L. aspirine .

Substancia "dem-  
vante" - por unidid de d.  
27 OCT 99

