



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

TESIS

**“EFECTO PROTECTOR DEL GLICOMACROPÉPTIDO, SOLO O COMBINADO CON
PROBIÓTICOS, SOBRE EL DAÑO GASTROINTESTINAL INDUCIDO POR
ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS”**

PRESENTA:

LIC. NUTRICIÓN ARMIDA IVETTE BAHENA DELGADO

**PARA OBTENER EL GRADO EN LA MAestrÍA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE
TOXICOLOGÍA**

TUTORA:

DRA. EVA MARÍA SALINAS MIRALLES.

CO-TUTOR:

DR. DANIEL CERVANTES GARCÍA.

ASESORA:

DRA. MA. CONSOLACIÓN MARTÍNEZ SALDAÑA

AGUASCALIENTES, AGS., MAYO DEL 2019

El premio reside en mis actos, no en sus efectos.

La recompensa está encerrada en lo hondo de mi respuesta, en esa parte central de mí ser de la que arranca toda acción, gracias a que los resultados son impredecibles ningún esfuerzo de mi parte está condenado al fracaso.

Incluso un fracaso no tomará la forma que imagino de antemano.

Ante el futuro sólo puedo decir:
"Será interesante ver qué ocurre."

Hugh Prather





M en C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **ARMIDA IVETTE BAHENA DELGADO** con ID 120444 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **EFFECTO PROTECTOR DEL GLICOMACROPÉPTIDO, SOLO O COMBINADO CON PROBIÓTICOS, SOBRE EL DAÑO GASTROINTESTINAL INDUCIDO POR ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS** y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 27 de Mayo del 2019.



Dra. Eva María Salinas Miralles
Tutora de tesis



Dr. Daniel Cervantes García
Co-Tutor de tesis



Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña
Asesora de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. De Microbiología
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

ARMIDA IVETTE BAHENA DELGADO
MAESTRIA EN CIENCIAS AREA TOXICOLOGIA

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“EFECTO PROTECTOR DEL GLICOMACROPEPTIDO, SOLO O COMBINADO CON PROBIOTICOS, SOBRE EL DAÑO GASTROINTESTINAL INDUCIDO POR ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS”** hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 27 de Mayo de 2019

“Se lumen proferre”

EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

AGRADECIMIENTOS

Durante esta etapa han sido muchas las personas que me han brindado de manera incondicional su apoyo, de modo que, a cada uno podría dedicarle planas enteras y aun así no serían suficientes para expresar todo lo que siento. Sin embargo, con la finalidad de ser un poco más concreta al respecto, le agradezco:

A la Dra. Eva Salinas, ya que al aceptarme me permitió descubrir el lugar al que pertenezco. Hubo momentos difíciles, pero definitivamente ame cada día en el laboratorio. Además, por usted aprendí a ser disciplinada, perseverante y dar lo mejor de mí.

Al Dr. Daniel Cervantes, pues me siento muy afortunada de haber sido su alumna, ya que con su apoyo y paciencia no sólo aprendí, también crecí como persona, y si ahora soy un poco mejor de lo que era al llegar, fue gracias a usted.

A la Dra. Ma. Consolación Martínez, por que este trabajo se ha enriquecido gracias a sus observaciones y consejos.

A la Dra. Esperanza Sánchez, por siempre hacer un espacio en su agenda y regalarme parte de su tiempo en cada protocolo.

A mis compañeros de laboratorio: La Dra. Mariela Jiménez (porque a pesar de tener tanto trabajo, siempre me apoyo con cada nuevo protocolo), Diana (porque nadie me entiende más que tú y gracias a ti hoy puedo decir que paso a pasito he llegado a la meta), Laura (porque la sabiduría en tus palabras eran como un rayito de luz al final de un camino escabroso), Vanessa (por tú apoyo y tantos momentos agradables que compartimos trabajando juntas), Bere (por tú tiempo, paciencia y apoyo), Oscar (por tus ocurrencias que siempre causaban polémica y risas), Caro (por estar ahí cuando todo inicio), Alicia, Leslie, Yailin, Fernanda, Pame y Ruth que me brindaron muchos gratos momentos y apoyo. Y por último a mis amigas Zitlaly, Viridiana, Lily, Cynthia, Jakelina y el molestiche de Cristian que con cada momento dentro y fuera del aula de clases, hicieron de esta etapa una de mis mejores experiencias. También le agradezco a Zahira, Nallely, Zariffu, Kary, Ale (mi cosa favorita), Héctor, Dani y Nao que sin importar el tiempo o distancia siempre estuvieron para motivarme a seguir adelante con un “si se puede” y tuvieron confianza plena en mi capacidad de llegar a la meta.

DEDICATORIA

Todo el trabajo y esfuerzo aquí reflejado para concluir con este proyecto, pude realizarlo gracias al apoyo constante que recibí de mi familia, por lo tanto, con la finalidad de expresar de manera más amplia un poco de lo mucho que me gustaría decirles, dedico este trabajo:

A mis padres Marco Antonio Bahena Ordaz y Aida Delgado López, quienes con su amor, paciencia, confianza y esfuerzo me han permitido cumplir un sueño más. Soy una persona realmente afortunada por tenerlos a mi lado, y no existen palabras suficientes que expresen de manera adecuada el tan inmenso amor que siento por ustedes, y el profundo agradecimiento que me inspira el apoyo que he recibido en todo momento, no sólo de ustedes, si no también de mis hermanas Aida Fabiola y Frida María.

Usualmente dicen que nadie nace sabiendo como ser una buena mamá o un buen papá, que guiar de manera adecuada a los hijos es una enorme responsabilidad y una labor sumamente compleja. Sin embargo, soy capaz de afirmar y sin temor de equivocarme, que pocas personas llegan a realizar un trabajo tan extraordinario como ustedes. Ambos, hacen de cada etapa de mi vida algo maravilloso y admiro profundamente los excelentes profesionistas que han sido, la constancia y firmeza en sus convicciones, la calidad humana que tienen y la disposición que siempre manifiestan por ayudar a los demás, así como también todas las habilidades que cada uno posee y que se ven reflajadas de algún modo en las habilidades e intereses que hemos desarrollado mis hermanas y yo.

Por otro lado, también me siento muy afortunada de tener la constante compañía de mis hermanas; esta vida habría sido inmensamente aburrida sin ustedes.

Les prometo siempre esforzarme al máximo para que con cada paso que doy se sientan orgullosos. Cada meta, logro o sueño que alcanzo es gracias al apoyo constante que recibo de ustedes. Los amo mucho.

1. ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA.....	6
1. ÍNDICE GENERAL	7
2. ÍNDICE DE FIGURAS	11
3. ÍNDICE DE TABLAS	13
4. ACRÓNIMOS	14
5. RESUMEN	17
6. ABSTRACT	18
7. ANTECEDENTES	19
7. 1 INFLAMACIÓN	19
7. 1. 1 INFLAMACIÓN AGUDA.....	19
7. 1. 2 INFLAMACIÓN CRÓNICA.....	20
7. 1. 3 MEDIADORES PROINFLAMATORIOS.....	21
7. 1. 4 MECANISMOS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.....	24
7.2 ANATOMÍA DE LA BARRERA GÁSTRICA.....	32
7. 3 ANATOMÍA DE LA BARRERA INTESTINAL.....	36
7. 3. 1 APORTE DE LA MICROBIOTA EN LA FUNCIÓN DE LA BARRERA INTESTINAL.....	40
7. 3. 2 TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LA MUCOSA INTESTINAL	42
7. 4 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs).....	45
7. 4. 1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	45
7. 4. 2 ESTRUCTURA QUÍMICA, CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS	46
7. 4. 3 MECANISMOS DE ACCIÓN.....	47
7. 4. 4 EFECTOS ADVERSOS GASTROINTESTINALES	51
7. 4. 4. 1 MECANISMOS DE DAÑO GÁSTRICO.....	52
7. 4. 4. 2 MECANISMOS DE DAÑO INTESTINAL (ENTEROPATÍA).....	54
7. 5 ALIMENTOS FUNCIONALES Y NUTRACÉUTICOS	60
7. 5. 1 PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LA LECHE Y SUS DERIVADOS.....	63
7. 5. 1. 1 GLICOMACROPÉPTIDO (GMP)	64

7. 5. 1. 1. 1 PROPIEDADES PREBIÓTICAS	65
7. 5. 1. 1. 2 PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS E INMUNORREGULADORAS	66
7. 5. 1. 1. 3 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES.....	67
7. 5. 2 PROBIÓTICOS	68
7. 5. 2. 1 LACTOBACILLUS: LACTOBACILLUS RHAMNOSUS	69
8. JUSTIFICACIÓN	72
9. HIPÓTESIS.....	74
10. OBJETIVOS	75
10. 1 OBJETIVO GENERAL:	75
10. 2 OBJETIVOS PARTICULARES:.....	75
11. METODOLOGÍA.....	76
11.1 ANIMALES.....	76
11. 2 GRUPOS Y PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	76
11. 3 CULTIVO Y ALMACENAMIENTO DEL LGG.....	78
11. 4 REGISTRO DE PESO CORPORAL.....	79
11. 5 REGISTRO DE INGESTA DE ALIMENTO Y DE AGUA.....	80
11. 6 MARCADORES BIOQUÍMICOS	80
11. 7 REGISTRO DEL PESO DE ÓRGANOS.....	80
11. 8 EVALUACIÓN DEL DAÑO GASTROINTESTINAL.....	81
11. 9 DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS HIDROPERÓXIDOS (LOOH), MEDIANTE EL MÉTODO DE XILENOL – NARANJA, EN TEJIDO GÁSTRICO E INTESTINAL.	81
11. 10 DETERMINACIÓN DE MIELOPEROXIDASA (MPO) EN TEJIDO GÁSTRICO E INTESTINAL.	83
11. 11 ANÁLISIS POR RT-qPCR DE LA EXPRESIÓN DE GENES INFLAMATORIOS EN TEJIDO INTESTINAL.....	84
11. 12 TIPO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LA INFORMACIÓN OBTENIDA	85
12. RESULTADOS.....	86
12. 1. CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO DE GASTROENTEROPATÍA POR LA ADMINISTRACIÓN DE AINES EN RATA WISTAR.	86

12. 1. 1 SUPERVIVENCIA DE LOS ANIMALES ADMINISTRADOS CON INDO	86
12. 1. 2 EFECTO DE LA INDO SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO Y LÍQUIDOS	88
12. 1. 3 EFECTO DE LA INDO SOBRE EL PESO CORPORAL.....	90
12. 1. 4 EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL DAÑO GASTROENTÉRICO	90
12. 1. 5 EFECTO DE LA INDO SOBRE LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS.....	93
12. 1. 6 EFECTO DE LA INDO SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EVALUADOS EN SUERO	94
12. 1. 7 DETERMINACIÓN DE LOOH EN MUESTRAS DE TEJIDO GÁSTRICO E INTESTINAL.....	97
12. 2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GMP, SOLO O COMBINADO CON PROBIOTICOS (LGG), SOBRE EL DAÑO GASTROENTÉRICO INDUCIDO POR AINES EN RATA WISTAR.....	98
12. 2. 2 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO.....	100
12. 2. 3 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL PESO CORPORAL DE LOS ANIMALES.....	100
12. 2. 4 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS LESIONES EN TEJIDO INTESTINAL DE RATAS ADMINISTRADAS CON INDOMETACINA.....	102
12. 2. 5 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL PESO DE ÓRGANOS EN RATAS ADMINISTRADAS CON INDOMETACINA.....	104
12. 2. 6 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN RATAS ADMINISTRADAS CON INDOMETACINA.....	106
12. 2. 7 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EVALUADOS EN SUERO DE RATAS ADMINISTRADAS CON INDOMETACINA.....	109

12. 2. 8 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA DETERMINACIÓN DE MPO EN MUESTRAS DE TEJIDO GÁSTRICO E INTESTINAL DE RATAS ADMINISTRADAS CON INDOMETACINA.	112
12. 2. 9 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA DETERMINACIÓN DE LOOH EN MUESTRAS DE TEJIDO GÁSTRICO E INTESTINAL DE RATAS ADMINISTRADAS CON INDOMETACINA.	113
12. 2. 10 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES INFLAMATORIOS EN TEJIDO INTESTINAL DE RATAS ADMINISTRADAS CON INDOMETACINA.	114
13. DISCUSIÓN	116
14. CONCLUSIONES.....	132
15. BIBLIOGRAFÍA	134



2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Activación del Factor NF-kB (Rahman & McFadden, 2011).	27
Figura 2. Respuesta inflamatoria (Ashley <i>et al.</i> , 2012).	31
Figura 3. Anatomía de la barrera gástrica (Laine <i>et al.</i> , 2008).	35
Figura 4. Anatomía de la barrera intestinal (Salvo-Romero <i>et al.</i> , 2015).....	44
Figura 5. Estructura química de algunos AINEs (Katzung <i>et al.</i> , 2010).....	46
Figura 6. Biosíntesis de prostaglandinas (Fitzgerald & Patrono 2001).....	48
Figura 7. Mecanismo de acción de los AINEs (Vonkeman <i>et al.</i> , 2006).....	52
Figura 8. Mecanismos de los AINEs para inducir daño gástrico (Sinha <i>et al.</i> , 2013).	54
Figura 9. Mecanismo de los AINEs para exacerbar la enteropatía (Wallace-, 2015).	56
Figura 10. Mecanismo de los AINEs para inducir enteropatía (Otani <i>et al.</i> , 2017)	58
Figura 11. Esquema del protocolo B de daño gastroentérico por AINEs.	77
Figura 12. Esquema del protocolo de daño gastroentérico por AINEs y de los tratamientos	78
Figura 13. Cinética de crecimiento del LGG.	79
Figura 14. Curva patrón para la determinación de LOOH.....	83
Figura 15. Supervivencia en un modelo de daño gastroentérico utilizando INDO.....	87
Figura 16. Supervivencia en un modelo de daño gastroentérico utilizando INDO. S	88
Figura 17. Efecto de la administración de INDO a los animales sobre la ingesta de alimento.	89
Figura 18. Efecto de la administración de INDO a los animales sobre la ingesta de líquidos.....	89
Figura 19. Efecto de la administración de INDO a los animales sobre la ganancia del peso corporal (%) de los animales.	90
Figura 20. Análisis macroscópico de tejido gástrico de animales administrados o no con indometacina.....	91
Figura 21. Análisis macroscópico de tejido intestinal de animales administrados o no con indometacina.....	91
Figura 22. Cantidad de úlceras (A) y área total de tejido intestinal ulcerado/rata (B) por la administración de la INDO.....	92
Figura 23. Efecto de la administración de INDO a los animales sobre parámetros hematológicos.....	94

Figura 24. Efecto de la administración de INDO a los animales sobre parámetros en suero. 96

Figura 25. Determinación de LOOH en tejido estomacal (A) e intestinal (B). 98

Figura 26. Efecto del GMP, solo o combinado con LGG, en la supervivencia de animales con daño GI por la administración de indometacina. 99

Figura 27. Consumo de alimento en ratas con gastroenteropatía por el uso de indometacina y efecto del tratamiento con GMP solo o combinado con LGG. 100

Figura 28. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con LGG, sobre la ganancia del peso corporal (%) de los animales administrados con indometacina. 101

Figura 29. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con LGG, sobre la ganancia de peso corporal (%) de los animales administrados con indometacina. 102

Figura 30. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre el daño macroscópico intestinal causado por la administración de la indometacina. 103

Figura 31. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre el área de intestino ulcerado en ratas administras con indometacina. 104

Figura 32. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre el peso del estómago en ratas administras con indometacina. 105

Figura 33. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre el peso del intestino delgado en ratas administras con indometacina. 105

Figura 34. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre el peso del estómago en ratas administras con indometacina. 106

Figura 35. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre parámetros hematológicos evaluados en ratas administras con indometacina. 108

Figura 36. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre parámetros evaluados en suero de ratas administras con indometacina. 111

Figura 37. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre la actividad de la enzima MPO en tejido estomacal (A) e intestinal (B) de ratas administradas con indometacina. 112

Figura 38. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre los niveles de LOOH en tejido estomacal (A) e intestinal (B) de ratas administradas con indometacina. 113

Figura 39. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre la expresión de genes inflamatorios en ratas administradas con indometacina. 115

3. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los AINEs en base a su estructura química..... 47

Tabla 2. Criterios FOSHU para la inclusión de alimentos funcionales 60

Tabla 3. Propiedades y beneficios para la salud de nutrientes y alimentos funcionales. .. 62

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión de genes inflamatorios 84

Tabla 5. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre los índices de Wintrobe..... 109



4. ACRÓNIMOS

AA: Ácido araquidónico

ACIPP: Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos.

Ag: Antígeno

AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos

AJ: Uniones adherentes

cAMP: Monofosfo de adenosina cíclico

CCK: Colecistoquinina

CD: Clúster de diferenciación

cGMP: Monofosfato de guanosina cíclico

CLR: Receptores de lectina tipo C

COX: Ciclooxygenasa

cPLA2: Fosfolipasas citoplasmáticas

CRF: Factor estimulante de la liberación de corticotropina.

CYP: Citocromo P

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daños

DC: Célula dendrítica

ECC: Células enteroendocrinas

EET: Ácidos epoxieicosatrienoicos

FAE: Epitelio folicular asociado

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FOSHU: Alimentos de uso específico para la salud

GALT: Tejido linfóide asociado al intestino

GAP: Uniones comunicantes

GI: Gastrointestinal

GLP: Péptidos similares al glucagón

GMP: Glicomacropéptido

GR: Glucocorticoides

HMGB: Proteína de la caja del grupo de alta movilidad

IBD: Enfermedad Inflamatoria Intestinal

ICAM: Molécula de adhesión intercelular

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina
IGF: Factor de crecimiento insulínico
IKK: Inhibidor de la quinasa kappa B
IL: Interleucina
INDO: Indometacina
iNOS: Enzima óxido nítrico sintetasa inducible
JAM: Moléculas de adhesión de unión
LGG: *Lactobacillus rhamnosus GG*
LOOH: Lípidos hidroperóxidos
LOX: Lipooxigenasa
LPS: Lipopolisacáridos
LRRs: Repeticiones ricas en leucina
LTs: Leucotrienos
LXs: Lipoxinas
MAdCAM: Molécula de adhesión celular adresina mucosal
MALT: Tejido linfoide asociado a la mucosa
Met: Metionina
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
MLN: Ganglios linfáticos mesentéricos
MUC: Mucinas
MyD88: Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide (88)
Mφ: Macrófago
NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NLR: Receptores tipo NOD
NLRP: Receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos
NO: Óxido nítrico
Nrf2: Factor de transcripción nuclear eritroide
OME: Omeprazol
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAF: Factor activador de las plaquetas
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos
PGs: Prostaglandinas

Phe: Fenilalanina
PLA₂: Fosfolipasa A₂
PMN: Neutrófilos polimorfonucleares
PP: Placas de Peyer
PPI: Inhibidores de la bomba de protones
PPRs: Receptores de reconocimiento de patrones
PYY: Péptido YY
RNS: Especies reactivas de nitrógeno
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SED: Cúpula subepitelial
sPLA₂: Fosfolipasas secretadasoras
TCR: Receptor de células T
TFF: Familia del factor de trébol
TGF β: Factor de crecimiento transformante-beta
Th: Linfocitos T colaboradores
TJ: Uniones estrechas
TLR: Receptores tipo Toll
TNF: Factor de necrosis tumoral
Treg: Células T reguladoras
Trp: Triptófano
TX: Tromboxanos
Tyr: Tirosina
UAA: Universidad Autónoma de Aguascalientes
VCAM: Molécula de adhesión vascular

5. RESUMEN

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen un grupo de fármacos con actividad antipirética, antiinflamatoria y analgésica, cuyo uso prolongado se asocia frecuentemente con efectos adversos gastrointestinales. El glicomacropéptido es uno de los principales péptidos bioactivos derivados de la leche, que por sus propiedades prebióticas, antioxidantes, antiinflamatorias e inmunorreguladoras presenta un perfil idóneo para tratar los efectos adversos inducidos por los AINEs. Por otro lado, el *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) es un probiótico de los más estudiados para tratar y/o prevenir enfermedades gastrointestinales. El objetivo de este proyecto fue evaluar si el pretratamiento con GMP, solo o combinado con LGG, tiene un efecto protector ante la gastroenteropatía inducida por el uso de los AINEs.

En este trabajo se utilizó la indometacina como AINE e inicialmente se estandarizó la dosis inductora de daño gastrointestinal en rata Wistar. Los resultados mostraron que con una dosis de 6 mg/kg los animales presentaron eritema y úlceras en la mucosa intestinal; disminuyeron la ingesta de alimento, la ganancia de peso, y los valores sanguíneos de hemoglobina, hematocrito, proteínas totales y albúmina, así como también incrementaron la lipoperoxidación gastrointestinal. Posteriormente se administró vía esofágica el pretratamiento con GMP (500 mg/kg/día), solo o combinado con el LGG (1×10^9 células) durante 14 días, adicionando los últimos 7 indometacina. Ambos pretratamientos disminuyeron el área de tejido ulcerado, aumentaron el peso y consumo de alimento de los animales, recuperaron los valores de hemoglobina, hematocrito, proteínas totales y albúmina, y disminuyeron la lipoperoxidación, la actividad mieloperoxidasa y la expresión de genes inflamatorios en tejido intestinal. La co-administración del LGG no mostró de forma general mejorar significativamente el efecto del GMP. En este trabajo se concluye que el tratamiento con GMP, sólo o combinado con LGG, tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes que ayudan a prevenir el daño entérico causado por el uso de AINEs.

6. ABSTRACT

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a group of drugs with antipyretic, anti-inflammatory and analgesic activity, whose prolonged use is frequently associated with gastrointestinal adverse effects. Glycomacropeptide is one of the main bioactive peptides derived from milk, that for its prebiotic, antioxidant, anti-inflammatory and immunoregulatory properties presents an ideal profile to treat the adverse effects induced by NSAIDs. Moreover, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) is one of the most studied probiotics to treat and/or prevent gastrointestinal diseases. The objective of this project was to evaluate if the pretreatment with GMP, alone or combined with LGG, has a protective effect against gastroenteropathy induced by NSAIDs.

In this work indomethacin was used as NSAID and initially the dose inducing gastrointestinal damage in Wistar rat was standardized. The results showed that with a dose of 6 mg/Kg the animals presented erythema and ulcers in the intestinal mucosa; decreased food intake, weight gain, and blood values of hemoglobin, hematocrit, total protein and albumin, furthermore they increased gastrointestinal lipoperoxidation. Subsequently, pre-treatment with GMP (500 mg/Kg/day), alone or combined with LGG (1×10^9 cells) was administered via esophageal for 14 days, adding the last 7 indomethacin. Both pretreatments decreased the area of ulcerated tissue, increased the weight and food intake of the animals, return to a normal value of hemoglobin, hematocrit, total proteins and albumin, and decreased lipoperoxidation, myeloperoxidase activity and the expression of inflammatory genes in intestinal tissue. The co-administration of LGG did not show to significantly improve the effect of GMP. In this work it's concluded that the treatment with GMP, alone or combined with LGG, has anti-inflammatory and antioxidant properties that prevent enteric damage caused by the use of NSAIDs.

7. ANTECEDENTES

7.1 INFLAMACIÓN

Etimológicamente el término inflamación se deriva de la palabra latina *inflammare*, que significa “encender fuego” (Scott *et al.*, 2004). Cornelius Celsus, hace aproximadamente 2000 años durante el siglo I A.C, fue el primero en describir los primeros cuatro signos cardinales del proceso inflamatorio, que macroscópicamente se reconocen por calor, rubor (enrojecimiento), tumor (hinchazón) y dolor (Cone, 2001; Alessandri *et al.*, 2013.). Posteriormente en 1871, Rudolph Virchow introdujo como quinto signo cardinal la pérdida de función, y lo declaró como inherentemente patológico (Chandrashekara, 2014).

La inflamación es un proceso fisiológico y adaptativo del huésped, que se produce en respuesta a patógenos invasores o después de una lesión del tejido, por lo tanto, consiste en una de las primeras barreras en contra de estímulos que pueden ser tanto externos como internos (Alessandri *et al.*, 2013; Baizabal-Aguirre *et al.*, 2014). En un nivel básico, implica el suministro coordinado de componentes sanguíneos (proteínas plasmáticas y leucocitos) al sitio de infección o lesión (Medzhitov, 2008). Esta migración se ve facilitada por cambios en la vasculatura local que favorecen vasodilatación y un incremento en la permeabilidad vascular y en el flujo sanguíneo (Ashley *et al.*, 2012).

La respuesta inflamatoria tiene como función principal neutralizar o eliminar rápidamente los estímulos perjudiciales y retirar el tejido dañado, con el objetivo de restaurar la homeostasis (Soehnlein & Lindbon 2010). Puede clasificarse en función de diversas cualidades como duración, distribución, naturaleza e incluso en función de su ubicación anatómica. Tomando como referencia su tiempo de duración, puede dividirse en aguda o crónica (Chandrashekara, 2014).

7.1.1 INFLAMACIÓN AGUDA

La inflamación aguda es un proceso de corta duración, por el cual la infección o lesión tisular son tratadas de forma organizada para eliminar la fuente subyacente de

alteración (Headland & Norling, 2015). Invariablemente, el reconocimiento inicial de daño se caracteriza por el reclutamiento de leucocitos de la circulación, clásicamente definido por el tráfico inicial de neutrófilos polimorfonucleares (PMN), seguido de monocitos, que se diferencian localmente en macrófagos (Gilroy & Lawrence, 2008). Los mastocitos tisulares y macrófagos residentes activan un sistema proinflamatorio en donde participan citocinas, quimiocinas, aminas vasoactivas, eicosanoides y productos de cascadas proteolíticas. Estos mediadores aumentan la permeabilidad vascular que favorece la afluencia de anticuerpos y otros componentes solubles para la opsonización de bacterias y la dilución de factores perjudiciales (Medzhitov, 2008; Headland & Norling, 2015).

La respuesta inflamatoria aguda, cuando es exitosa, da como resultado la eliminación de los agentes infecciosos o de daño. Sin embargo, para que esto ocurra antes debe llevarse a cabo una resolución de la inflamación, la cual consiste en un proceso activo y altamente regulado que da fin a la respuesta inflamatoria e inicia con la transición al estado de homeostasis (Medzhitov, 2010). Existen diversos mecanismos reguladores para la resolución de la inflamación, uno de ellos consiste en el cambio de prostaglandinas (PGs) proinflamatorias a lipoxinas (LXs) antiinflamatorias. Este mecanismo genera una transición en el reclutamiento de neutrófilos a monocitos que da como resultado la eliminación de las células muertas y otros desechos, de tal forma que se inicia con la reparación del tejido en el sitio afectado (Serhan & Savill, 2005).

7. 1. 2 INFLAMACIÓN CRÓNICA

En aquellas situaciones en donde el desencadenante inflamatorio persiste y no es eliminado por la respuesta inflamatoria aguda, no se induce la fase de resolución y se produce un estado inflamatorio crónico (Medzhitov, 2010). Además de los patógenos persistentes, la inflamación crónica puede ser el resultado de otras causas de daño tisular, como las respuestas autoinmunes o de cuerpos extraños no degradables (Medzhitov, 2008).

La inflamación crónica se caracteriza por la presencia de granulomas, que consisten en lesiones con abundantes células inmunitarias, en particular macrófagos y células T (Hansson *et al.*, 2002). Las características de este estado inflamatorio pueden

diferir dependiendo de la clase efectora de células T que están presentes (Medzhitov, 2008). Existen diversos estudios en donde se sugiere que el impacto de los procesos no resueltos puede estar implicado en la patogénesis y progresión de muchas enfermedades inflamatorias como asma, aterosclerosis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, rinitis y lesión por isquemia (Nathan & Ding, 2010; Alessandri *et al.*, 2013; Headland & Norling, 2015).

7. 1. 3 MEDIADORES PROINFLAMATORIOS

La alteración en los tejidos del huésped ya sea por microorganismos, lesión de tejido o trauma quirúrgico conduce a la liberación de mediadores químicos exógenos (en el caso de presencia de microorganismos) y endógenos que pueden ser secretados por células o derivarse de proteínas plasmáticas, para posteriormente producir un efecto sobre la vasculatura y el reclutamiento de leucocitos. Los mediadores químicos exógenos incluyen péptidos microbianos que actúan como quimioatrayentes para reclutar neutrófilos, mientras los mediadores químicos endógenos son liberados intencionalmente por las células que se infiltran en el sitio de lesión e incluyen a los eicosanoides y componentes del complemento (Serhan *et al.*, 2008). De acuerdo con sus propiedades químicas, los mediadores inflamatorios pueden clasificarse en siete grupos: aminas vasoactivas, péptidos vasoactivos, anafilatoxinas (componentes del complemento), mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas y enzimas proteolíticas (Medzhitov, 2008).

En el grupo de las aminas vasoactivas, destacan particularmente la histamina y la serotonina (Medzhitov, 2008). La histamina (2-[4-imidazol]-etilamina) tiene un efecto predominantemente vasodilatador, sin embargo, también puede llevar a cabo la contracción del músculo liso de los bronquios, estimular la permeabilidad vascular, la secreción del moco respiratorio y del ácido gástrico (Pearce., 1991; White, 1999; Mahdy & Webster, 2011). Entre otras células, la histamina se sintetiza en el citosol de mastocitos y basófilos mediante la descarboxilación del aminoácido L-histidina, para posteriormente almacenarse en sus gránulos, de tal forma que puede liberarse cuando estas células se desgranulan en respuesta a diversos estímulos inmunológicos (IgE y citocinas) y no inmunológicos (compuesto 48/80, ionóforo de calcio, soluciones hipoosmóticas, etc.) (Barnes, 2001; Castells, 2006). La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una molécula

que actúa como neurotransmisor, hormona y mitógeno (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008). Su presencia ha sido identificada en el sistema nervioso central (SNC), el tracto gastrointestinal (GI), en los pulmones, en los riñones y en las plaquetas sanguíneas (Lesurtel *et al.*, 2008; Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008). En la biología vascular causa vasoconstricción o vasodilatación dependiendo de los receptores de 5-HT que son expresados, las señales intracelulares a través de estos receptores y su localización; de modo que, tiene una participación fisiológica en funciones que van desde la resistencia vascular y la presión arterial hasta el control de la hemostasia y la función plaquetaria (Kaumann & Levy, 2006; Berger *et al.*, 2009). Para su formación el triptófano, un aminoácido esencial, se hidroliza a 5-hidroxitriptófano (5-HTP) mediante la triptófano hidroxilasa para posteriormente descarboxilarse y formar 5-HT (Barnes, 2001; Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008).

Los péptidos vasoactivos pueden ser almacenados en forma activa en vesículas secretoras (por ejemplo, sustancia P que es liberada por las neuronas sensoriales y puede provocar la desgranulación de los mastocitos) o generarse por el procesamiento proteolítico de precursores inactivos en el fluido extracelular (por ejemplo, quininas, fibrinopéptido A, fibrinopéptido B y productos de degradación de fibrina). Sin embargo, existen otros péptidos vasoactivos que se generan a través de la proteólisis por el factor de Hageman, trombina o plasmina causando vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular (directamente o induciendo la liberación de histamina de los mastocitos) (Medzhitov, 2008).

Las anafilatoxinas (C3a y C5a) son potentes mediadores inflamatorios, cuya actividad está regulada por carboxipeptidasas (Markiewski & Lambris, 2007). Participan en el reclutamiento de varios leucocitos en los sitios de inflamación durante la infección y la lesión tisular, de tal modo que, su efecto se debe principalmente a la activación de receptores en los mastocitos y basófilos, lo cual ocasiona su desgranulación y la liberación de mediadores vasoactivos o inflamatorios (histamina, citocinas, proteasas, quimiocinas, etc.) (Yang, 2013).

Los eicosanoides consisten en una familia de mediadores lipídicos que son fundamentales en la inducción y resolución del proceso inflamatorio. Con el inicio de la

respuesta inflamatoria, el incremento de iones Ca^{2+} favorece la activación de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) que libera el ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos de la membrana (Bojalil *et al.*, 2016). Posteriormente en el citosol, el AA puede metabolizarse a través de tres principales vías, de tal forma que las PGs y tromboxanos (Tx) se forman por acción de la enzima ciclooxigenasa (COX), los leucotrienos (LT) por lipoxigenasas (LOX) y los ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) por la enzima citocromo P (CYP)-450 (Rocha *et al.*, 2003; Dennis & Norris, 2015; Bennet & Gilroy, 2016). Por otro lado, el factor activador de las plaquetas (PAF, del inglés Platelet-Activating Factor) se sintetiza en los mastocitos y basófilos mediante la acilación del lisogliceril éter de fosforilcolina y activa varios procesos como broncoconstricción, la retracción de las células endoteliales y aumento de la permeabilidad vascular, entre otras (Abbas, 2012).

La interleucina (IL)-1, IL-6, y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α son citocinas proinflamatorias, secretadas de forma predominante por mastocitos y macrófagos activados (Zhang & An, 2007; Turner *et al.*, 2014). Las citocinas consisten en polipéptidos de señalización intercelular que poseen múltiples fuentes, objetivos y funciones, por lo tanto, se dice que poseen efectos pleiotrópicos (Gabay & Kushner, 1999; Sherwood & Toliver-Kinsky, 2004). Sin embargo, durante la respuesta inflamatoria algunas de las acciones que desempeñan son: inducir la expresión de moléculas de adhesión durante la migración leucocitaria y las células endoteliales; amplificar la liberación de intermediarios reactivos de oxígeno, óxido nítrico (NO), aminas vasoactivas y neuropéptidos e incrementar la permeabilidad vascular (Holdsworth & Gan, 2015; McInnes, 2017). Por otro lado, las quimiocinas inflamatorias consisten en un grupo de proteínas que tienen como función principal reclutar leucocitos en los sitios de infección o lesión, de tal forma que controlan la extravasación de leucocitos y su quimiotaxis. Son inducidas por macrófagos y mastocitos, así como también por una amplia variedad de células de tejidos, tales como células epiteliales, endoteliales y estromales (Luster & Maclean, 2001; Turner *et al.*, 2014; Yoshie & Matsushima, 2018).

Finalmente, el grupo de las enzimas proteolíticas (también denominadas proteinasas), incluye a todas aquellas enzimas que tienen función catalítica e hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas (Sanman & Bogyo, 2014). Según su mecanismo de catálisis y la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en el sitio activo, las

proteasas se pueden agrupar como: aspárticas, glutámicas, metaloproteinasas de la matriz extracelular, proteasas de asparagina, serin proteasas y proteasas de treonina (Mótyán *et al.*, 2013; Agbowuro *et al.*, 2017). Las proteinasas regulan el destino, la localización y la actividad de diversas proteínas, modulan las interacciones proteína-proteína, crean nuevas moléculas bioactivas, contribuyen al procesamiento de la información celular y generan, transducen y amplifican señales moleculares. Por lo tanto, juegan un papel importante en muchos procesos fisiológicos y patológicos, entre ellos la remodelación tisular, la reparación de heridas, la hemostasia, coagulación sanguínea, y la inflamación (López-Otín & Bond, 2008; Rani *et al.*, 2012).

7. 1. 4 MECANISMOS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

La respuesta inflamatoria consiste en una cascada regulada de procesos inmunológicos y fisiológicos, dirigidos por moléculas de señalización inmune llamadas citocinas (Ashley *et al.*, 2012). Dependiendo de la naturaleza del estímulo inflamatorio, varían las células y los receptores que desencadenan el proceso inflamatorio durante la infección o lesión (Karin *et al.*, 2006). Con frecuencia se señala que el principal factor que promueve la respuesta inflamatoria son los invasores microbianos. Sin embargo, las lesiones o traumatismos, la exposición a partículas extrañas, irritantes, o contaminantes, la isquemia y las quemaduras, son también potentes activadores de la inflamación (Medzhitov, 2008).

El primer paso de la cascada inflamatoria implica el reconocimiento de la infección o daño. Esto regularmente se logra mediante la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés Pathogen-Associated Molecular Patterns), que son moléculas expresadas específicamente por los microorganismos, o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, del inglés Damage-Associated Molecular Patterns), que son moléculas endógenas que señalan daño o necrosis y también son reconocidas por el sistema inmune innato (Ashley *et al.*, 2012). Muchas de las señales de peligro extra e intracelular son reconocidas por receptores codificados de la línea germinal, también denominados receptores de reconocimiento de patrones (PPRs, del inglés Pattern Recognition Receptor). Actualmente, se han identificado cuatro clases principales de familias de PRRs, entre los cuales se incluyen los receptores tipo Toll (TLR,

del inglés Toll-Like Receptors), receptores de lectina tipo C (CLR) y proteínas citoplasmáticas como los receptores tipo RIG (del inglés Retinoic acid-Inducible Gene) y los tipo NOD (NLR, del inglés NOD-Like Receptors) (Proell *et al.*, 2008; Takeuchi & Akira, 2010; Arrese *et al.*, 2016).

Los TLRs se caracterizan por tener en sus dominios N-terminales repeticiones ricas en leucina (LRRs) y una región transmembrana seguida por un dominio citoplasmático semejante al receptor de la IL-1 en los Toll o Toll/IR-1R (TIR) (Takeuchi & Akira, 2010). Por otro lado, los NLR se caracterizan por tener al menos tres dominios: un dominio C-terminal con LRRs, un dominio de unión a proteínas o de oligomerización y un dominio efector (Abbas *et al.*, 2012). Tras el reconocimiento de PAMPs y DAMPs, los TLR reclutan proteínas adaptadoras que contienen el dominio TIR, como la proteína de diferenciación mieloide de respuesta primaria (MyD88, del inglés Myeloid Differentiation primary response protein), que inicia vías de transducción de señal que tienen como finalidad reclutar quinasas que activan las cascadas de señalización intracelular (Kawasaki & Kawai, 2014).

Una vez que se lleva a cabo el reconocimiento de los ligandos, muchos de los PPRs activan vías de señalización que culminan con la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B, del inglés Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Ashley *et al.* 2012). Este factor de transcripción se encuentra en prácticamente todos los tipos de células y es regulado tanto en el citoplasma como en el núcleo, de tal modo que, en condiciones fisiológicas normales permanece en un estado inactivo unido a una proteína inhibidora (I κ B), la cual enmascara sus dominios de localización nuclear, reteniendo así su complejo de transcripción dentro del citoplasma (Ghosh & Hayden, 2008; Rahman & McFadden, 2011).

La familia de NF- κ B tiene como función regular la expresión de genes asociados a diversos procesos celulares, como la proliferación, la diferenciación y la muerte; además participa también de forma importante regulando tanto la respuesta inmune innata, como adaptativa. En los mamíferos, NF- κ B consiste en una familia de cinco proteínas que contienen el dominio Rel: RELA (también conocida como p65), RELB, c-REL, la

subunidad p105 de NF- κ B (también conocida como NF- κ B1; que se escinde en la subunidad p50) y la subunidad p100 de NF- κ B (también conocida como NF- κ B2; que se divide en la subunidad p52); estas proteínas pueden homodimerizarse o heterodimerizarse a través de su dominio de homología Rel conservado para mediar la transcripción de genes (Ghosh & Hayden, 2008; Rahman & McFadden, 2011; Rothschild *et al.*, 2018).

Entre las señales que inducen la activación de NF- κ B se incluyen todas aquellas que inducen daño (especies reactivas de oxígeno [ROS, del inglés Reactive Oxygen Species], luz ultravioleta, etc) o infección (lipopolisacáridos –LPS-, proteínas virales, RNA de doble cadena, etc) (Ghosh *et al.* 1998; Brasier, 2006). Esta activación puede llevarse a cabo mediante dos vías: la clásica (canónica) o alternativa (no canónica), que dependen de las subunidades de la quinasa de inhibidor del NF- κ B (IKK) que son activadas (Rahman & McFadden, 2011) (Figura 1). El complejo IKK, que fosforila a I κ B, se compone de dos subunidades catalíticas homólogas (IKK α , también conocida como IKK1 e IKK β , también conocida como IKK2) y una subunidad reguladora (IKK γ , también conocida como Nemo) (Ghosh & Hayden, 2008). En la vía de señalización clásica, el complejo IKK activado, que actúa predominantemente a través de IKK β de una manera dependiente de IKK γ , cataliza la fosforilación de I κ Bs, poliubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma, de modo tal que los dímeros p50 y p65 (RELA) son liberados y traslocados al núcleo, en donde se unen al DNA y activan la transcripción de genes (Gosh & Karin, 2002; Bonizzi & Karin, 2004). Por otro lado, la activación de NF- κ B mediante la vía de señalización alternativa es activada por un subconjunto de miembros de la familia del TNF, entre los cuales se incluye a CD40, linfotoxina- β y factor activador de células B (BAFF), entre otros (Rahman & McFadden, 2011) y se basa en el procesamiento de p100. En esta ruta, IKK α se activa por la cinasa inductora de NF- κ B (NIK; también conocida como MAP3K14) la cual fosforila a p100, el cual además de funcionar como un precursor de p52, funciona también como una molécula tipo I κ B al inhibir la translocación nuclear de RELB (Sun, 2010; Sun 2017). El procesamiento de p100 genera p52 que posteriormente forma un heterodímero con RELB, el cual se traslada al núcleo para llevar a cabo la transcripción de genes (Rothschild *et al.*, 2018).

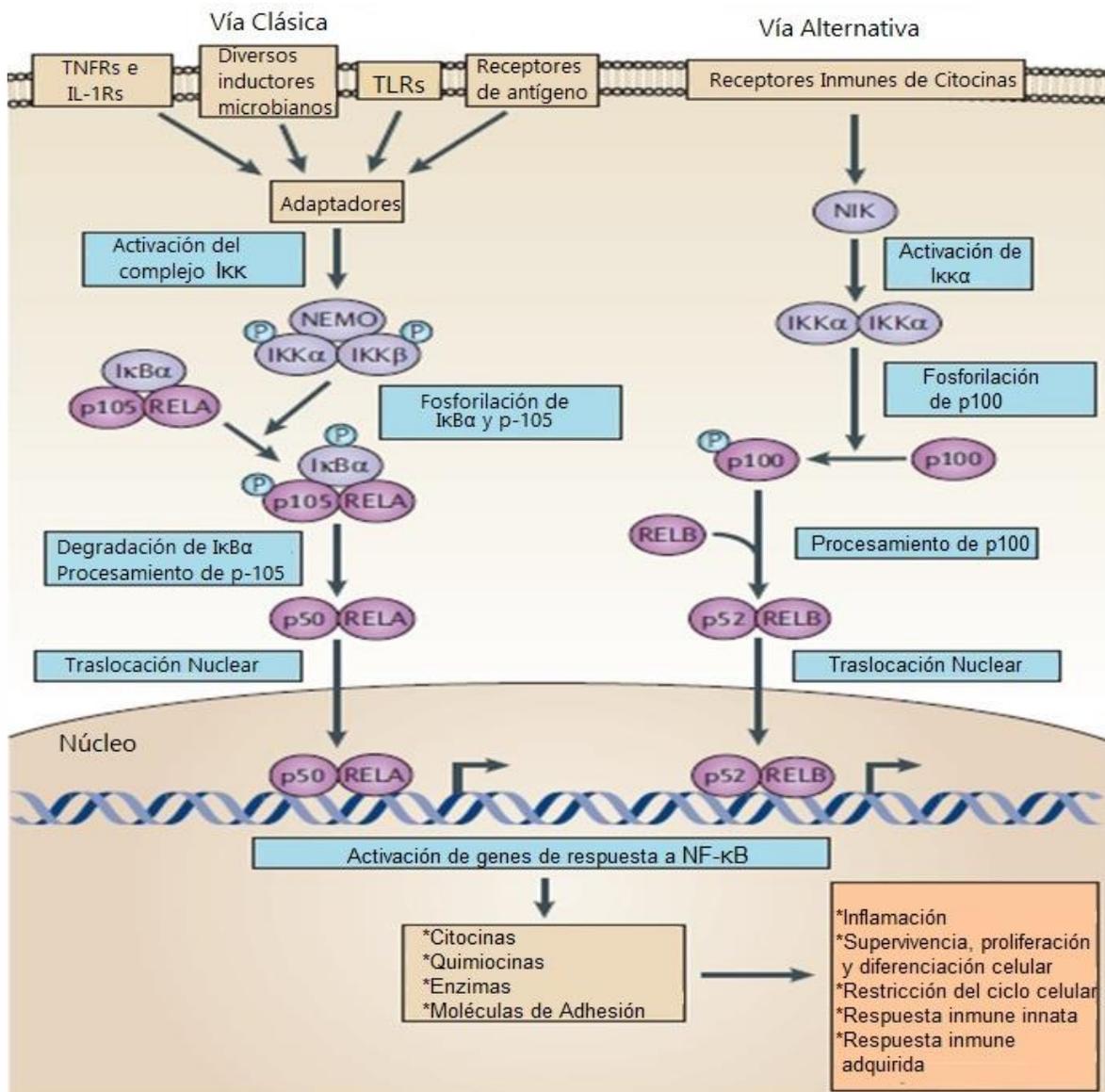


Figura 1. Activación del Factor NF-κB (Rahman & McFadden, 2011). Las vías de señalización del factor de transcripción NF-κB requieren de diversas señales que en conjunto controlan la respuesta celular, de tal forma que, su activación genera la transcripción de genes que codifican factores proinflamatorios y factores que influyen en la proliferación celular. IκBα: inhibidor de NF-κB-α (también conocido como NF-κBIα); IKK: cinasa IκB; IL-1R: receptor de IL-1; NEMO: modulador esencial de NF-κB (también conocido como IKKγ); NIK: cinasa inductora de NF-κB (también conocida como MAP3K14); TLR: receptor tipo Toll; TNFR: receptor de TNF.

La transcripción y traducción de genes conducen a la siguiente etapa de la cascada inflamatoria, en donde se lleva a cabo la expresión inducible de citocinas proinflamatorias como la IL-1β, IL-6 y TNF-α, que en combinación con quimiocinas (atrayentes) y diversas moléculas co-estimuladoras, facilitan el reclutamiento de células

efectoras, como monocitos y neutrófilos, al sitio de lesión (Nathan, 2002; Ashley *et al.*, 2012).

En condiciones normales, el endotelio vascular se encuentra en un estado “no activado”, sin embargo, en respuesta a un estímulo (infección, traumatismo mecánico, isquemia, toxinas, minerales, cristales, productos químicos y antígenos), el endotelio pasa a un estado “activado” (Tan *et al.*, 1999). Este proceso consiste en una migración dirigida de subconjuntos de leucocitos, que es regulado por el tejido mediante la expresión de moléculas de adhesión como las selectinas (expresadas en leucocitos y células endoteliales) e integrinas (leucocitos). La interacción entre las moléculas de adhesión leucocitaria y endotelial, en combinación con quimioatrayentes (quimiocinas, lípidos bioactivos, productos bacterianos), media el reclutamiento de leucocitos en sitios de infección o inflamación. Esto ocurre en una cascada de adhesión, que implican la sujeción/laminación inicial soportada por la P-selectina endotelial, de tal forma que posteriormente se produce una adhesión firme de integrinas activadas en los leucocitos a moléculas endoteliales, como la molécula de adhesión intercelular (ICAM, del inglés Intercellular Adhesion Molecule)-1 o la molécula de adhesión celular vascular (VCAM, del inglés Vascular Cell Adhesion Molecule)-1, y finalmente diapédesis (proceso de salida de los leucocitos, a través de las paredes integras de los vasos) (Dauphine & Karsan, 2010). Este flujo de células se acompaña de la salida de plasma de los vasos sanguíneos a los tejidos, conocido como exudado, que promueve el edema (o hinchazón). Los mastocitos y los macrófagos residentes en el tejido promueven la migración celular por la liberación de histamina, LTs y PGs, que como antes se ha mencionado tienen efectos rápidos sobre la vasculatura, incluyendo la vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular (Ashley *et al.*, 2012).

Durante el proceso inflamatorio agudo, se considera que los leucocitos más importantes para la defensa del huésped son los neutrófilos (Dauphine & Karsan, 2010), ya que una vez que son activados transmigran a través del endotelio en el tejido inflamado, y por medio de un proceso que se conoce como desgranulación, junto con el estallido respiratorio, crean un ambiente citotóxico liberando sustancias químicas nocivas, muchas de ellas almacenadas en los gránulos citoplasmáticos (Headland & Norling, 2015). Entre los químicos tóxicos liberados se incluyen las ROS, especies reactivas de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

nitrógeno (RNS), y diversas proteasas (como la proteasa tipo 3, catepsina G y elastasa). Estas sustancias son destructivas tanto para los patógenos como para los huéspedes (Nathan, 2002; Ashley *et al.*, 2012).

Durante la inflamación, en los tejidos linfoides los macrófagos y células dendríticas (DC, del inglés Dendritic Cells) presentan antígenos a los linfocitos T colaboradores o "helper" (Th o CD4+), que al ser estimulados pueden diferenciarse en células efectoras y reguladoras: células Th1 (proinflamatorias), células Th2 (antiinflamatorias), células Th17 y T reguladoras (Treg) (Ashley *et al.*, 2012).

Las células Th1 regulan la inmunidad celular e inducen respuestas proinflamatorias en contra de patógenos intracelulares a través de la liberación de IL-2, interferón (IFN)- γ y TNF- β . Por el contrario, las Th2 son importantes para la inmunidad humoral, la proliferación de células B, la regulación de respuestas alérgicas y la protección en contra de macroparásitos; para ello secretan citocinas antiinflamatorias como la IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, por lo tanto, se les considera responsables de la respuesta inmune hacia antígenos persistentes. El equilibrio entre ambos tipos de células (Th1 y Th2), puede determinar si la respuesta inmune es apropiada o terminará generando una inmunopatología (Rengarajan *et al.*, 2000). El término "célula T reguladora" se refiere a células que controlan o suprimen activamente la función de otras células, generalmente de manera inhibitoria. Las células Treg aparentemente controlan el desarrollo de enfermedades autoinmunes y el rechazo de trasplantes, y también pueden jugar un papel crítico en el control del asma y la alergia (Akbari *et al.*, 2003). Por otra parte, las células Th17 tienen como papel principal la eliminación de bacterias y hongos extracelulares, gracias a su capacidad para reclutar y activar neutrófilos, directamente a través de la producción de IL-8 o indirectamente induciendo la producción de factores estimuladores de colonias (Figura 2) (Cosmi *et al.*, 2013; Pelletier *et al.*, 2010; Ouyang *et al.*, 2008).

La última fase de la inflamación consiste en su resolución; los procesos fundamentales para la resolución incluyen la limitación en la infiltración de neutrófilos, regulación de quimiocinas y citocinas, inducción de la apoptosis en neutrófilos deteriorados y su posterior eferocitosis (fagocitosis de células apoptóticas) por

macrófagos (Reville *et al.*, 2006). Estos eventos en un proceso inflamatorio agudo finalmente culminan en un regreso a la homeostasis de los tejidos (Headland & Norling, 2015).

Las terapias antiinflamatorias se han enfocado tradicionalmente en disminuir o neutralizar a los mediadores proinflamatorios y/o inhibir el reclutamiento de leucocitos y su activación. Estas terapias incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), agonistas de receptores de glucocorticoides (GR) y anticuerpos o inhibidores dirigidos a citocinas proinflamatorias específicas, tales como el TNF- α y la IL-1 (Alessandri *et al.*, 2013).



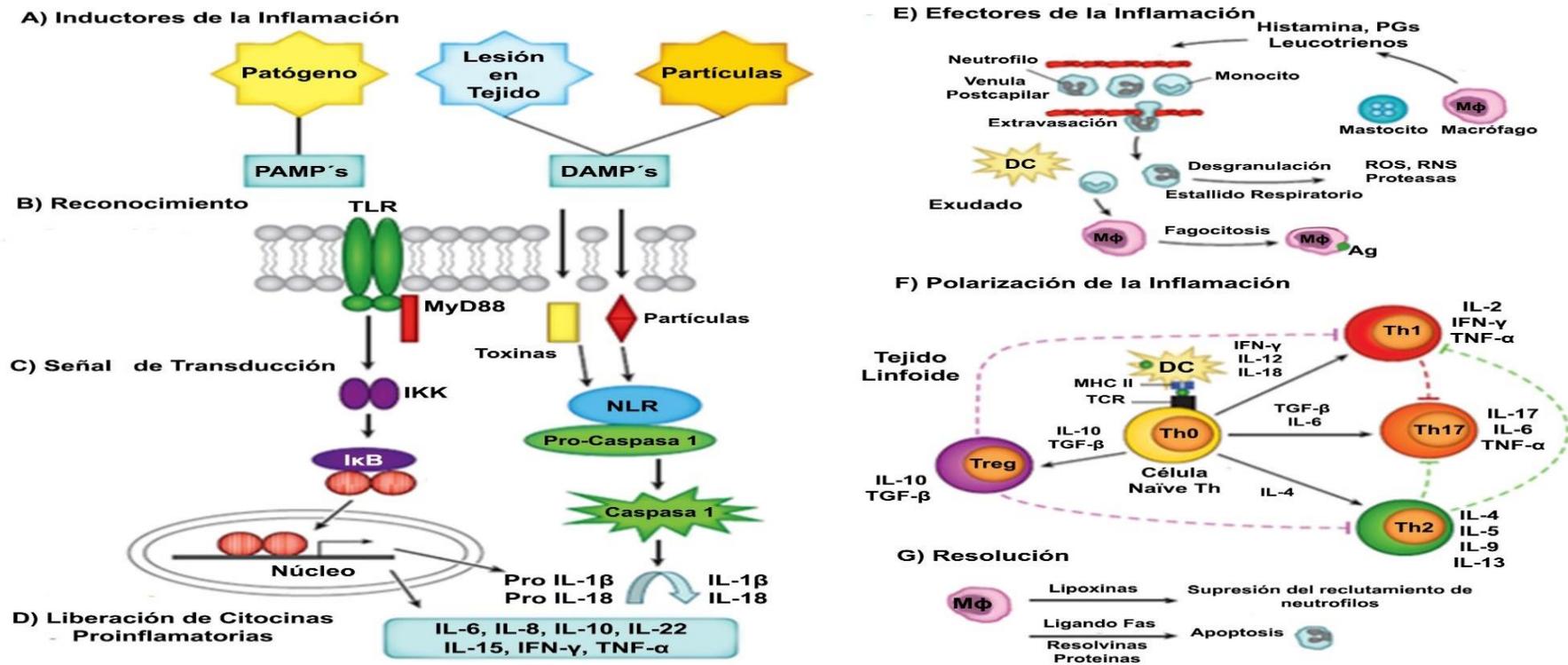


Figura 2. Respuesta inflamatoria (Ashley *et al.*, 2012). (A) Patógenos o lesiones tisulares inducen inflamación. (B) TLR y NLR se unen a PAMPs o DAMPs. (C) Los TLRs activan una vía de transducción de señal dependiente de MyD88, en donde se libera NF-κB, de la proteína IκB, para inducir su translocación al núcleo. Por otro lado, los NLRs señalan el inflamasoma, que activa la caspasa-1 para convertir citocinas en formas activas (IL-1β e IL-18), que provocan inflamación después de liberarse de la célula. (D) Se producen y liberan citocinas proinflamatorias y quimiocinas. (E) Los neutrófilos y monocitos migran al sitio de lesión por quimiotaxis y pasan selectivamente a través de las células endoteliales para alcanzar el sitio objetivo (extravasación). Los neutrófilos liberan compuestos tóxicos, incluyendo ROS, RNS, y varias proteasas. (F) El antígeno capturado en la perifería por las células dendríticas migratorias es transportado a los tejidos linfoides, donde es presentado a las células Th0 que se pueden diferenciar en varios tipos diferentes de células efectoras y reguladoras: células Th1 (proinflamatorias), células Th2 (antiinflamatorias), Tregs (reguladoras) y células Th17 (proinflamatorias). (G) El proceso de resolución se lleva a cabo cuando los neutrófilos favorecen el cambio de los leucotrienos (producidos por los macrófagos) a lipoxinas; el ligando Fas, las resolvinas y protectinas inducen la apoptosis de los neutrófilos; y los macrófagos fagocitan a los neutrófilos apoptóticos y otros desechos celulares. Abreviaturas: Ag, antígeno; DC, célula dendrítica; DAMP, patrón molecular asociado al daño; IκB, factor nuclear del potenciador del gen polipeptídico ligero kappa en el inhibidor de la quinasa kappa B; IFN-γ, interferón-gamma; IL, interleucina; Mφ, macrófago; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; MyD88, gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide (88); NF-κB, factor nuclear kappa - acelerador de la cadena ligera de células B activadas; NLR, receptores tipo NOD; PAMP, patrón molecular asociado al patógeno; RNS, especies reactivas de nitrógeno; ROS, especies reactivas de oxígeno; TCR, receptor de células T; TGF β, factor de crecimiento transformante-beta; Th, célula T auxiliar; TLR, receptor tipo Toll; TNF-α, factor de necrosis tumoral alfa.

7.2 ANATOMÍA DE LA BARRERA GÁSTRICA

El estómago es un órgano localizado en el peritoneo, cuya estructura tiene forma de saco y tiene como funciones principales: 1) actuar como un recipiente y depósito para los alimentos ingeridos y liberar los alimentos en el duodeno en cantidades pequeñas y fisiológicamente apropiadas; 2) secretar ácido clorhídrico y enzimas proteolíticas que inician la digestión de proteínas y neutralizan muchas bacterias dañinas en los alimentos ingeridos; 3) batir el alimento ingerido y ablandarlo por medio del jugo gástrico para producir una mezcla licuada denominada quimo (Mahadevan, 2014).

Topográficamente, el estómago se divide en cinco regiones: la unión cardiaca y gastroesofágica (GE), el fondo, el cuerpo, el antro y el píloro (Soybel, 2005). Sin embargo, funcionalmente se divide en regiones secretoras de ácido (área oxíntica, *oxys* es ácido en griego) y no secretoras de ácido (Soybel, 2005). El área de la glándula oxíntica, que en su región glandular esta constituida mayoritariamente por células parietales (productoras de ácido), células D (secretoras de pepsinógeno), células tipo-enterocromafines (secretoras de histamina) y células D (productoras de somatostatina), comprende el 80% del órgano (fondo y cuerpo); mientras que el área de la glándula pilórica, conformada principalmente en su región glandular por células epiteliales de superficie y células endocrinas G y D (productoras de gastrina y somatostatina), comprende tan solo el 20% (antro) (Schubert & Peura, 2008). Por otro lado, desde el punto de vista histológico se divide en tres regiones de acuerdo con el tipo de glándulas que contiene cada una (Ross & Pawlina, 2012): 1) región cardial (cardias): se ubica en la parte cercana al orificio esofágico y contiene glándulas cardiales, que secretan principalmente mucinógeno; 2) región pilórica (antro): está ubicada en la parte proximal con respecto al esfínter pilórico y posee glándulas pilóricas o antrales; 3) región fúndica (fundus): es aquella situada entre el cardias y el antro pilórico, que contiene las glándulas fúndicas o gástricas.

La mucosa gástrica funciona como una barrera que impide la difusión del ácido luminal y evita las lesiones del tejido gástrico (Silen *et al.*, 1980). Tomando como referencia su organización anatómica, comprende los siguientes mecanismos de defensa (figura 3):

1) Posee una barrera mucosa que contiene bicarbonato y fosfolípidos, que cubre la superficie de la mucosa, reteniendo el bicarbonato secretado por las células epiteliales de superficie para mantener un microambiente neutral en la superficie de dichas células y

prevenir la penetración de la pepsina, protegiendo la mucosa de la consiguiente digestión proteolítica del epitelio de superficie (Atuma *et al.*, 2001; Allen & Flemström, 2005). El moco es secretado junto a péptidos de bajo peso molecular de la familia del factor de trébol (TFF, por sus siglas en inglés Trefoil Factor Family) que juegan un papel importante en la compactación y ensamblaje de las mucinas. El principal estímulo fisiológico para la secreción de moco es la acetilcolina, sin embargo, hormonas GI como la gastrina, secretina y PGE₂ también estimulan su secreción (Allen & Flemström, 2005; Ramsay & Carr, 2011). Por otro lado, la secreción de bicarbonato es estimulada por el ácido luminal, factor estimulante de liberación de corticotropina (CRF, del inglés Corticotrophin-Relasing Factor) y PGs, entre otros (Laine *et al.*, 2008).

2) La siguiente línea de defensa la constituyen una línea continua de células epiteliales de superficie, las cuales secretan moco y bicarbonato y generan PGs, TTFs y catelicidinas. Están interconectadas por proteínas de uniones estrechas (TJ, del inglés Tight Junctions) y evitan la difusión de ácido y pepsina (Laine *et al.*, 2008).

3) Además, la integridad de la mucosa se mantiene por una continua renovación del epitelio a partir de células progenitoras. Tras el daño, la reconstitución del epitelio superficial ocurre en minutos por la migración de células preservadas desde áreas adyacentes. Esta reepitelización se ve favorecida por la activación del receptor de crecimiento epidérmico (EGF-R, del inglés Epidermal Growth Factor Receptor), que estimula la proliferación de las células. Los principales factores mitogénicos que activan este receptor son el factor de crecimiento transformante (TGF, del inglés Transforming Growth Factor)- α y el factor de crecimiento insulínico tipo (IGF, del inglés Insuline-like Growth Factor)-1; sin embargo, también puede ser transactivado por la PGE₂ y la gastrina (Pai *et al.*, 2002; Tarnawski., 2005; Nguyen *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008; Hirst., 2011).

4) Las propias células parietales secretoras de ácido clorhídrico, secretan bicarbonato al intersticio y lumen de los capilares sanguíneos adyacentes, mismo que es transportado al lumen gástrico (se incorpora a la barrera mucosa) y a la membrana basal de las células epiteliales de superficie (Laine *et al.*, 2008).

5) La microcirculación mucosa es esencial para el reparto de oxígeno y micronutrientes; a nivel de la capa muscular los microvasos capilares se ramifican de las arterias submucosas y avanzan hacia la lámina propia cerca de las células epiteliales gástricas. Las células endoteliales que forman los capilares generan potentes

vasodilatadores como óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂), que protegen la mucosa gástrica oponiéndose a la acción dañina de las sustancias vasoconstrictoras como LTC₄, TxA₂ y endotelina. La vasodilatación que ocurre de manera inmediata a un daño a la mucosa permite el rápido incremento del flujo sanguíneo con la consiguiente remoción o dilución del agente nocivo (Kawano & Tsuji, 2000; Peskar., 2001; Tarnawski *et al.*, 2012).

6) El control nervioso del tracto GI se lleva a cabo mediante un sistema integrado por nervios extrínsecos (eferentes simpáticos y parasimpáticos) e intrínsecos (el sistema nervioso entérico –[ENS, del inglés Enteric Nervous System]–) (Lundgren *et al.*, 2011). Las neuronas sensoriales aferentes entran a lámina propia acompañando a los capilares sanguíneos y terminan justo por debajo de las células epiteliales de superficie. La activación de estas terminales nerviosas por algún agente nocivo (entrada de contenido luminal o ácido) conduce a la liberación de neurotransmisores como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina o la sustancia P, los cuales pueden mediar entre otras acciones la liberación de NO por las células endoteliales y la consiguiente vasodilatación para la retirada o dilución del agente dañino (Wallace & Granger, 1996; Peskar., 2001; Fiorucci *et al.*, 2005; Laine *et al.*, 2008).

7) Por último, la continua generación de PGE₂ y PGI₂ por la mucosa es crítica para la protección frente a agentes necrotizantes y ulcerogénicos. De manera general las PGs inhiben la secreción ácida (a través de su unión al R EP-3) y estimulan la de moco (R EP-4), bicarbonato (R EP-1) y fosfolípidos, incrementan el flujo sanguíneo (R EP-1) y aceleran la restitución de las células del epitelio y la cicatrización de la mucosa. También inhiben la activación de los mastocitos y la adherencia de leucocitos y plaquetas al endotelio vascular (Wallace & Granger, 1996; Atay *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2005; Laine *et al.*, 2008; Arakawa., 2012; Takeuchi & Amagase, 2017).

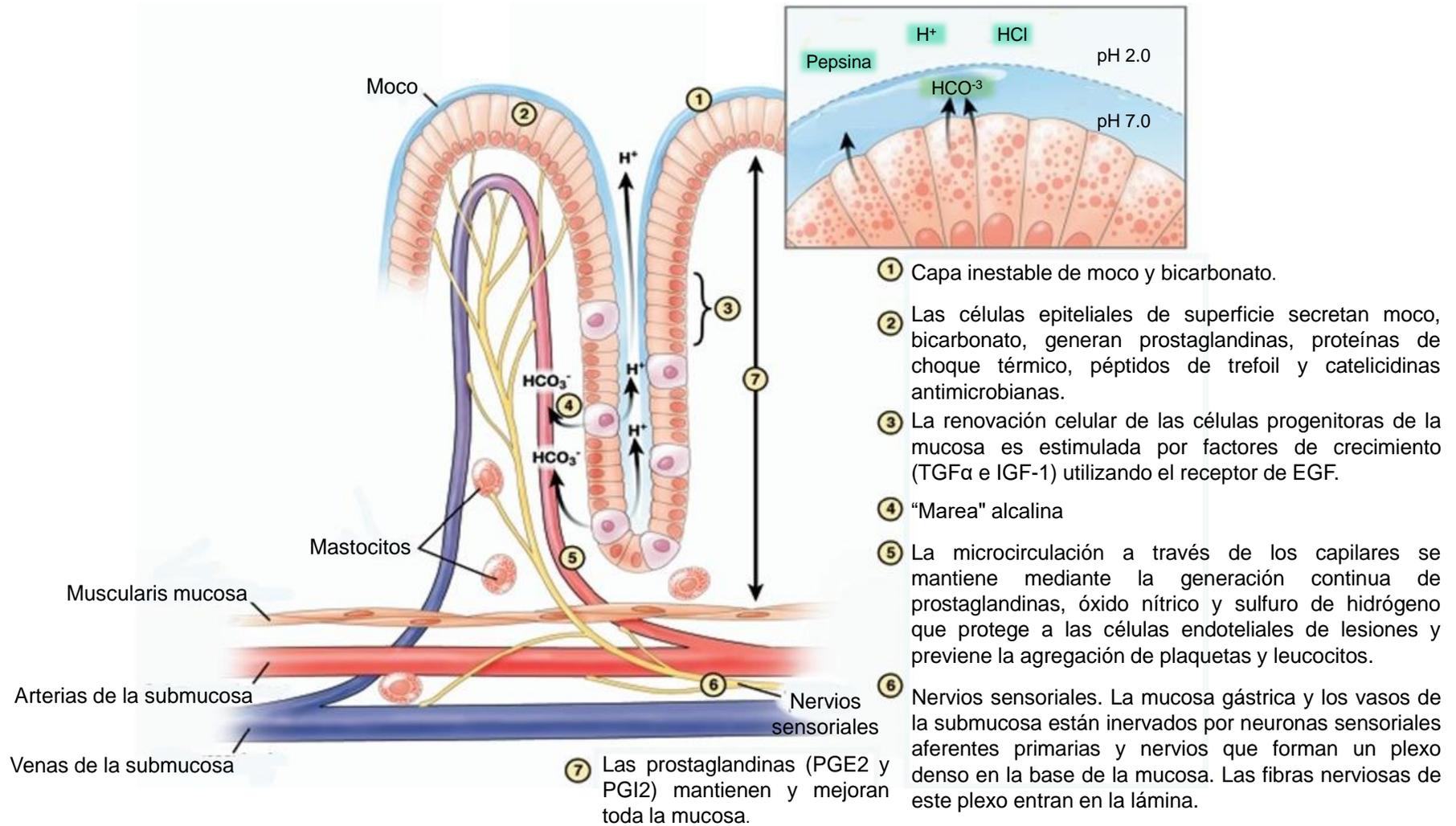


Figura 3. Anatomía de la barrera gástrica (Laine et al., 2008). La mucosa gástrica posee la capacidad de resistir la constante exposición a sustancias nocivas mediante los siguientes mecanismos: 1) Capa de moco y bicarbonato; 2) Células epiteliales; 3) Células progenitoras de la mucosa gástrica; 4) Marea alcalina; 5) Los capilares sanguíneos; 6) Nervios sensoriales; 7) Prostaglandinas (PG). Receptor de crecimiento epidérmico (EGF-R); Factor de crecimiento transformante (TGF); Factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1).

7. 3 ANATOMÍA DE LA BARRERA INTESTINAL

El tracto intestinal, consiste en un órgano revestido por una sola capa de células epiteliales cilíndricas que sirven para facilitar la digestión y absorción de nutrientes, y que además constituyen una barrera esencial que actúa en contra de microorganismos patógenos, toxinas y antígenos dietéticos (Robinson *et al.*, 2015). De tal forma que, ambas funciones son llevadas a cabo por la denominada “función de barrera intestinal”, en la cual participan mecanismos tanto inmunológicos como no inmunológicos (Salvo-Romero *et al.*, 2015).

Físicamente, la barrera intestinal incluye componentes celulares y estromales, desde el endotelio vascular hasta el revestimiento de las células epiteliales y la capa de moco, que consiste en un gel formado por la interacción de diversas secreciones mucosas (mucina, péptidos y lípidos tensoactivos) (Bischoff *et al.*, 2014). Las células que componen la barrera de la mucosa intestinal son sometidas a una renovación continua a partir de células madre pluripotenciales, que se localizan cerca de la base de las criptas de Lieberkühn. La progenie de estas células madre experimentan diferenciación terminal en uno de los cinco linajes celulares (enterocitos, células caliciformes, células enteroendocrinas, células de Paneth, células M) que migran hacia la superficie de la cripta o hacia la base de la cripta (Aguilera-Montilla *et al.*, 2004; Salvo-Romero *et al.*, 2015). Sin embargo, otra parte importante de la barrera intestinal está constituida por una barrera química, que consiste en secreciones digestivas (péptidos antimicrobianos, citocinas, mediadores inflamatorios, etc.), la microbiota intestinal, la función inmune y la motilidad (Bischoff *et al.*, 2014) (Figura 4).

El epitelio intestinal consiste en la más grande superficie mucosa del cuerpo, cubriendo aproximadamente 400 m² de superficie con una sola capa de células, organizadas en criptas y vellosidades (Peterson & Artis, 2014). En su mayoría, las células que rodean la luz intestinal son enterocitos absorbentes, que llevan a cabo dos funciones críticas: 1) actúan como una barrera para evitar el paso de entidades intraluminales (antígenos extraños, microorganismos y sus toxinas) y 2) funcionan como un filtro selectivo que permite la translocación de nutrientes esenciales dietéticos, electrolitos y agua. Para que ambas funciones se lleven a cabo de forma apropiada, el epitelio intestinal

regula la permeabilidad selectiva por medio de dos vías: transepitelial/transcelular (se asocia con el transporte de solutos a través de las células epiteliales y se regula por transportadores selectivos) y paracelular (se asocia con el transporte en el espacio entre las células epiteliales y se regula por transportadores complejos intercelulares) (Groschwitz & Hogan, 2009); la vía paracelular es regulada mediante un conjunto de complejos proteicos, que se clasifican en tres grupos, y a partir del extremo apical de la célula son: TJ, uniones de anclaje u adherentes (AJ, del inglés Adherens Junctions) y uniones comunicantes (GAP junctions) (Salvo-Romero *et al.*, 2015).

Las TJ y AJ están conformadas por diferentes proteínas, sin embargo, poseen similitudes en la función de las proteínas transmembrana especializadas en la formación de contactos adhesivos entre las células y enlaces intracelulares con el citoesqueleto de actina y vías de señalización (Hartsock & Nelson, 2008).

Las TJ consisten en complejos multi-proteicos localizados en el extremo más apical de la membrana lateral, de tal forma que interactúan directamente con el citoesqueleto, a través de la *zonula ocludens*; dentro de estas proteínas, se incluyen claudinas, ocludinas y moléculas de adhesión de unión (JAM). Entre los tres grandes complejos de unión, solo las TJ tienen la capacidad de controlar la permeabilidad paracelular selectiva de los iones, el agua y otras moléculas pequeñas; por lo tanto, son el principal determinante de la permeabilidad epitelial de la mucosa (Köning *et al.*, 2015).

Las AJ son una forma de estructura de adhesión célula-célula, cuya formación, mantenimiento y función es controlada por glicoproteínas transmembrana de la superfamilia clásica de la cadherina, tales como E-cadherina, y los miembros de la familia de la catenina, incluyendo p120-catenina, β -catenina y α -catenina. Entre las funciones que realizan destaca de forma importante el inicio y la estabilización de la adhesión celular, la señalización intracelular y la regulación transcripcional (Hartsock & Nelson, 2008). Las AJ también están integradas por los desmosomas, compuestos principalmente por desmogleína, desmocolina y desmoplaquina que se vinculan intracelularmente a los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células vecinas, forman una red transcelular que confiere resistencia mecánica a los tejidos y permite que las células mantengan su morfología. Además, son centros de señalización y participan en varios

procesos celulares como la diferenciación, la proliferación y la morfogénesis (Salvo-Romero *et al.*, 2015).

Las uniones GAP, consisten en un tipo de comunicación entre células mediado por canales intercelulares (conexones), que se agrupan en regiones especializadas de la membrana plasmática, de tal forma que unen el citoplasma de dos células y proporcionan un medio para el intercambio de iones (K^+ y Ca^{2+}), segundos mensajeros (adenosina monofosfato cíclico –cAMP-, guanosina monofosfato cíclico –cGMP- e inositol 1,4,5-trifosfato -IP3-), y metabolitos pequeños (glucosa) (Meşe *et al.*, 2007).

Por lo tanto, la permeabilidad intestinal permite el intercambio de solutos y fluidos entre el lumen y los tejidos y depende de la regulación del sistema inmune de la mucosa, así como también de las TJ (Odenwald & Turner, 2013). Estudios *in vitro* e *in vivo* en animales han demostrado que la permeabilidad intestinal está regulada por múltiples factores incluyendo los exógenos, apoptosis epitelial, citocinas y células inmunes (Groschwitz & Hogan, 2009), ya que se han encontrado niveles elevados de $IFN-\gamma$ y $TNF-\alpha$ en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, del inglés Inflammatory Bowel Disease) (Clayburgh *et al.*, 2004). Por otro lado, investigaciones en pacientes con enfermedad de Crohn han indicado que las alteraciones en TJ van acompañadas por una disminución en la expresión de claudina 1, 3, 5, y 8 y ocludina, así como también una redistribución de claudina 5 y 8 (Zeissig *et al.*, 2007).

Las células caliciformes están especializadas en la síntesis y secreción de moco, que es un componente estructural integral del intestino, cuya función consiste en actuar como un medio de protección, lubricación y transporte entre el contenido luminal y el revestimiento epitelial. Las propiedades viscoelásticas y poliméricas del moco se derivan de los principales componentes glicoproteicos formadores de gel llamados mucinas (Deplancke & Gaskins, 2001). Las mucinas consisten en proteínas altamente glicosiladas (las regiones O-glicosiladas comprenden entre el 70 y 80% del polímero), y cuyas cadenas terminan a menudo con un ácido siálico o polímero, de tal forma que pueden clasificarse en ácidas o neutras (Cummings *et al.*, 2004). En los seres humanos, la familia de la mucina está constituida por aproximadamente 20 miembros, dentro de los cuales se incluyen tanto las formas secretadas como las ligadas a la membrana (Robinson *et al.*,

20015). Las mucinas forman estructuras homo-oligoméricas, que constituyen la capa de mucosidad, dentro de este grupo se incluyen MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7 y MUC19; por otro lado, las mucinas ligadas a la membrana forman parte del glicocálix epitelial que interviene en la señalización celular y en las interacciones con el medio ambiente e incluyen a MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 y MUC20 (Linden *et al.*, 2008; Corfield *et al.*, 2015). En base a estudios que han sido realizados, se ha determinado que la mucina formadora de gel que se encuentra de forma más abundante en el estómago es MUC5AC y la del intestino MUC2 (Hansson., 2012).

Las células de Paneth, se localizan en el epitelio del intestino delgado, donde residen en grupos pequeños (5 a 12 células) en la base de las criptas de Lieberkühn (Bevins & Salzman, 2011). Su función principal consiste en producir, empaquetar y exportar péptidos antimicrobianos, entre los cuales se incluyen lisozima, PLA₂, tripsina y α -defensina, siendo esta última la proteína que se produce de forma más abundante por estas células (Cummings *et al.*, 2004). La función biológica de las células de Paneth es regulada en parte por la secreción controlada del contenido de sus gránulos, que ocurre en respuesta a estímulos, incluyendo agonistas colinérgicos, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como productos bacterianos como LPS y ácido lipoteicoico (Bevins & Salzman, 2011).

Las células enteroendocrinas (EEC, del inglés Enteroendocrine Cells), se dispersan por todo el tracto intestinal, y se localizan dentro de las criptas intestinales y en las vellosidades; por lo tanto, constituyen el órgano endocrino más grande del cuerpo humano (Moran *et al.*, 2008). Existen al menos 15 subtipos de EEC, que producen y secretan múltiples hormonas o moléculas de señalización, incluyendo gastrina (células G), grelina (células P o X), somatostatina (células D), colecistoquinina (CCK), péptidos similares al glucagón (GLP) y péptido YY (PYY), entre otras, que controlan detalladamente las funciones fisiológicas y homeostáticas en el tracto digestivo, particularmente la secreción y motilidad postprandial (Moran *et al.*, 2008; Sternini *et al.*, 2008).

Finalmente, las células M son células especializadas en la captación de antígenos de la luz intestinal, situadas en el epitelio que cubre la superficie de agregados linfoides o

placas de Peyer (PPs, del inglés Peyer's Patch) en la región del ileón (Salvo-Romero *et al.*, 2015).

Al igual que en la mucosa gástrica, las PGs también participan de manera importante para mantener la integridad de la mucosa intestinal. La PGE₂ y PGI₂ estimulan la secreción de cloruro y bicarbonato en la luz del intestino delgado a través de los canales de la membrana apical de los enterocitos, lo cual favorece la difusión de sodio y agua a través de la vía paracelular, de esta manera se diluyen las toxinas o sustancias nocivas que son producidas por agentes infecciosos; el mecanismo para inducir la secreción de fluido intestinal por PGs está mediado por la liberación de mensajeros intracelulares como el monofosfato de adenosina cíclico (cAMP, del inglés Cyclic Adenosine Monophosphate), el monofosfato de guanosina cíclico (cGMP, del inglés Cyclic Guanosine Monophosphate), el trifosfato de inositol, el diacilglicerol y la acetilcolina (Mohajer & Ma, 2000). En cuanto a la restitución epitelial del intestino, un estudio realizado por Miyoshi y colaboradores (2016) demostró que la PGE₂ es un factor inductivo que actúa directamente sobre las células localizadas en las criptas de Lieberkühn para promover la diferenciación de un grupo de células atípicas, que se han denominado células epiteliales asociadas a heridas. Por otro lado, son diversos los estudios que demuestran que la PGE₂ posee también efectos proliferativos, ya que favorece la transactivación del EGF-R y podría participar en el control del ciclo celular del epitelio intestinal al generar un incremento de la ciclina B1 y disminuir la expresión de p21, independientemente de p53 (Pai *et al.*, 2002; Dvory-Sobol *et al.*, 2006; Ferrer & Moreno, 2010). Además, la PGI₂ y PGE₂ al poseer efecto vasodilatador mantienen un adecuado flujo sanguíneo, lo cual es fundamental para limitar las lesiones de la mucosa y promover una rápida reparación; por lo tanto, producen un aumento en la función de la barrera epitelial (Mohajer & Ma, 2000; Patern & Longo, 2008).

7. 3. 1 APORTE DE LA MICROBIOTA EN LA FUNCIÓN DE LA BARRERA INTESTINAL

El tracto intestinal coexiste en simbiosis con un gran número de bacterias, que contribuyen para que se realice de forma apropiada la función digestiva (Cummings *et al.*, 2004). La población microbiana intestinal se compone de aproximadamente 1,000 especies, siendo más abundantes los miembros de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*

(Walsh *et al.*, 2014). Al nacer, el intestino humano previamente estéril, comienza a ser colonizado por bacterias anaerobias facultativas como *Escherichia coli* y *Streptococcus spp* y dentro de las anaerobias estrictas destacan de forma importante aquellas que pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* (*B. breve*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. infantis*); *Clostridium* (*C. perfringens*, *C. difficile*, *C. butyricum*, *C. tertium*, *C. paraputrificum*) y *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. salivarius*, *L. plantarum*), entre muchas otras más (Mountzouris *et al.*, 2002; Wallace., 2011).

La primera colonización del neonato se produce cuando atraviesa el canal de parto. Sin embargo, la colonización definitiva del tracto intestinal también depende de factores tanto externos (la carga microbiana del medio ambiente inmediato, el tipo de alimentos consumidos y los hábitos alimenticios), como internos (pH intestinal, interacciones microbianas, temperatura ambiental, el peristaltismo, ácidos biliares, respuesta inmune, etc), de tal forma que existe una gran variación interindividual en la composición de la microbiota intestinal (Bull & Plummer, 2014).

En la edad adulta, la mayoría de las bacterias en el intestino son anaerobios no esporulados, de los cuales entre las más predominantes numéricamente se incluyen aproximadamente 30 especies de *Bacteroides spp.* y *Bifidobacterium spp.*, 52 especies de *Lactobacillus spp.*, y otras como *Eubacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Fusobacterium spp.*, y varios cocos Gram-positivos. Además, entre las bacterias que están presentes en menor cantidad se incluyen *Enterococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, bacterias metanógenas y bacterias reductoras de sulfato (Wallace., 2011; Khoder *et al.*, 2016). Actualmente se sabe que algunos de los beneficios que la microbiota le confiere al huésped, incluyen protección en contra de posibles patógenos, digestión de polisacáridos, producción de vitaminas esenciales, estimulación de la angiogénesis, regulación en el almacenamiento de grasa y la modulación del sistema inmune del huésped (Walsh *et al.*, 2014).

A nivel de tracto GI, la respuesta inflamatoria con frecuencia suele ir acompañada de un desequilibrio en la microbiota intestinal, lo cual a su vez favorece la persistencia del proceso inflamatorio y la disfunción de la barrera intestinal, de tal forma que actualmente se sugiere que un fallo en la regulación de la respuesta inmune intestinal por la flora bacteriana normal puede desempeñar un papel crucial durante el desarrollo de diversas

patologías inflamatorias (Cummings *et al.*, 2004). Por ejemplo, estudios que se han realizado demuestran que la microbiota intestinal de los pacientes con artritis reumatoide se encuentra alterada, de tal modo que la interacción entre el huésped y la microbiota intestinal se manifiesta no solo por inflamación en el intestino, sino también en otras partes del cuerpo humano (Malin *et al.*, 1996; Cummings *et al.*, 2004). Además, durante la enfermedad inflamatoria intestinal los mecanismos de defensa del tracto GI están comprometidos, lo cual trae como consecuencia una mayor translocación bacteriana a través de la lámina propia, donde los antígenos microbianos provocan una fuerte respuesta inflamatoria, que a su vez ocasiona un aumento en la permeabilidad intestinal (Fava & Danese, 2011).

7. 3. 2 TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LA MUCOSA INTESTINAL

El tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT, del inglés Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) forma el órgano inmunológico más grande del organismo y se localiza en diversos sitios anatómicos, de tal forma que el ambiente externo entra en contacto con el huésped humano a través de este tejido (Acheson & Luccioli, 2004; Wershil & Furata, 2008). En el tracto GI, este tejido especializado se distribuye como parte del tejido linfoide asociado al intestino (GALT, del inglés Gut-Associated Lymphoid Tissue) y se encuentra de forma más organizada en áreas que reflejan una alta presencia de materiales extraños y microorganismos (Acheson & Luccioli, 2004). El GALT puede dividirse en sitios efectores, que consisten en linfocitos dispersos a lo largo del epitelio y la lámina propia de la mucosa, y sitios inductores que lo forman tejidos organizados responsables de la fase de inducción de la respuesta inmune (p.ej. PPs y los ganglios linfáticos mesentéricos), así como folículos linfoides más pequeños y aislados, que tienen un aspecto microscópico similar al de las PPs y se distribuyen por toda la pared del intestino delgado y del intestino grueso (Mowat., 2003).

Las PPs son agregados linfoides macroscópicos, localizados en la submucosa a lo largo del intestino delgado (Aguilera-Montilla *et al.*, 2004), de tal forma que las áreas linfoides son separadas de la luz intestinal por una sola capa de células epiteliales columnares, conocida como epitelio folicular asociado (FAE, del inglés Follicle Associated Epithelium), y un área más difusa inmediatamente debajo del epitelio, conocida como la

cúpula subepitelial (Mowat., 2003). El FAE difiere del epitelio que cubre la capa mucosa ya que tiene niveles más bajos de enzimas digestivas, un borde de cepillo menos pronunciado y una ausencia total de receptores para IgA polimérica (Aguilera-Montilla *et al.*, 2004), además es infiltrada por un gran número de células B, células T, macrófagos y DCs (Wershil & Furata, 2008). Sin embargo, la característica más notable de FAE es la presencia de células M (Aguilera-Montilla *et al.*, 2004); estas células, son enterocitos especializados con bordes de cepillo poco desarrollados y glicocálix superpuesto delgado, por lo tanto, absorben muy eficazmente antígenos y los transfieren desde el lumen a los folículos, donde interactúan con las DCs, éstas activan a los linfocitos T e inducen inmunidad a la mucosa (Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2002; Aguilera-Montilla *et al.*, 2004).

Los vasos linfáticos eferentes de la lámina propia drenan a los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN, del inglés Mesenteric Lymph Nodes), que son los ganglios linfáticos más grandes del cuerpo y se desarrollan de forma diferente a las PPs y los ganglios linfáticos periféricos, ya que no son afectados por la ausencia de factores como el TNF, el receptor de TNF (TNFR), $LT\alpha1\beta2$ y receptor de linfotóxina- β (LTBR). Además, para la acumulación de linfocitos en MLN se requiere de moléculas de adhesión como la L-selectina e integrina $\alpha4\beta7$, que normalmente dirigen a los linfocitos para ingresar en los tejidos periféricos y mucosos, por lo tanto, los MLN como consecuencia de estas características anatómicas podrían consistir en un cruce entre las vías de la recirculación periférica y mucosa (Mowat., 2003).

La lámina propia consiste en una capa de tejido conectivo, células musculares lisas, vasos sanguíneos y linfáticos, que se localiza entre el epitelio y la capa muscular de la mucosa. Además, se encuentran células T, células B, macrófagos, DCs, neutrófilos, otros granulocitos y mastocitos, de tal forma que este gran número de células hace probable que los antígenos que atraviesan el epitelio se puedan procesar y presentar a las células T $CD4^+$ (Aguilera-Montilla *et al.*, 2004).

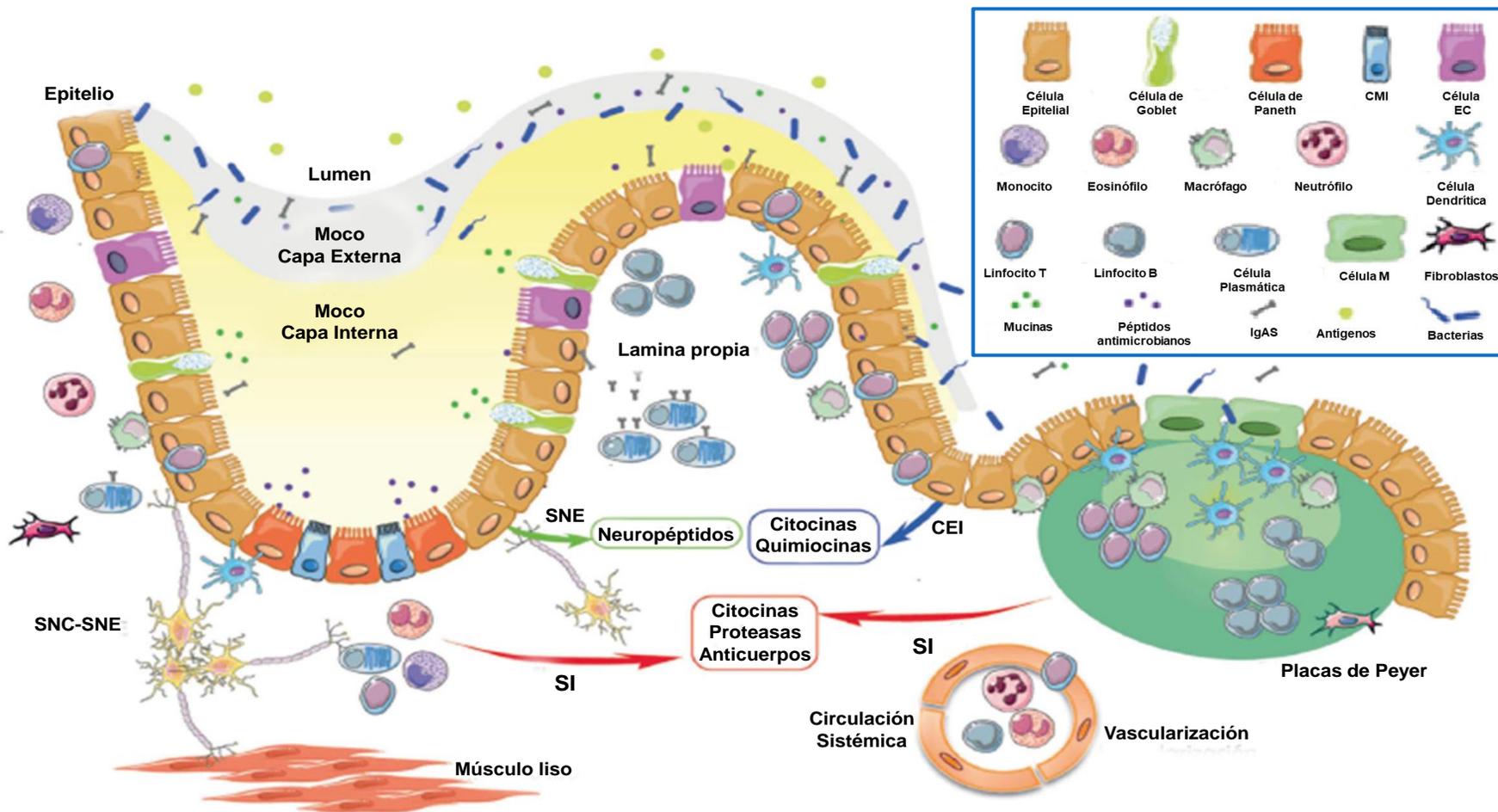


Figura 4. Anatomía de la barrera intestinal (Salvo-Romero *et al.*, 2015). La mucosa intestinal se compone de una monocapa de células epiteliales, de la región subepitelial que contiene la *lámina propia*, el sistema nervioso entérico, el tejido conectivo y las capas musculares. En el epitelio están presentes los enterocitos, las células de Goblet, las células de Paneth, las células enterocromafines y las células madre intestinales. Por encima de la barrera epitelial se encuentra la capa de moco no agitada, que contiene glicocálix, y a continuación la capa de moco agitada, que contiene la microbiota, IgA secretora, mucinas y péptidos antimicrobianos. La lamina propia contiene el tejido linfóide difuso compuesto de macrófagos, células dendríticas, células plasmáticas, linfocitos de la lamina propia y, en algunos casos, neutrófilos, y el tejido linfóide organizado, compuesto de estructuras linfoides como la placa de Peyer, que contiene células M, células dendríticas y linfocitos. Abreviaturas: SNC, Sistema Nervioso Central; SNE, Sistema Nervios Entérico; SI, Sistema Inmunitario; CEI, Célula Epitelial Intestinal; CMI, Célula Madre Intestinal; Cel EC, Célula Enterocromafín; IgAs, IgA Secretora.

7. 4 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs)

Los AINEs constituyen un grupo de fármacos con una estructura química heterogénea que comparten actividad antipirética, antiinflamatoria y analgésica a través de su capacidad para inhibir a las enzimas COXs, implicadas en la síntesis de PGs y TXs (Lanas *et al.*, 2014).

Son ampliamente indicados como una opción de tratamiento en condiciones reumáticas y musculoesqueléticas, como artritis reumatoide y osteoartritis (Sinha *et al.*, 2013). También se utilizan para reducir potencialmente el riesgo cardiovascular, en desordenes cerebrovasculares y como analgésicos en el tratamiento del dolor de origen variable en condiciones como extracción dental, trauma, cirugía, dismenorrea y episiotomía posparto (Davies & Wallace, 1997; Abimosleh *et al.*, 2013;). Además, estudios recientes indican que también pueden ser eficaces en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (DuBois & Smalley, 1996; Hawcroft *et al.*, 2002). De tal forma que, debido a todas sus aplicaciones clínicas, se encuentran dentro de los fármacos más ampliamente utilizados pues se calcula que aproximadamente son 30 millones de personas en todo el mundo quienes los ingieren diariamente (Kamil *et al.*, 2007).

7. 4. 1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El principio de la terapia con AINEs para aliviar el dolor musculo esquelético, se remonta a hace más de 5.000 años con el uso de la corteza de sauce. En 1828, fue aislada la salicina, ingrediente activo de la corteza del sauce. Sin embargo, fue hasta 1897 cuando Félix Hoffmann finalmente desarrolló el ácido acetil salicílico (aspirina) en un intento por mejorar la palatabilidad del ácido salicílico (Brune & Hinz, 2004). Posteriormente, en 1899 Heinrich Dreser, jefe de farmacología de Bayer, experimentó de inmediato con este nuevo compuesto en animales, demostrando los efectos antiinflamatorios y analgésicos del ácido acetil salicílico, de tal forma que en el mismo año el nombre comercial "Aspirina" se registró ("A" de acetilo y "Spir" de la primera parte de *Spirea ulmania*, la planta de la cual originalmente fue aislado el ácido salicílico) de este modo Bayer inició con su comercialización masiva en el mercado farmacéutico (Jones., 2001; Rao & Knaous, 2008).

7. 4. 2 ESTRUCTURA QUÍMICA, CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS

Los AINEs son un conjunto de fármacos muy heterogéneos entre sí, que tienen como similitud que la mayoría son ácidos orgánicos débiles con un pK_a entre 3 y 5. En general, suelen ser moléculas quirales, en donde solo un enantiómero es farmacológicamente activo. Contienen un grupo ácido, principalmente carboxílico o enólico. La parte ácida de la molécula es esencial para inhibir la actividad de la enzima COX y se une con un grupo aromático plano, que está conectado con una parte lipófila a través de un grupo polar, lo cual permite que estos fármacos sean relativamente liposolubles (Sinha *et al.*, 2013) (Figura 5).

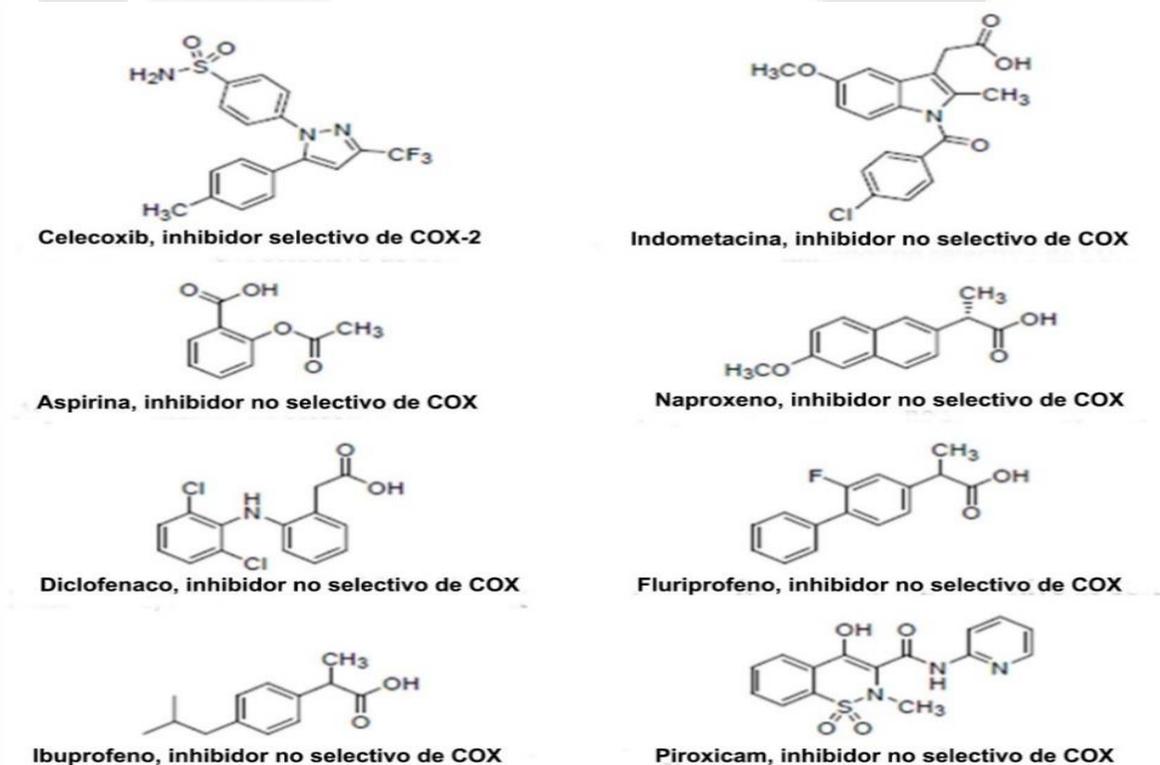


Figura 5. Estructura química de algunos AINEs (Katzung *et al.*, 2010). La estructura química de los AINEs es muy heterogénea, sin embargo, suelen ser moléculas quirales, en donde sólo un enantiómero es farmacológicamente activo. Contienen un grupo ácido, principalmente carboxílico o enólico. La parte ácida de la molécula es esencial para inhibir la actividad de la enzima COX y se une con un grupo aromático plano.

Los AINEs pueden clasificarse de diversas formas, tomando como referencia su selectividad hacia la enzima COX, su estructura química, sus propiedades farmacológicas y su vida media, entre otras (Conaghan., 2012). En la tabla 1, se muestra una de las clasificaciones que se ha establecido para estos fármacos en base a su estructura química.

Tabla 1. Clasificación de los AINEs en base a su estructura química (Kowalski & Makowska, 2015)

Grupo	Fármaco	Grupo	Fármaco
Derivados del ácido salicílico	Ácido acetilsalicílico (Aspirina) Salicilato sódico Diflunisal Ácido salicílico Sulfasalazina Olsalazina	Ácido heteroaril acético	Ibuprofeno Naproxeno Flurbiprofeno Oxaprozina
Derivados del paraminofenol	Acetaminofen	Ácido antranínico (Fenamatos)	Ácido mefenámico Ácido meclofenámico
Indol y ácido indolacético	Indometacina Sulindaco Etodolaco	Derivados del ácido enólico (Oxicams)	Píroxicam Tenoxicam Meloxicam

7. 4. 3 MECANISMOS DE ACCIÓN

La acción de los AINEs fue descrita por primera vez en 1971, cuando Vane y Piper demostraron que los AINEs inhiben la biosíntesis de las PGs al impedir que el AA se una al sitio activo de la COX (Conaghan., 2012).

El AA es un ácido graso esencial de 20 carbonos que se obtiene por medio de la dieta y la conversión enzimática de los fosfolípidos de membrana por la acción de la PLA₂ (Brash., 2001). Es un sustrato necesario para una gran variedad de procesos fisiológicos, incluyendo aquellos que implican la composición de la membrana celular, la función plaquetaria, inflamación, así como la función y reparación de tejidos (Burnett & Levy, 2012).

Una vez que el AA es liberado, ya sea por fosfolipasas secretadas (sPLA₂) o citoplasmáticas (cPLA₂), las isoformas de la COX catalizan dos reacciones secuenciales que culminan con la conversión metabólica del AA en PGs, TXs y otros eicosanoides (Rao & Kanus, 2008). Durante la reacción inicial la COX a través de su actividad ciclooxygenasa convierte el AA en PGG₂, para posteriormente mediante su acción peroxidasa, reducir la PGG₂ a la PGH₂ y finalmente por la intervención de isomerasas y sintasas específicas de cada tejido se producen cinco compuestos biológicamente activos que incluyen la PGI₂, TXA₂, PGD₂, PGE₂ y PGF₂ (figura 6) (Smith *et al.*, 2000).

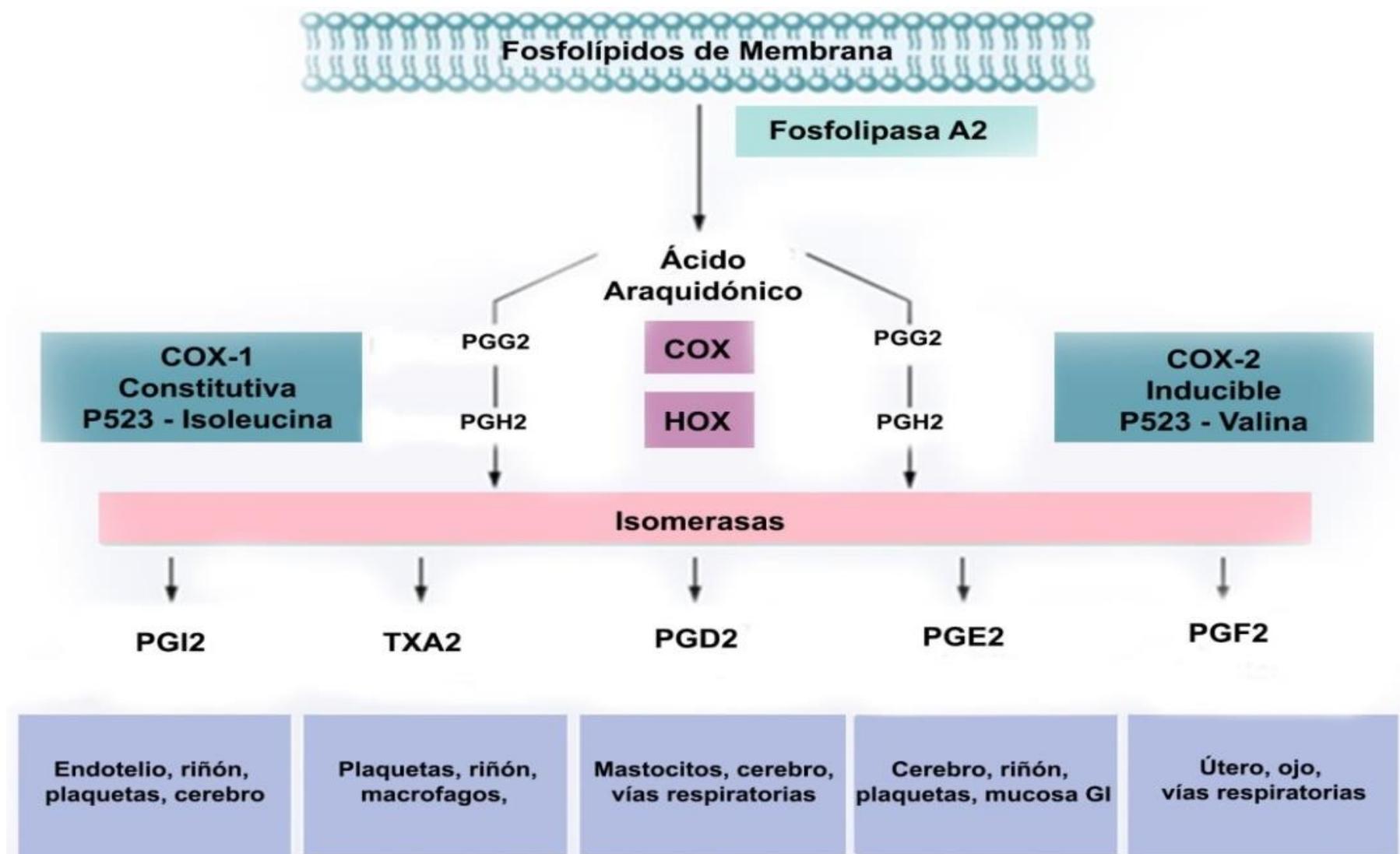


Figura 6. Biosíntesis de prostaglandinas (Fitzgerald & Patrono 2001). Mediante el metabolismo del AA, por la intervención de la COX, se obtienen PGs, prostaciclina y TXs, que son esenciales para que se lleven a cabo diversas funciones en varios órganos.

La COX es una enzima hemo-bifuncional, ya que exhibe actividades de ciclooxigenasa y peroxidasa (Reddy *et al.*, 2015). Se han descrito tres isoformas de la enzima COX: COX-1, COX-2 y COX-3 en donde las dos primeras son las más significativas. COX-3 es una isoforma de COX-1, que solo difiere en la estructura de un aminoácido y su función continúa siendo incierta, aunque se cree que su inhibición genera un efecto antipirético (Botting & Ayoub, 2005; Lanas *et al.*, 2014). Las isoformas de la COX poseen estructuras de unión muy similares, llevan a cabo los mismos mecanismos catalíticos y además producen los mismos productos biosintéticos, pero es importante destacar que manifiestan interesantes diferencias entre ambas, por ejemplo, la isoleucina que se encuentra localizada alrededor del canal del sustrato de la COX-1 es reemplazada por valina en la COX-2, lo cual le confiere un sitio de unión más amplio para la fijación de sustratos (Zha *et al.*, 2004).

La isoforma COX-1 se expresa de manera constitutiva en el tracto GI, el riñón y las plaquetas, donde cataliza la producción de PGs para el mantenimiento de sus funciones fisiológicas (Conaghan, 2012). En la mucosa gástrica entre las funciones que realizan la PGE₂ y PGI₂, tal y como se mencionó anteriormente, se incluyen efectos citoprotectores al disminuir la secreción de ácido gástrico por las células parietales, estimular la liberación de moco y bicarbonato, regular la proliferación epitelial e inducir vasodilatación en la microcirculación de la mucosa. En la mucosa intestinal la PGE₂ y PGI₂ también juegan un papel importante en la restitución epitelial, ya que favorecen la proliferación celular y existe evidencia de que podrían participar en el ciclo celular de los enterocitos (Pai *et al.*, 2002; Dvory-Sobol *et al.*, 2006; Ferrer & Moreno, 2010); además, favorecen la difusión de sodio y agua, de modo que atenúan los efectos adversos inducidos por sustancias nocivas y mantienen un adecuado flujo sanguíneo, el cual favorece una rápida recuperación. Por otro lado, en el riñón las PGs regulan el tono vascular y el flujo sanguíneo normal, manteniendo la función renal; mientras que, en las plaquetas la isoforma COX-1 es la responsable de la formación del agente pro-agregante TXA₂ (Rao & Knaus, 2008).

La isoforma COX-2 es prácticamente indetectable en los tejidos en condiciones normales, pero puede ser rápidamente inducible por estímulos proinflamatorios o mitogénicos, incluyendo citocinas, endotoxinas y factores de crecimiento. Por lo tanto, se

estima que COX-2 desempeña un papel importante en los mecanismos de defensa del cuerpo mediante la producción de PGs que modulan las respuestas inflamatorias e inmunes. Sin embargo, estudios han señalado una expresión constitutiva de COX-2 en diferentes tejidos y órganos (Zimmermann *et al.*, 1998), incluyendo riñón (Harris *et al.*, 1994; Ye *et al.*, 2006), cerebro (Breder *et al.*, 1995) y mucosa GI humana (Zimmermann *et al.*, 1998). Además, es importante mencionar que los monocitos y macrófagos expresan COX-2 cuando son inducidos por LPS *in vitro* produciendo PGI₂, el cual es un importante anti-agregante plaquetario (Ricciotti & FitzGerald, 2011; Kirkby *et al.*, 2012).

La isoforma COX-3 fue descubierta en 2002 por Simmons y colaboradores. Su estudio en perros mostró que esta isoforma era el objetivo específico del acetaminofén; sin embargo, su relevancia clínica como objetivo farmacológico es cuestionable, ya que ahora se sabe que COX-3 posee una secuencia de aminoácidos completamente diferente a COX-1 o COX-2 en roedores y humanos, y además carece de actividad COX (Rao & Knaus, 2008)

Durante el proceso inflamatorio, la actividad enzimática o cantidad de proteína y el RNA mensajero de COX-1 no parece ser afectada. Por otra parte, estudios en modelos animales han proporcionado evidencia sobre la inducción de COX-2, lo cual lleva a una producción incrementada de PGs proinflamatorias implicadas en la mediación del dolor, fiebre e inflamación (Rao & Knaus, 2008; Lanus *et al.*, 2014). De esta forma, PGs como PGE₂ y PGI₂ producidas a través de la actividad de COX-2, pueden magnificar el grado de inflamación iniciada por mediadores como la histamina y la bradiquinina, lo cual ocasiona un incremento de la permeabilidad vascular y el edema (Davies *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1992; Seibert *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1998).

Usando modelos animales de dolor, se ha logrado demostrar que la PGE₁ y PGF₂ están claramente implicadas en la hiperalgesia observada en condiciones inflamatorias, ya que, actuando sinérgicamente con otros mediadores sensibilizan receptores en las terminaciones nerviosas aferentes para producir el dolor inflamatorio (Cashman, 1996). Por lo tanto, la actividad analgésica de los AINEs se debe a la interferencia con PGE₁ y PGF₂ (Hahn *et al.*, 1982; Grace *et al.*, 2001) y a su capacidad para inhibir la vasodilatación vascular cerebral mediada por las PGs (Lonigro *et al.*, 1978; Chapleau *et al.*, 1980).

Además, varios estudios han mostrado que la actividad antipirética de los AINEs se desarrolla a través de la inhibición de la síntesis de PGE₂ en el área hipotalámica preóptica en el órgano cincunventricular (Wit & Wang, 1968; Lovejoy Jr., 1978; Morimoto *et al.*, 1988).

7. 4. 4 EFECTOS ADVERSOS GASTROINTESTINALES

Los AINEs actúan de forma diferente para inhibir COX-1 y COX-2, de ahí la razón de que se clasifiquen en dos grupos: AINEs no selectivos, que inhiben tanto COX-1 como COX-2, y AINEs COX-2 selectivos (Ishiguro & Kawahara, 2014). Por lo tanto, su actividad clínica es diferente, y en consecuencia también poseen una capacidad diferente para generar efectos secundarios o adversos. Entre los AINEs no selectivos se incluyen aspirina, indometacina (INDO), piroxicam, diclofenaco e ibuprofeno. Estos fármacos al inhibir predominantemente COX-1, inhiben la actividad plaquetaria y causan significativos efectos secundarios a nivel GI y renal (Frölich., 1997). Dentro de este grupo, se considera que la INDO es uno de los AINEs más perjudiciales para la mucosa GI (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016).

Ya que una gran mayoría de los AINEs existentes tienden a ser predominantemente inhibidores para la COX-1, se han desarrollado nuevos compuestos que inhiben predominantemente la isoforma COX-2 (meloxicam y nimesulida) y otros compuestos que inhiben selectivamente COX-2 (celecoxib y rocoxib) (Hawkey., 1999) (figura 7). Estos fármacos han demostrado inhibir la respuesta inflamatoria sin producir daño en la mucosa gástrica, aunque algunos se han vinculado con toxicidad cardiovascular (Mukherjee *et al.*, 2001).

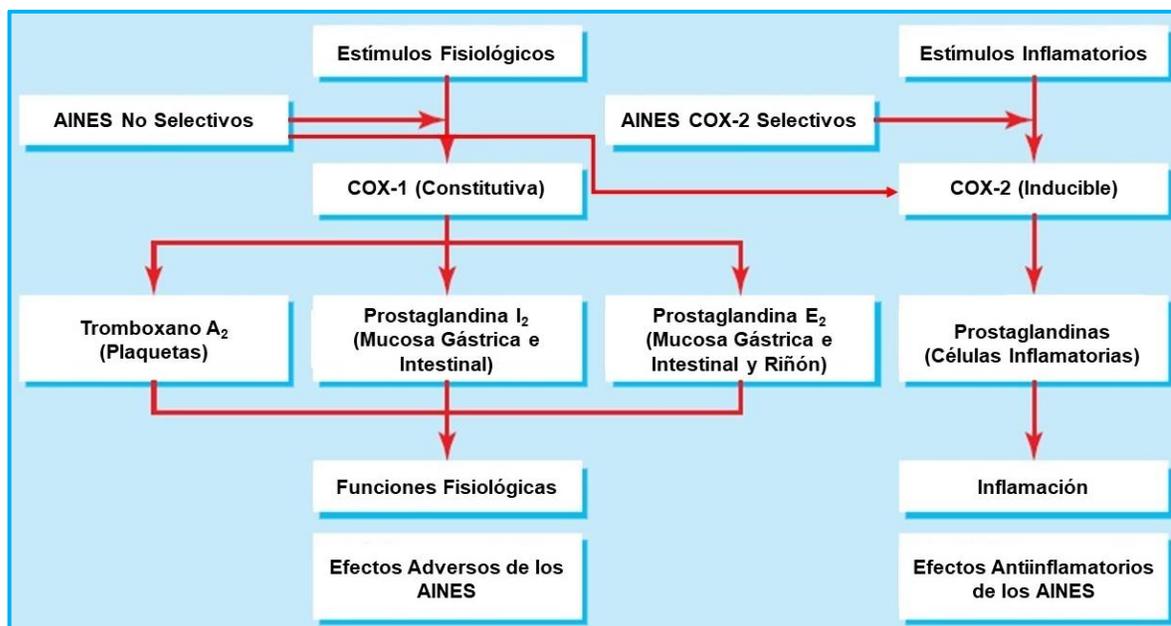


Figura 7. Mecanismo de acción de los AINEs (Vonkeman *et al.*, 2006). El efecto de los AINEs se debe a la capacidad que poseen de inhibir a la enzima COX y se clasifican como AINEs selectivos de COX-2 y AINEs no selectivos, que inhiben tanto a COX-1 como a COX-2.

El uso prolongado de AINEs se asocia frecuentemente con efectos adversos, siendo los más importantes en frecuencia e impacto clínico los que afectan a la mucosa GI (Carrasco-Pozo *et al.*, 2016). La sintomatología que puede manifestarse por el daño e irritación en la mucosa incluye dolor gástrico, acidez estomacal, náuseas, vómitos, sangrado, dispepsia, ulceración, perforación y en casos graves hemorragia y muerte (Davies & Wallace, 1997).

7. 4. 4. 1 MECANISMOS DE DAÑO GÁSTRICO

Existen principalmente tres mecanismos por los cuales estos fármacos inducen complicaciones gástricas, los cuales se detallan en la figura 8 (Sinha *et al.*, 2013):

- 1) Inhibición de la síntesis de PGs gastroprotectoras.

La enzima COX-1 es responsable de la síntesis de PGs que poseen una función gastroprotectora, ya que como se ha mencionado anteriormente disminuyen la secreción de ácido gástrico por las células parietales en el estómago, aumentan el flujo sanguíneo de la mucosa, estimulan la liberación de moco viscoso y bicarbonato, y regulan la

proliferación epitelial (Konturek *et al.*, 2004; Gudis & Sakamoto, 2005). Por lo tanto, la gastropatía inducida por AINEs es causada principalmente por la inhibición de COX-1 (Davies & Wallace, 1997).

2) Permeabilización de la membrana.

Se han realizado estudios con la finalidad de comparar la inhibición de COX y la toxicidad de los AINEs empleando diferentes vías de exposición (intragástrica, rectal o parenteral) (Lichtenberger., 2001), de tal forma que ha quedado demostrado que independientemente de la vía de administración estos fármacos tienen un efecto citotóxico directo sobre las células de la mucosa gástrica, lo cual genera un aumento en la permeabilidad de la membrana y alteración de la barrera epitelial. La citotoxicidad se asocia a un desacoplamiento en la fosforilación oxidativa (Somasundaram *et al.*, 1997), así como también a la inhibición competitiva de enzimas en la vía de la glucólisis anaeróbica y el ciclo del ácido tricarbóxico, reduciendo así la producción de ATP (Davies & Wallace, 1997) y favoreciendo la necrosis y apoptosis en las células epiteliales (Tomisato *et al.*, 2001).

3) Producción de mediadores proinflamatorios.

La inhibición en la síntesis de PGs por AINEs conduce a la activación de una segunda ruta metabólica del AA, denominada vía de la LOX (Zha *et al.*, 2004). En la vía de la LOX se producen LTs que causan inflamación, isquemia y una mayor producción de TNF- α , de tal forma que conducen a una oclusión de la microvasculatura gástrica, la disminución del flujo sanguíneo, la liberación de ROS que reaccionan con ácidos grasos poliinsaturados de la mucosa, que a su vez conduce a la peroxidación de lípidos y daño tisular (Sinha *et al.*, 2013). Además, se produce un incremento en la extravasación de neutrófilos a través de la microcirculación gástrica y mesentérica, favoreciendo de tal forma, la activación y liberación de ROS y proteasas (Davies & Wallace, 1997).

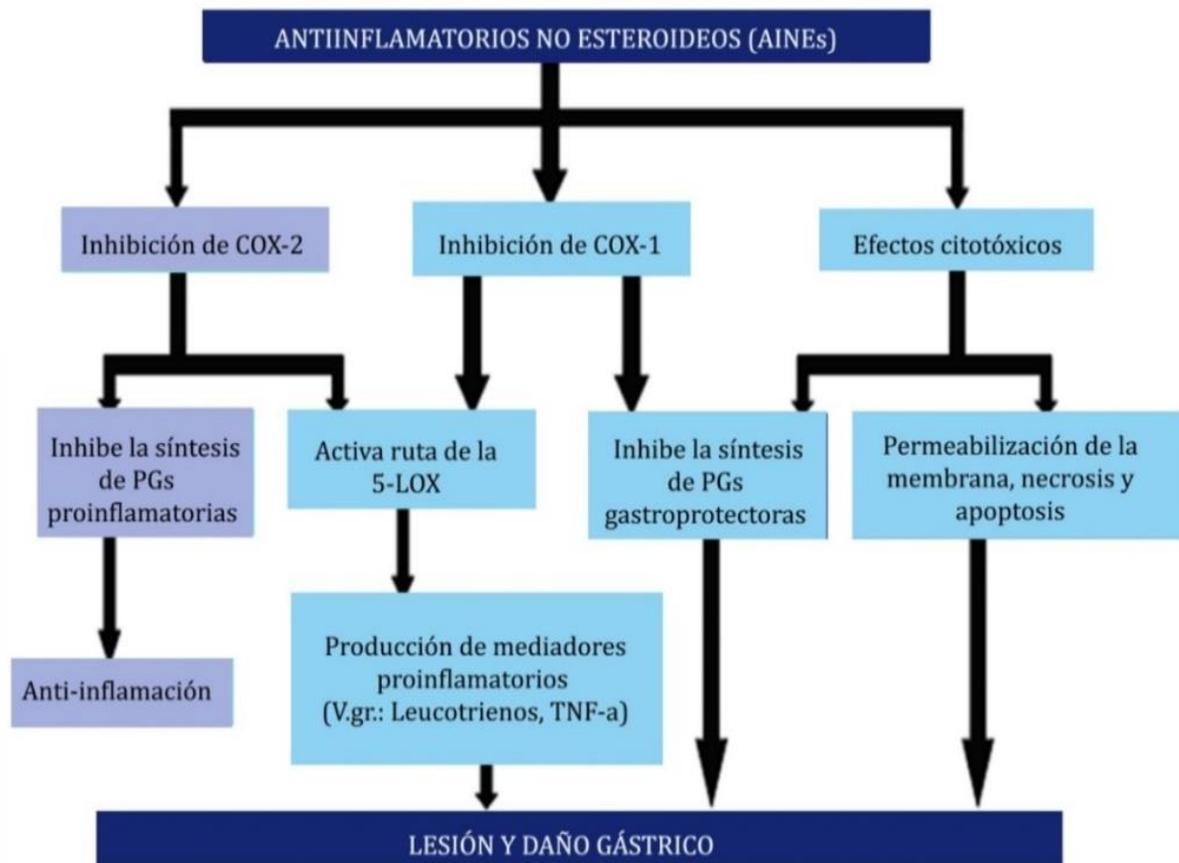


Figura 8. Mecanismos de los AINEs para inducir daño gástrico (Sinha et al., 2013). El efecto farmacológico de los AINEs se asocia con inhibición de COX-2, que bloquea la síntesis de las prostagandinas (PGs) inflamatorias; por otro lado los efectos adversos puede deberse a la: 1) Activación de la ruta de la lipooxigenasa (5-LOX), causado tanto por la inhibición de COX-1 como COX-2, que favorece la producción de mediadores proinflamatorios, como leucotrienos y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α . 2) Con la inhibición de COX-1, se inhibe la síntesis de todas aquellas PGs que tienen función gastroprotectora. 3) Efectos citotóxicos directos del fármaco, es decir, se activan mecanismos que generan una citotoxicidad que posteriormente favorece un incremento en la permeabilidad de la membrana, necrosis y apoptosis.

7. 4. 4. 2 MECANISMOS DE DAÑO INTESTINAL (ENTEROPATÍA)

El daño que producen los AINEs no se limita únicamente a la mucosa gástrica, pues se ha demostrado que también puede extenderse hasta el intestino delgado, de forma tal que a esta condición se le conoce con el término de enteropatía por AINEs (Carrasco-Pozo et al., 2016). Sin embargo, la información que existe sobre el efecto tóxico de los AINEs a nivel gástrico es más abundante con respecto a la que se tiene sobre el daño que producen más allá del duodeno (Scarpignato., 2008). Actualmente se sabe que la enteropatía por AINEs envuelve mecanismos más complejos y multifactoriales, siendo los más evidentes y los que más se discuten: el aumento en la permeabilidad epitelial, el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ácido biliar, los neutrófilos y citocinas inflamatorias, y la presencia de bacterias y virus (Scarpignato., 2008; Muraki *et al.*, 2014). Por lo tanto, las manifestaciones clínicas y subclínicas de la enteropatía asociada a los AINEs inician con un incremento en la permeabilidad de la mucosa, que puede progresar hasta lesiones, erosiones, úlceras, sangrado y de forma menos frecuente, estenosis y perforación (Banerjee., 1990). Además, se ha identificado una absorción alterada de vitamina B12, algunos metales y ácidos biliares, lo cual contribuye al desarrollo de anemia y al incremento en la morbilidad a causa de estos fármacos (Davies & Wallace, 1997).

Inicialmente, los proyectos de investigación se enfocaban en evaluar los efectos secundarios de los AINEs a nivel gástrico y no se le daba mucha importancia a la enteropatía, esto debido a que muchas veces se produce de manera asintomática. El primer reporte sobre la lesión del intestino por AINEs, fue publicado en 1966, siendo la INDO el fármaco que se utilizó para inducir la enteropatía (Shack *et al.*, 1996); desde entonces, numerosos informes han sido publicados al respecto, de tal forma que el tema ha despertado mayor interés, en especial con los avances producidos en los estudios por endoscopia, ya que esto ha permitido determinar que aproximadamente entre el 50 al 70% de los pacientes que usan de forma prolongada AINEs desarrollan daño en el intestino delgado, que posteriormente puede ocasionar resultados graves como perforación y sangrado (Montalto *et al.*, 2013).

La mayoría de los AINEs consisten en ácidos débiles lipófilos que solubilizan los fosfolípidos de la membrana en las células intestinales, de tal forma que provocan daño en los procesos oxidativos mitocondriales e inducen la liberación de ROS y la alteración en las uniones intercelulares, que a su vez provocan un incremento en la permeabilidad de la mucosa, lo cual permite la entrada y la acción de factores luminales como las macromoléculas de la dieta, ácidos biliares, componentes del jugo pancreático, enzimas proteolíticas, bacterias intestinales y toxinas, dando lugar a la activación de la cascada inflamatoria (figura 9) (Higuchi *et al.*, 2009). Además, la secreción de bilis también consiste en un factor importante que contribuye a incrementar el daño en la mucosa intestinal, ya que los AINES (excepto aspirina) se secretan en la bilis, dando lugar a un reciclado enterohepático con la consiguiente reexposición de los enterocitos a los factores perjudiciales (Montalto *et al.*, 2013).

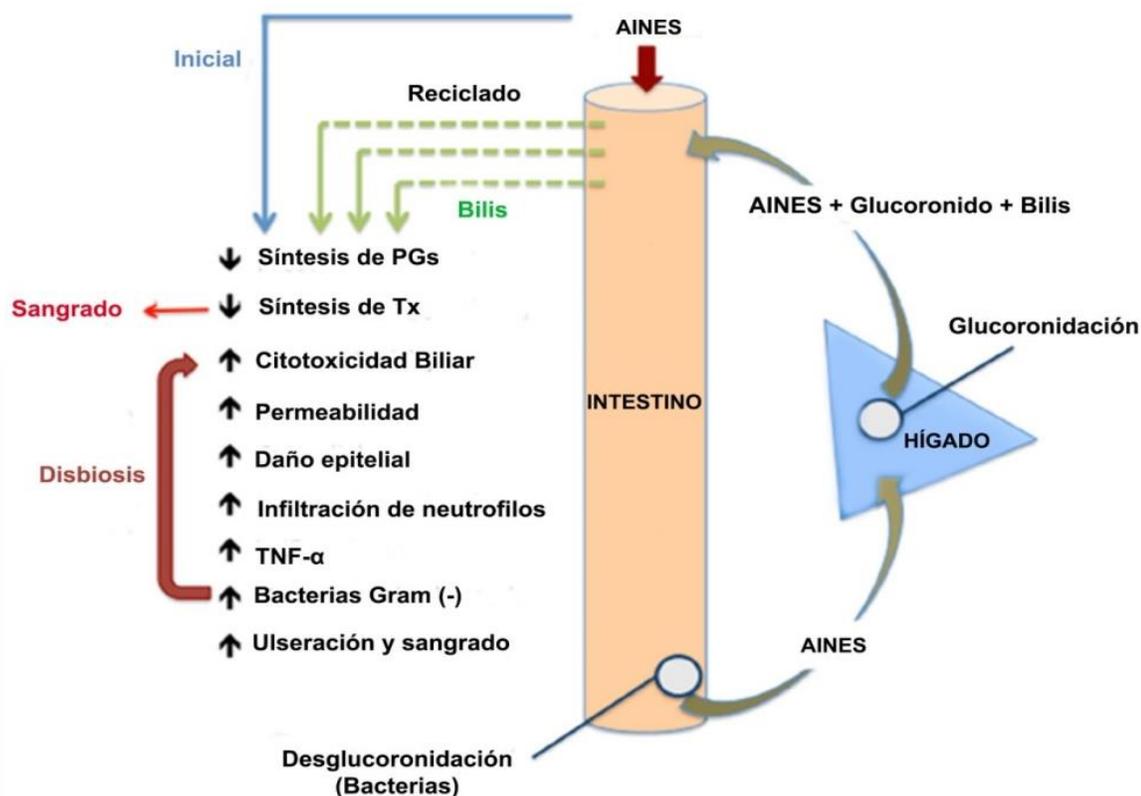


Figura 9. Mecanismo de los AINEs para exacerbar la enteropatía (Wallace-, 2015). La enteropatía por AINEs se produce mediante muchos mecanismos, pero el daño inicial surge con la supresión de la COX, de modo que se produce una disminución en la síntesis de PGs y TXs. La bilis y las bacterias entéricas y la recirculación enterohepática también juegan un papel importante para inducir la enteropatía.

Existen además ensayos experimentales y clínicos que sugieren que las bacterias entéricas desempeñan un papel importante para el desarrollo del daño intestinal generado por AINEs, ya que estos al parecer inducen una disbiosis que se vincula directamente con la enteropatía (Muraki *et al.*, 2014). El término disbiosis fue utilizado por primera vez por Bai en 1985 y hace referencia a una anomalía presente en la composición de la microbiota intestinal, en donde la población de bacterias benéficas para la salud del huésped disminuye y la población de bacterias patógenas, típicamente presentes en menor cantidad, aumentan (Bai., 1985). En 2008 Watanabe y colaboradores, confirmaron y ampliaron estos hallazgos, al mostrar que solo una disminución de los organismos Gram-negativos, pero no Gram-positivos, disminuyen el daño intestinal inducido por INDO. De hecho, en este y en otros proyectos de investigación se ha encontrado que el LPS de las enterobacterias Gram-negativas es capaz de agravar la lesión intestinal inducida por AINEs (Scarpignato, 2008). También se ha corroborado que el uso de fármacos antimicrobianos (tetraciclina, kanamicina, metronidazol o neomicina) atenúan la

enteropatía por AINEs, lo cual apoya más el papel patogénico de las bacterias entéricas (Pozzoli *et al.*, 2007; Fornai *et al.*, 2016). Además, estudios recientes demuestran que ratas libres de gérmenes o ratas gnotobióticas mono-colonizadas con *Bifidobacterium* o *Lactobacillus* no desarrollaban úlceras intestinales tras la administración de AINEs (Uejima *et al.*, 1996), de tal forma que estos y otros estudios ponen de manifiesto que la composición de la microbiota intestinal es un factor clave en la enteropatía causada por estos fármacos (Otani *et al.*, 2017).

Otani y colaboradores (2017) sugieren que el mecanismo mediante el cual los AINEs causan daño entérico se produce una vez que la función de barrera de la mucosa es alterada por los AINEs, esto como consecuencia a la deficiencia de PGs y a la disfunción mitocondrial, de tal forma que el LPS de las enterobacterias Gram-negativas (que actúa como PAMP) y la proteína 1 de la caja del grupo de alta movilidad (HMGB1, por sus siglas en inglés High Mobility Group Box 1 Protein) liberada por las células epiteliales dañadas (en su papel de DAMP), se unen al TLR4 en los macrófagos lo que induce, vía NF- κ B, MyD88 y NLRP-3 (por sus siglas en inglés Nucleotide-binding ligomerization Domain-like Receptor-3), la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β y de quimiocinas que conjuntamente inducen la infiltración de neutrófilos en la mucosa y submucosa del intestino delgado, causando daño en el intestino delgado a través de la liberación de ROS y de otras sustancias tóxicas como la elastasa (figura 10) (Otani *et al.*, 2017).

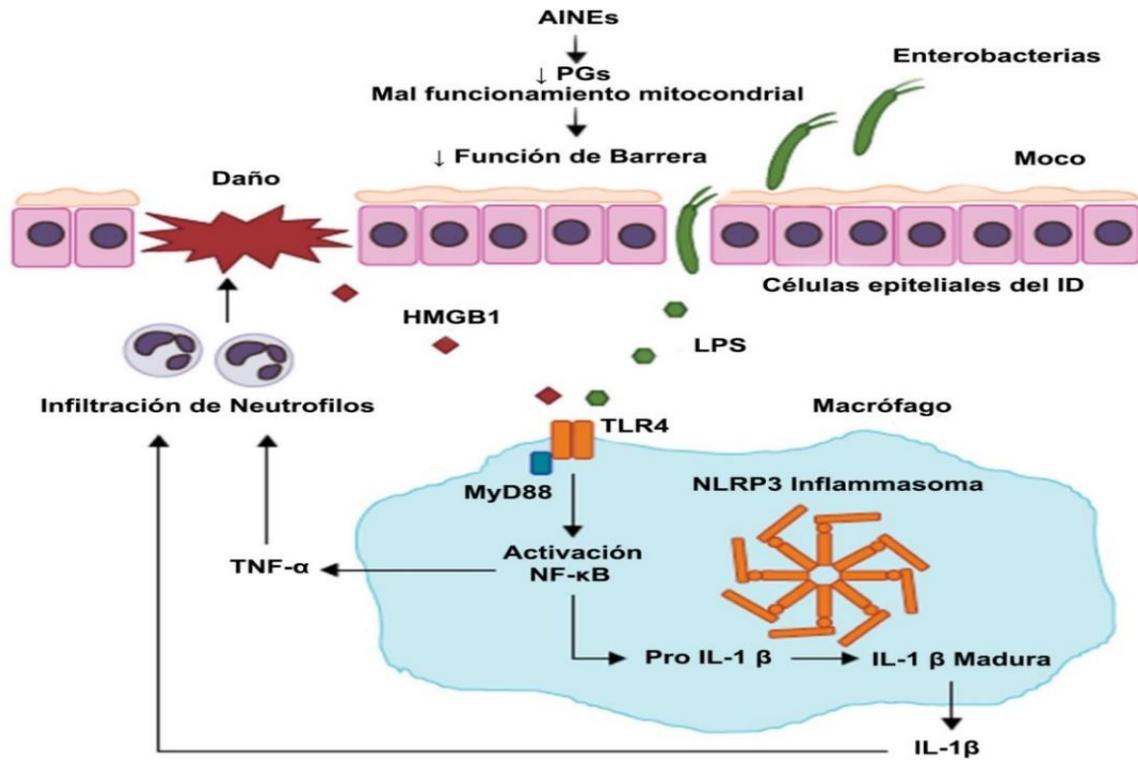


Figura 10. Mecanismo de los AINEs para inducir enteropatía (Otani *et al.*, 2017)

La función de barrera de la mucosa es alterada por los AINEs debido a la deficiencia de PGs y a la disfunción mitocondrial, el LPS de las enterobacterias Gram-negativas y la proteína de la caja del grupo de alta movilidad (HMGB)1 liberada por las células epiteliales dañadas, se unen al TLR4 en los macrófagos lo que induce (vía NF-κB, MyD88 y NLRP-3) la liberación de citocinas proinflamatorias causando daño en el intestino delgado a través de la liberación de ROS y de otras sustancias tóxicas.

Debido a que los AINEs continúan siendo el pilar para el tratamiento de numerosas patologías inflamatorias, se han desarrollado nuevas estrategias que puedan prevenir la gastroenteropatía causada por los AINEs (Blackler *et al.*, 2014). Algunas de las terapias que se aplican con mayor frecuencia son los inhibidores selectivos de COX-2 y la coadministración de los AINEs con:

- 1) Supresores de la secreción ácida como inhibidores de la bombas de protones (PPIs, por sus siglas en inglés Proton Pump Inhibitors; v.gr.: omeoprazol - OME- o lansoprazol) o antagonistas de los receptores de histamina tipo 2 (H₂) (V.gr.: famotidina)
- 2) PGs exógenas (misoprostol)
- 3) Fármacos citoprotectores (rebamipida)
- 4) Antimicrobianos (metronidazol)

También se han desarrollado nuevos compuestos que se unen a los AINEs y que ayudan a la protección intestinal, como la fosfatidilcolina (PC-AINE), los liberadores de óxido nítrico (NO-AINE) y los liberadores de ácido sulfhídrico (SH₂-AINE). Sin embargo, de todos ellos solo la coadministración de AINEs con supresores de la secreción ácida vía oral han sido aprobados por la FDA, los demás están en fase clínica o preclínica. Además, actualmente existen estudios preclínicos que buscan evaluar el papel protector de ciertos probióticos sobre la enteropatía por los AINEs (Lim & Chun, 2013).



7. 5 ALIMENTOS FUNCIONALES Y NUTRACÉUTICOS

Los alimentos contienen componentes dietéticos que proporcionan una gran variedad de beneficios para la salud, de tal modo que, actualmente existe una fuerte inclinación por evaluar sus propiedades y efectos ante algunas condiciones patológicas (Sarkar., 2007). Por lo tanto, ha surgido la necesidad de crear nuevos conceptos para definir este tipo de productos (Grajek *et al.*, 2005).

Todos los alimentos son funcionales, ya que proporcionan nutrientes u otras sustancias que proporcionan energía, sostienen el crecimiento, y mantienen o reparan procesos vitales (Granato *et al.*, 2010). Sin embargo, estudios epidemiológicos y ensayos clínicos realizados en diferentes países han demostrado que el consumo regular de algunos alimentos disminuye el riesgo de padecer enfermedades, por lo cual, proporcionan un beneficio que va más allá de cubrir con los requerimientos metabólicos (Gul *et al.*, 2016). El término “alimento funcional” se introdujo de forma inicial en Japón a mediados de los años ochenta; además, este país fue también el primero en desarrollar una legislación para su venta, la cual se denomina FOSHU (del inglés, Foods Of Specified Health Use). Solo los alimentos que cumplen con determinados requisitos (tabla 2) pueden tener el sello FOSHU (Hasler., 2002; López-Varela *et al.*, 2002; Grajek *et al.*, 2005). Entre los alimentos funcionales suelen incluirse: alimentos tradicionales, alimentos modificados (enriquecidos o mejorados), alimentos con fines médicos y alimentos para dietas especiales (Bhat y Bhat, 2011; Gul *et al.*, 2016).

Tabla 2. Criterios FOSHU para la inclusión de alimentos funcionales (López-Varela *et al.*, 2002)

1.- Son alimentos (no cápsulas, píldoras o polvo)
2.- Pueden y deben consumirse como parte de una dieta habitual
3.- Tienen una función específica en el organismo humano: <ul style="list-style-type: none"> ◆ Mejoran la respuesta inmunológica. ◆ Previenen enfermedades específicas. ◆ Contribuyen en la recuperación de algunas enfermedades. ◆ Pueden controlar malestares físicos o psíquicos. ◆ Tienen propiedades antioxidantes.

Por otro lado, los nutraceuticos consisten en productos generados a partir de alimentos, que tienen como finalidad suministrar de manera más concentrada dosis de componentes bioactivos de un alimento (Gul *et al.*, 2016). Estos se venden en presentaciones similares a los medicamentos (píldoras, extractos, soluciones, polvo, etc.), por lo tanto, funcionan más como un suplemento dietético. El término se creó en 1989 por DeFelice y la Fundación para la Innovación en Medicina mediante la contracción del término “nutrición” y “farmacéutica” (Espin *et al.*, 2007).

La diferencia entre ambos términos resulta difusa, en consecuencia, se emplean de manera indistinta tanto por las empresas que los producen, como por los consumidores (Gul *et al.*, 2016). Entre los alimentos funcionales y nutraceuticos se enlistan con frecuencia las vitaminas, ácidos grasos, la fibra dietética, probióticos y péptidos bioactivos (López-Varela *et al.*, 2002; Grajek *et al.*, 2005). En cuanto a los beneficios para la salud, se sabe que influyen de forma positiva en el tratamiento del cáncer, aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares, así como también durante el proceso del envejecimiento, para mejorar la respuesta inmune y en condiciones crónicas como la diabetes, etc (Chen., 2006; Bhat & Bhat, 2011; Gul *et al.*, 2016). Algunos de los nutrientes y componentes de los alimentos con propiedades funcionales y nutraceuticas se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Propiedades y beneficios para la salud de nutrientes y alimentos funcionales.

Alimento Funcional Nutracéutico	Propiedades	Beneficios para la salud
Fibra dietética	Regulación del equilibrio de la microbiota Mejora del tránsito intestinal Incremento en la excreción de bilis Disminución del colesterol plasmático Regulación de los niveles de la glucosa en sangre	Cáncer colorrectal Estreñimiento/diverticulosis Hipercolesterolemia Diabetes Obesidad
Antioxidantes (Vitamina A, E y C; xantófilas y flavonoides)	Eliminación de radicales libres Inhibición de la lipoperoxidación	Enfermedades cardiovasculares Cáncer
Probióticos	Mejoran la digestión de la lactosa Incrementan la absorción de calcio Estimulan el sistema inmunológico	Intolerancia a la lactosa Estreñimiento Diarrea Gastroenteritis Cáncer
Ácidos grasos (ω -3)	Disminuye los niveles de triglicéridos y colesterol Reducción de la agregación plaquetaria Estimulación del sistema inmunológico	Enfermedades cardiovasculares
Micronutrientes (Se, Fe, Cu, Zn, Mn, Ca, Fe, Ac. fólico)	Cofactores enzimáticos Estimulación del sistema inmunológico	Enfermedades cardiovasculares Cáncer Osteoporosis Anemia Defectos en el tubo neural
Aminoácidos (Triptófano, glutamina, arginina, cisteína)	Efecto sedante Mejora de la memoria y de la fatiga mental Estimulación del sistema inmunológico Ralentiza el proceso de envejecimiento	Regulación del sueño Estrés
Cafeína	Estimulación del SNC	Protección hepática Diabetes Mellitus Enfermedad de Parkinson Enfermedad de Alzheimer

7. 5. 1 PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LA LECHE Y SUS DERIVADOS

La leche, así como también sus derivados, han sido consumidos desde la antigüedad como parte de una dieta básica y saludable en diversas culturas de todo el mundo, de tal modo que, su valor nutricional se ha considerado como imprescindible para el crecimiento (Kanekanian., 2014). Esta consiste en un fluido complejo que proporciona péptidos bioactivos, lípidos e hidratos de carbono; además, posee una gran cantidad de sustancias biológicamente activas como inmunoglobulinas, enzimas, vitaminas, minerales, péptidos antimicrobianos y factores del crecimiento, que en conjunto proporcionan diversas propiedades fisiológicas que benefician la salud de quien la consume (Bhat & Bhat., 2011).

La leche bovina está compuesta por aproximadamente un 5% de lactosa, un 3. 2% de proteínas, un 4% de lípidos y un 0. 7% de sales minerales (Séverin & Wenshui, 2005). La caseína y las proteínas del suero constituyen principalmente la porción proteica de la leche, donde las caseínas (α 1-, α 2-, β - y κ -caseína) representan el 80% y el 20% restante esta consituido por lactoferrina, lactoperoxidasa, lisozima y las denominadas proteínas de suero (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, albúmina sérica e inmunoglobulinas) (McCarthy *et al.*,2014; Mohanty *et al.*, 2016).

Los péptidos biológicamente activos se definen como fragmentos que permanecen inactivos en secuencias de proteínas precursoras, pero cuando se liberan por la acción de enzimas proteolíticas, pueden interactuar con los receptores seleccionados y regular las funciones fisiológicas del cuerpo (Mohanty *et al.*, 2016). Los tres principales mecanismos mediante los cuales pueden ser liberados son (Korhonen & Pihlanto, 2003):

- 1) Hidrólisis enzimática con enzimas digestivas como pepsina, tripsina, quimotripsina, etc.
- 2) Fermentación de leche con cultivos proteolíticos de iniciación.
- 3) Proteólisis por enzimas derivadas de microorganismos proteolíticos.

7. 5. 1. 1 GLICOMACROPÉPTIDO (GMP)

El GMP es una fracción de la κ -caseína (residuo 106-169), compuesto por 64 aminoácidos, con la peculiaridad de que carece de los aminoácidos aromáticos fenilalanina (Phe), triptófano (Trp) y tirosina (Tyr), así como de cisteína (Cys); consta además de un solo residuo de metionina (Met) y es rico en aminoácidos de cadena ramificada (leucina-Leu-, isoleucina-Ile- y valina-Val-) (Thöma-Worringer *et al.*, 2006). Existen 8 variantes genéticas de la κ -caseína, de las cuales 2 predominan en la leche bovina, las variantes A y B, que se diferencian entre sí por la sustitución de dos aminoácidos. Además, el GMP se encuentra fosforilado de forma constitutiva y contiene cantidades variables de ácido N-acetilneuramínico (siálico) (Saito & Itoh, 1992). Tiene un peso molecular de 6.77-9.6 kDa (dependiendo de su grado de glicosilación), con un punto isoeléctrico entre 3 y 4, es altamente soluble en agua, con carga neta negativa incluso a bajos valores de pH y estable al calor (Thöma-Worringer *et al.*, 2006). Debido a la ausencia de aminoácidos aromáticos es detectado únicamente a una longitud de onda de 205 a 217 nm (Tomczak *et al.*, 2007).

Por sus propiedades nutricionales y por no ser inmunogénico (Mikkelsen y cols., 2006), el GMP ya se está utilizando en la industria alimenticia y farmacéutica. El GMP, además de proporcionar un buen sabor y sensación a la boca (Thomä-Worringer *et al.*, 2006), tiene diversas funciones entre las que destacan su potencial uso como sustituto alimenticio en la dieta de pacientes con fenilcetonuria por carecer de fenilalanina en su composición; además puede ser usado como ingrediente en la dieta para pacientes que sufren de enfermedades hepáticas por su bajo contenido de Met y su alto contenido en aminoácidos de cadena ramificada, los cuales pueden ser utilizados como fuente de energía (Tomczak *et al.*, 2007). Como componente del suero, se introduce en fórmulas infantiles como fuente de aminoácidos (Abd El-Salam *et al.*, 2006). También se ha encontrado que el GMP consumido antes de cualquier alimento puede reducir la ingesta calórica (Thomä-Worringer *et al.*, 2006). Desde el punto de vista de su farmacodinamia, el GMP puede ser detectado en el plasma de ratas después de la ingestión de caseína humana (Chabance *et al.*, 1995). Por otro lado, los máximos niveles encontrados de GMP en plasma de adultos tras la ingestión de leche y yogur, fueron de 0.5-2.0 y 1.05-10 $\mu\text{g/ml}$

respectivamente, además de poder detectarse el GMP en plasma humano de 1 a 8 h después de la ingesta de los mismos alimentos (Chabance *et al.*, 1998).

Son varias las funciones biológicas que se han atribuido al GMP. Se une a la toxina del cólera, pero cuando es tratado con sialidasas pierde completamente esta actividad (Brody., 2000); lo mismo ocurre con otras toxinas bacterianas, como la toxina termolábil (LT)-I y LT-II de *E. coli* (Isoda *et al.*, 1999); además, se ha reportado que inhibe la adhesión bacteriana y viral, pues tal parece que protege de la infección por el virus de la influenza (Thomä-Worringer *et al.*, 2006) y también inhibe la adhesión de bacterias cariogénicas tales como *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* y *S. sobrinus* a la cavidad oral y modula la composición de la microbiota de la placa dental. Este efecto ayuda al control de la formación ácida en la placa dental, así como a la reducción de la disolución de la hidroxiapatita en el esmalte de los dientes y la promoción de la remineralización, razón por la cual ha sido patentado para la aplicación en productos de higiene personal para prevenir la caries dental (Thomä-Worringer *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado que el GMP inhibe la hemaglutinación por parte de cuatro cepas del virus de la influenza y previene la inducción de transformaciones morfológicas de linfocitos de sangre periférica por el virus de Epstein Barr (Brody., 2000).

Al GMP se le han descrito propiedades prebióticas, antiinflamatorias, inmunorreguladoras y antioxidantes.

7. 5. 1. 1. 1 PROPIEDADES PREBIÓTICAS

Anteriormente se le habían descrito al GMP efectos inductores en el crecimiento *in vitro* de ciertas cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Azuma *et al.*, 1984; Bezkorovainy *et al.*, 1979), pero ha sido hasta recientemente cuando estos resultados fueron corroborados con nuevas tecnologías por el grupo de Robitaille (Robitaille., 2013). Por otro lado, un grupo de investigadores liderado por la Dra. Eva Salinas del laboratorio de inmunología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (U.A.A), en este aspecto, han logrado demostrar que la administración de GMP vía oral en animales alérgicos incrementa la cantidad de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, en el contenido intestinal (Jimenez *et al.*, 2016). Estos resultados coinciden con los reportados por otros

grupos utilizando dosis mucho más bajas en ratones sanos (Chen *et al.*, 2012). Además, cuyos (*Cavia porcellus*) que recibieron una dieta suplementada con GMP durante 15 días mostraron un número incrementado de *Lactobacillus* en el íleon y colon proximal (Hermes *et al.*, 2013), mientras que ratones alimentados crónicamente con una dieta enriquecida en GMP incrementaron los *Bacteroides* en heces (Sawin *et al.*, 2015).

7. 5. 1. 1. 2 PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS E INMUNORREGULADORAS

Estudios *in vivo* también han demostrado que el GMP posee propiedades antiinflamatorias e inmunorreguladoras al modular la respuesta de los linfocitos T y B, de tal forma que ha mostrado actuar como un antiinflamatorio en diferentes modelos de ileítis y colitis en rata mediante su actividad reguladora sobre la diferenciación de los linfocitos (Daddaoua *et al.*, 2005; González *et al.*, 2013; Requena *et al.*, 2008; Requena *et al.*, 2010). Uno de los beneficios del GMP en estos modelos de inflamación intestinal fue la reducción en la producción y actividad de los ROS, lo que atenuó el daño en el tejido (Daddaoua *et al.*, 2005; González *et al.*, 2013). De igual manera, en un modelo de daño colónico causado por dimetil-hidrazina, la administración oral de GMP previno un daño excesivo a nivel del colon. Un estudio reciente, en donde de forma experimental se indujo colitis ulcerosa en ratones, sugiere que el GMP podría mejorar de forma significativa la lesión morfológica de la mucosa intestinal, pues se encontró que disminuye de forma significativa la expresión de la molécula de adhesión celular adresina mucosal (MAdCAM, del inglés Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule)-1, el número de células positivas a las moléculas de superficie clúster de diferenciación 4 (CD4, del inglés Cluster of Differentiation) y CD8 en la lámina propia de la mucosa intestinal, así como también parece ser capaz de estimular la secreción de IgA para aumentar la inmunidad intestinal (Cui *et al.*, 2017). Además, su acción antiinflamatoria e inmunoreguladora también ha demostrado prevenir el desarrollo de la respuesta inmune alérgica y atenuar las manifestaciones clínicas y la inflamación asociada a la urticaria, anafilaxia, dermatitis atópica y asma alérgicas, trabajos desarrollados también en el laboratorio de inmunología de la U.A.A (Jiménez *et al.*, 2012; Jiménez *et al.*, 2016, Roldan *et al.*, 2016, Muñoz *et al.*, 2017).

Por otra parte, estudios *in vitro* han mostrado una acción directa del GMP sobre la actividad de algunas células del sistema inmune relacionadas con la respuesta inflamatoria. El GMP inhibe la proliferación inducida por LPS o fitohemaglutinina de esplenocitos de ratón y células de placas de Peyer obtenidas de conejo (Otani *et al.*, 1995), regula positivamente la expresión del componente soluble semejante al antagonista del receptor de la IL-1 y suprime la expresión del receptor para IL-2 en linfocitos T de ratón (Monnai & Otani 1997; Otani *et al.*, 1996).

Los resultados sobre el efecto del GMP sobre la actividad de los macrófagos muestran que el GMP aumenta la proliferación y actividad fagocítica de la línea de macrófagos humanos U937 y regula positivamente la secreción de TNF- α , IL-1 β e IL-18 en la línea THP-1 de monocitos humanos (Li *et al.*, 2004; Requena *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando la línea de macrófagos RAW 264.7 es activada por LPS, el GMP y algunos péptidos derivados de su hidrólisis enzimática disminuyen la producción de NO, así como los niveles de expresión de TNF- α , IL-1, la enzima NO sintetasa inducible (iNOS, del inglés Inducible Nitric Oxide Synthase), el receptor TLR4 y la proteína MyD88 (Cheng *et al.*, 2015). Trabajos realizados con mastocitos, una de las principales células iniciadoras del proceso inflamatorio, han descrito que el GMP disminuye *in vivo* e *in vitro* la activación de los mastocitos por el alérgeno e inhibe la secreción de histamina por parte de estas células (Jiménez *et al.*, 2016).

7. 5. 1. 1. 3 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

En relación con su capacidad antioxidante, trabajos realizados por Chen y colaboradores (2015) muestran que tanto el GMP como productos de su hidrólisis tienen capacidad neutralizadora sobre algunos productos con actividad oxidativa, reducen la producción de ROS por la línea de macrófagos RAW 264.7 protegiendo a las células de su efecto citotóxico y además aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes en las células dañadas. Además, el GMP administrado vía oral en ratas obesas estimula la actividad de enzimas antioxidantes en el hígado (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) y disminuye la cantidad de productos derivados de la peroxidación lipídica como el malondialdehído (Xu *et al.*, 2013). De igual manera, productos derivados de la hidrólisis del GMP por la papaína bloquean la generación intracelular de ROS inducida por

peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en la línea celular de carcinoma hepático humano HepG2 y las protege del daño citotóxico mediante la activación del factor 2 de transcripción nuclear eritroide (Nrf2, del inglés Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor) el cual induce la expresión de enzimas antioxidantes, como la hemooxigenasa-1, a través de las vías de las MAP kinasas (ERK y p38) (Li *et al.*, 2017).

7. 5. 2 PROBIÓTICOS

La palabra probiótico se deriva del griego y tiene como significado “*por vida*” (Ashraf & Shan, 2014; Mahajan & Singh, 2014). Históricamente, el concepto tuvo su origen aproximadamente en 1908 cuando el premio Nobel en Medicina Ilya Ilyich Metchnikoff en el Instituto Pasteur, fue el primero en descubrir que el consumo de bacterias vivas (*Lactobacillus bulgaricus*) en yogurt o leche fermentada mejoran las características biológicas del tracto GI (Amara & Shibil, 2015; Khoder *et al.*, 2016). Posteriormente, el término probiótico fue utilizado por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell para describir las sustancias que son secretadas por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro (Mahajan & Singh, 2014; Amara & Shibil, 2015). Sin embargo, el término como tal, fue popularizado por R. Fuller (Fuller., 1989). Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ACIPP) han definido a los probióticos como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped (Verna & Lucak, 2010; Khoder *et al.*, 2016).

A la fecha, aun no se ha logrado aclarar con precisión cuales son los mecanismos mediante los cuales actúan los probióticos. Sin embargo, los mecanismos potenciales a considerar incluyen:

- 1) Modulación de la inmunidad GI mediante la alteración de los perfiles de citocinas inflamatorias y regulación negativa de las cascadas proinflamatorias o inducción de mecanismos reguladores de una forma específica de la cepa (Borrueal *et al.* 2002; McCarthy *et al.* 2003; Pena & Versalovic, 2003; Hart *et al.* 2004; Smits *et al.* 2005; Roselli *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2007; Borchers *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2008;).

2) Inhibición de la adherencia de especies bacterianas patógenas (Mukai *et al.*, 2004; Collado *et al.* 2005; Cotter *et al.* 2005; Collado *et al.*, 2006; Makras *et al.*, 2006; Vanderpool *et al.*, 2008).

3) Alteración de la microbiota bacteriana, debido a la acidificación del colon como consecuencia de la fermentación de nutrientes (Pathmakanthan *et al.* 2004)

4) Favorecen un incremento en la función de la barrera epitelial (Servin., 2004; Sherman *et al.* 2005)

5) Inducción de receptores μ -opioides y cannabinoides en células epiteliales intestinales (Rousseaux *et al.* 2007).

6) Disminución en la hipersensibilidad visceral y de la respuesta al estrés (Matsumoto *et al.* 2005; Quigley & Flourie, 2007)

Los probióticos están disponibles en una amplia variedad de formulaciones que van desde pastillas y polvos, hasta yogures, leche y jugos, de tal manera que actualmente, cada vez se emplean con mayor frecuencia para el tratamiento alternativo en diversas condiciones patológicas, tales como enfermedades alérgicas (dermatitis atópica, posiblemente rinitis alérgica), vaginosis bacteriana, infecciones del tracto urinario, prevención de caries dental o infecciones respiratorias y trastornos del tacto GI (Verna & Lucak, 2010).

7. 5. 2. 1 LACTOBACILLUS: LACTOBACILLUS RHAMNOSUS

Los probióticos más estudiados para tratar y/o prevenir enfermedades GI incluyen algunas especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, ya que no son patógenas y pueden resistir el ambiente luminal del tracto GI (Bezkorovainy., 2001). El género *Lactobacillus* se encuentra integrado en su mayoría por bacterias que convierten los azúcares en ácido láctico, de modo que, actualmente contiene más de 180 especies Gram-positivas, anaerobias facultativas o microaerofílicas (microorganismos que para sobrevivir requieren de niveles de oxígeno inferiores a los que se encuentran de manera habitual en la atmósfera de la tierra) (Capurso., 2019). Son diversos los estudios que han revelado una serie de efectos benéficos de ciertos *Lactobacillus*, como la supresión de bacterias patógenas en el intestino y la inhibición de los cambios alérgicos, inflamatorios y neoplásicos (Shyu *et al.*, 2014; Cain *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2010; Isolauri *et al.*, 2001).

Además, se ha demostrado que son particularmente útiles para promover la cicatrización de úlceras gástricas en ratas, cuando se administran como cepa probiótica individual, como *Lactobacillus rhamnosus* GG (Gorbach-Goldin, LGG), *Lactobacillus gasseri* o *Lactobacillus acidophilus*, o como una mezcla probiótica (Khoder *et al.*, 2016). Sin embargo, aún es poco lo que se ha estudiado con respecto a su papel en la prevención y resolución de la enteropatía inducida por AINEs (Kamil *et al.*, 2007).

El LGG, ATCC 53103 fue aislado en 1985 por Sherwood Gorbach y Barry Goldwin de muestras fecales de un individuo adulto y sano (Sergers & Lebeer, 2014). Consiste en la cepa probiótica más estudiada, quizá por su gran potencial en el tratamiento y prevención de la diarrea, infecciones infantiles, alergias y eccema atópico (Fong *et al.*, 2015).

Una de las características más ampliamente estudiadas sobre LGG es su fuerte capacidad adhesiva, que se ha documentado tanto *in vitro* como *in vivo*. El LGG comparado con cepas como *L. johnsonii* LJ1 y *L. casei* Shirota, ha demostrado adherirse mejor al moco intestinal, de modo que persiste durante más tiempo y a concentraciones más elevadas. Además, estudios genéticos han revelado que sus pillis y las proteínas de unión que produce mejoran las propiedades adherentes de la cepa (Tuomola *et al.*, 1999; Vélez *et al.*, 2010; Sergers & Lebeer, 2014; Capurso., 2019). Por otro lado, también se ha informado que la cepa LGG previene la inflamación y la muerte celular de las células epiteliales, mejorando así la regeneración de la mucosa (Flach *et al.*, 2018).

En cuanto a la respuesta antiinflamatoria que desencadena LGG en la mucosa, se sugiere que es regulada a través de una interacción directa con los macrófagos, los linfocitos CD4⁺ y las DC, lo que favorece una disminución en la producción de citocinas proinflamatorias como TNF, IL-2 e IL 4 *in vitro*. Además, los factores solubles de LGG promueven el crecimiento y la supervivencia de las células epiteliales a través de la inhibición de la apoptosis celular mediada por TNF- α mediante la activación de Akt antiapoptótico y la proteína cinasa B (Pena *et al.*, 2003; Donkor *et al.*, 2012; Flach *et al.*, 2018; Capurso., 2019).

Aunque la información obtenida hasta ahora sobre el efecto del LGG en el daño gastroentérico inducido por AINEs es un poco controversial (Gotteland *et al.*, 2001; Kamil *et al.*, 2007), los datos existentes sobre su capacidad adhesiva sobre células del epitelio mucoso y sus propiedades inmunorreguladoras (Capurso *et al.*, 2019) sugieren que puede ser un buen candidato para co-adyuvar los efectos benéficos inducidos por otras sustancias en la prevención de la inflamación inducida por AINEs.



8. JUSTIFICACIÓN

Los AINEs son fármacos ampliamente prescritos, ya que se consideran el pilar para el tratamiento de numerosas patologías inflamatorias. Además, también se emplean de forma amplia en el tratamiento de la fiebre, dolor y enfermedades cerebrovasculares y cardiopatías isquémicas, etc. Son utilizados por aproximadamente 30 millones de personas cada día. En Estados Unidos se calcula que anualmente se extienden más de 111 millones de recetas en donde se prescribe su uso, y que aproximadamente representan el 60% del mercado de analgésicos sin receta. El uso de AINEs, particularmente el uso crónico, aumenta con la edad, con un estimado de 10-40% de las personas mayores de 65 años que los utilizan crónicamente.

De forma extensa se conoce que el uso de los AINEs provoca diversos efectos adversos, dentro de los cuales destacan de forma formidable las complicaciones en el tracto GI, tales como úlceras, sangrado y perforación. Se ha demostrado que estos eventos adversos ocurren en aproximadamente 1-1.5% de los pacientes en los primeros 12 meses de tratamiento con AINEs. También se ha demostrado que tales complicaciones GI asociadas a los AINEs ocurren no solo en el tracto GI superior, sino también en el tracto GI inferior. Además, resulta importante destacar que asociada a la patología GI se produce inflamación y estrés oxidativo.

Con la finalidad de atenuar las complicaciones asociadas al uso de estos fármacos, se ha recurrido al uso de PPI, sin embargo, líneas de investigación recientes sugieren que el uso concomitante de ambos fármacos exacerba la enteropatía o daño intestinal. Por lo cual, teniendo en cuenta el consumo elevado de los AINEs, así como también su alta prevalencia de efectos adversos (particularmente en el tracto GI) actualmente se ha incrementado el interés por aclarar los mecanismos subyacentes a los efectos secundarios de estos fármacos y en evaluar estrategias preventivas.

En los últimos años ha surgido un gran interés en los nutraceuticos o alimentos funcionales, que consisten en productos relacionados con los alimentos que otorgan beneficios para la salud al consumidor más allá de su valor nutricional básico. Su origen

como parte de los productos alimentarios y su toxicidad extremadamente baja son especialmente atractivos, ya que de esta forma existe la posibilidad de prevenir o incluso disuadir procesos patológicos como un complemento a la dieta regular. El GMP es uno de los principales péptidos bioactivos que componen el suero de la leche, es producido durante la elaboración del queso y su purificación a gran escala es sencilla, económica y rentable por la gran cantidad de lacto suero que genera la industria quesera. Además, las empresas alimenticias lo utilizan en la elaboración de complementos alimenticios para saciar el apetito, para la alimentación de enfermos de fenilcetonuria o de padecimientos hepáticos y en suplementos para deportistas. Tomando en consideración sus propiedades prebióticas, antiinflamatorias, inmunorreguladoras y antioxidantes, sería importante realizar un estudio que analice los efectos de la administración oral de GMP sobre el daño GI inducido por la administración de AINEs.

Desde hace tiempo se sugiere que el uso de probióticos podría ser un buen tratamiento alternativo para los efectos adversos que generan los AINEs, de tal modo que el LGG es el que más destaca desde esta perspectiva, ya que diversos estudios sugieren que protege la mucosa gástrica. En función de la actividad prebiótica demostrada al GMP, sería muy interesante evaluar el efecto antiinflamatorio que se genera a nivel GI al utilizar el GMP administrado conjuntamente con LGG en modelos experimentales de daño gastroentérico por AINEs.

9. HIPÓTESIS

El GMP tiene un efecto protector en ratas Wistar con daño gastroentérico por AINEs.



10. OBJETIVOS

10. 1 OBJETIVO GENERAL:

Analizar el efecto protector del GMP administrado vía oral, solo o combinado con probióticos, sobre el daño gastroentérico inducido por AINEs en rata Wistar.

10. 2 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Desarrollar y caracterizar un modelo de gastroenteropatía por administración de AINEs en rata Wistar.
2. Analizar datos metabólicos diarios en ratas con daño gastroentérico inducido por la administración de AINEs, y tratados con GMP solo o combinado con probióticos.
3. Evaluar la morfología y parámetros bioquímicos del tejido GI de ratas administradas con AINEs, y tratadas con GMP solo o combinado con probióticos.
4. Cuantificar marcadores bioquímicos plasmáticos de daño GI en ratas administradas con AINEs, y tratadas con GMP solo o combinado con probióticos.
5. Analizar la integridad de la barrera en la mucosa intestinal tras la administración de AINEs, y el efecto del tratamiento con GMP solo o combinado con probióticos.
6. Evaluar el grado de inflamación de la mucosa intestinal tras la administración de AINEs, y el efecto del tratamiento con GMP solo o combinado con probióticos.

11. METODOLOGÍA

11.1 ANIMALES

Para la implementación del modelo de daño gastroentérico se emplearon ratas Wistar macho. Los animales se mantuvieron en el bioterio del edificio 202, bajo condiciones controladas de temperatura (22-24 °C) y ciclos de luz-oscuridad de 12-12 horas. La dieta consistió en comida para roedor (Nutricubos, Purina) y agua de la llave *ad libitum*. Los animales se habituaron a las condiciones del bioterio del edificio 202 quince días antes de desarrollar el modelo de daño GI por AINEs. Los animales fueron tratados siguiendo los lineamientos institucionales dictados por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

11.2 GRUPOS Y PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Con la finalidad de evaluar la supervivencia de los animales a diferentes dosis de INDO, se desarrolló un **protocolo A** con los siguientes grupos experimentales formados por ratas Wistar macho de 150-200 g de peso corporal:

- ❖ CONTROL (n=9): se administró 1ml de solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 5 % vía oral.
- ❖ INDO 4 (n=10): se administró 4 mg/Kg de INDO en Na_2CO_3 al 5 % vía oral.
- ❖ INDO 6 (n=10): se administró 6 mg/Kg de INDO en Na_2CO_3 al 5 % vía oral.
- ❖ INDO 8 (n=10): se administró 8 mg/Kg de INDO en Na_2CO_3 al 5 % vía oral.
- ❖ INDO 10 (n=10): se administró 10 mg/Kg de INDO en Na_2CO_3 al 5 % vía oral.

Posteriormente, para la caracterización del modelo de daño gastroentérico por AINEs se trabajó en un **protocolo B** con los siguientes grupos experimentales, formados por ratas Wistar macho de 150-200 g de peso corporal:

- ❖ CONTROL (n=7): se administró 1ml de Na₂CO₃ al 5 % vía oral.
- ❖ INDO 6 (n=8): se administró 6 mg/Kg de INDO en Na₂CO₃ al 5 % vía oral.
- ❖ INDO 8 (n=8): se administró 8 mg/Kg de INDO en Na₂CO₃ al 5 % vía oral.

A partir del día 1 del ensayo, por vía esofágica y hasta el día 5 (día previo al sacrificio de los animales), la INDO (Sigma-Aldrich, E.U.A) se administró a las dosis indicadas anteriormente para cada grupo en Na₂CO₃ al 5% (Kamil *et al.*, 2007; Yoda *et al.*, 2010; Abimosleh *et al.*, 2013). Las soluciones de INDO se prepararon justo antes del uso y se administró a razón de un volumen de 1 ml/200 g de peso corporal (Singh *et al.*, 2016). Tras la última dosis de INDO en el día 5, los animales se mantuvieron en ayuno durante 12 h, pero con libre acceso a agua (Sing *et al.*, 2016) y el día 6 se sacrificaron por una sobredosis de anestesia (éter etílico) (figura 11). Diariamente y hasta el día 6, se registró la supervivencia de animales de cada grupo.

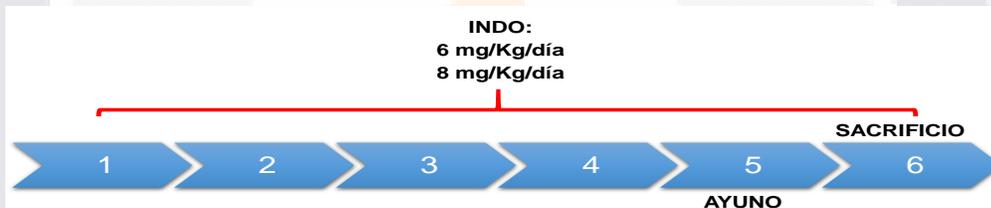


Figura 11. Esquema del protocolo B de daño gastroentérico por AINEs. Desde el día 1 y hasta el día 5 se llevó a cabo la administración de la dosis de INDO, el día 5 se dejó en ayuno a los animales y finalmente el día 6 fueron sacrificados.

Finalmente, para evaluar el efecto del GMP, solo o combinado con LGG, en el daño gastroentérico por AINEs se trabajó con los siguientes grupos experimentales (**protocolo C**), cada uno formado por ratas Wistar macho de 150-200 g de peso corporal:

- ❖ CONTROL (n=14): se administró 1 ml de agua potable estéril y 4 h después 1ml de Na₂CO₃ al 5 % vía oral.
- ❖ INDO (n=14): se administró 1 ml de agua potable estéril y 4 h después 6 mg/Kg de INDO en Na₂CO₃ al 5 % vía oral.
- ❖ INDO+GMP (n=18): se administró 500 mg/Kg/día de GMP y 4 h después 6 mg/Kg de INDO en Na₂CO₃ al 5 % vía oral.
- ❖ INDO+GMP/LGG (n=18): se administró 500 mg/Kg/día de GMP y 1x10⁹ células/rata/día y 4 h después 6 mg/Kg de INDO en Na₂CO₃ al 5 %, todo mediante vía oral.

A partir del día 1 del ensayo, por vía esofágica y hasta el día 7 (día previo al sacrificio de los animales), la INDO se administró a las dosis indicadas anteriormente para cada grupo en Na₂CO₃ al 5% (Kamil *et al.*, 2007; Yoda *et al.*, 2010; Abimosleh *et al.*, 2013). Las soluciones de INDO se prepararon justo antes del uso y se administraron a razón de un volumen de 1 ml/200 g de peso corporal (Singh *et al.*, 2016). El GMP de origen bovino (LACPRODAN® CGMP-10, Arla Foods Amba, Viby, Dinamarca) se administró a los animales vía esofágica en dosis de 500 mg/Kg/día en agua (Muñoz *et al.*, 2017) desde 7 días antes de iniciar el desarrollo del modelo (día -7) y hasta el día 7 del protocolo. El LGG se administró una vez por día, de manera conjunta con el GMP, con una concentración final de 1 x 10⁹ células/ml. Los animales recibieron el tratamiento de GMP y LGG 4 horas previas a la administración de la INDO. El grupo CONTROL fue administrado a los mismos tiempos con el volumen correspondiente del vehículo (agua o Na₂CO₃ al 5%). Tras la última dosis de indometacina en el día 7, los animales se mantuvieron en ayuno durante 12 h, pero con libre acceso a agua (Singh *et al.*, 2016) y el día 8 se sacrificaron por una sobredosis de anestesia (éter etílico) (figura 12). Diariamente y hasta el día 8, se registró la supervivencia de animales de cada grupo.

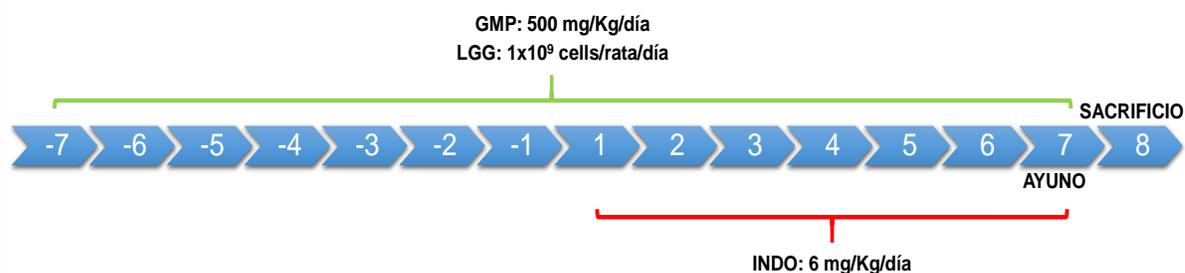


Figura 12. Esquema del protocolo de daño gastroentérico por AINEs y de los tratamientos. Desde el día 1 y hasta el día 7 se llevó a cabo la administración de la dosis de INDO, el día 7 se dejó en ayuno a los animales y finalmente el día 8 fueron sacrificados. Los tratamientos se aplicaron desde 7 días antes de iniciar con la administración de INDO y durante todo el protocolo de inducción de daño.

11. 3 CULTIVO Y ALMACENAMIENTO DEL LGG

El LGG (ATCC 53103), se cultivó de forma previa durante 24 h a 37°C en medio Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco, Becton Dickinson, E.U.A) previamente esterilizado. Para su crío preservación, se prepararon alícuotas de 6.92x10⁹ células/ml en 355 µl de glicerol al 60% y se almacenaron a -80°C. Para evaluar su cinética de crecimiento, se inoculó un matraz con 25 ml de medio MRS (Difco, Becton Dickinson, E.U.A) que se mantuvo a 37°C en un incubador BENCHTOP SHAKING 222DS (Labnet International,

Inc., USA) y se determinó su biomasa durante las primeras 3 h cada 30 min, después cada hora hasta las 8 h, así como también a las 12, 24, 36 y 48 h mediante el registro de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (considerando que OD_{600} de 1.0 es igual a una concentración de 8×10^8 células/ml) en el espectrofotómetro SmartSpec™Plus (Bio-Rad, E.U.A) (figura 13).

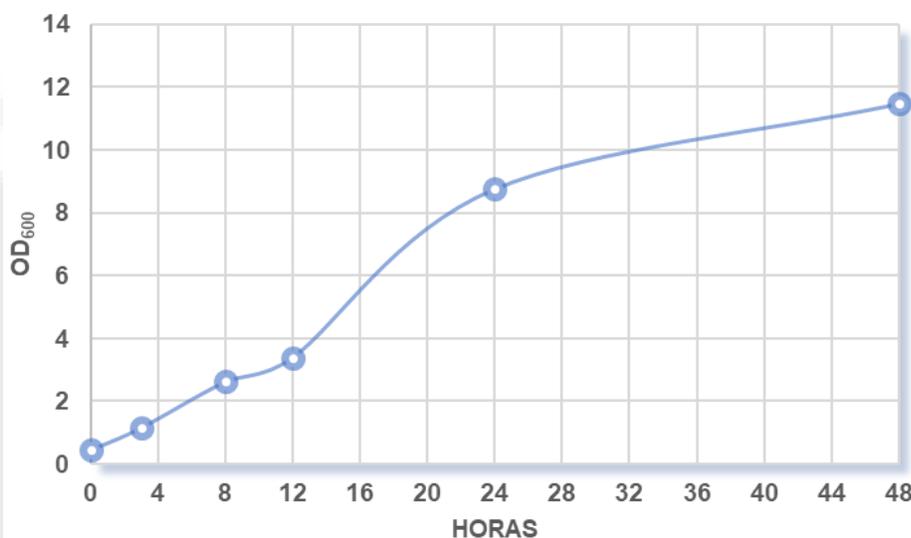


Figura 13. Cinética de crecimiento del LGG. Se midió la biomasa del LGG en un lapso de 48 h, esto con la finalidad de determinar cuánto tiempo debía realizarse su incubación para alcanzar una concentración de 1×10^9 células/ml.

11. 4 REGISTRO DE PESO CORPORAL

Los animales fueron distribuidos de forma aleatoria (de 2 a 3 animales por jaula) y marcados apropiadamente antes de dar inicio con el modelo de daño. Todas las mañanas, durante la duración del protocolo se pesó a cada animal. Para ello se utilizó una balanza analítica (EK 1200 g, AND, Reino Unido). Posteriormente, para calcular el porcentaje de ganancia de peso de los animales, se emplearon los pesos del animal en el día 1 y en el día previo al sacrificio (día 5 protocolo B y día 7 protocolo C). No se consideró el peso de los animales el mismo día del sacrificio por el ayuno al que fueron sometidos (Abimosleh *et al.* 2013; Singh *et al.*, 2016).

11. 5 REGISTRO DE INGESTA DE ALIMENTO Y DE AGUA

Cada día, durante la duración del protocolo, se colocó en cada jaula la misma cantidad de alimento y se midió la ingesta de alimento sustrayendo el peso del alimento no ingerido por los animales. Se calculó la ingesta de alimento como g/rata/día. En cuanto a los líquidos, se colocó diariamente en cada jaula un mismo volumen de agua y la ingesta de líquido se midió al día siguiente sustrayéndole el volumen de agua no ingerida por los animales. Se calculó la ingesta de agua como ml/rata/día (Abimosleh *et al.*, 2013; Sing *et al.*, 2016).

11. 6 MARCADORES BIOQUÍMICOS

Un día antes de iniciar el protocolo de daño por AINEs (día -1) y en el momento del sacrificio, a los animales se les tomó, bajo anestesia con éter etílico, una muestra de sangre de 1 ml a través de la vena caudal y sangrado por la arteria aorta abdominal, respectivamente. Un volumen de 200 µl de sangre fue utilizado para cuantificar el valor de hemoglobina (Hg), hematocrito (Hct), el volumen corpuscular medio (MCV), la Hg corpuscular media (MCH) y la concentración de Hg corpuscular media (MCHC) utilizando el analizador hematológico automático Mythic 18 (Orphée Diamond, USA). De una muestra de 800 µl de sangre, se separó el suero (para obtener unos 400 µl) mediante centrifugación 5223 xg durante 6 min, y se utilizó para medir proteína total, albúmina, y actividad alaninoaminotrasferasa (ALT), utilizando el equipo de química seca Vitros 5600 (Arquimed, Chile). Con los resultados que se obtuvieron para cada parámetro en el día -1 del protocolo, se estableció un rango inferior y superior en el cual podría ubicarse la normalidad de los datos obtenidos, para ello se utilizó la media de los resultados y se les aplicó ± 1 desviación estándar (SD). Posteriormente, se determinó el porcentaje de cambio de cada marcador analizado en cada animal al día 8, que corresponde al día del sacrificio, con respecto a la medición basal del día -1 (Singh *et al.*, 2016).

11. 7 REGISTRO DEL PESO DE ÓRGANOS

El octavo día del protocolo C y tras el sacrificio de los animales se extrajo de cada uno el hígado, bazo, estómago, intestino delgado e intestino grueso con la finalidad de

reportar el peso relativo del órgano/peso del animal (Abimosleh *et al.* 2013; Singh *et al.*, 2016). Para ello se utilizó una balanza analítica (EK 1200 g, AND, Reino Unido).

11. 8 EVALUACIÓN DEL DAÑO GASTROINTESTINAL

Tras el sacrificio de los animales, se procedió a abrir su abdomen inmediatamente con la finalidad de extraer tanto el estómago como el intestino delgado. Se midió la longitud del intestino delgado, del esfínter pilórico a la válvula ileocecal. El estómago se abrió a lo largo de su curvatura mayor, luego se lavó con PBS (0.01 M, pH=7.4). El intestino delgado se abrió longitudinalmente a lo largo del borde anti-mesentérico y se enjuagó también con PBS frío. En el protocolo B, tomando como punto de partida la válvula ileocecal se diseccionaron los primeros 10 cm, sin embargo, en el protocolo C fueron 12 cm; esto con la finalidad de cuantificar parámetros bioquímicos en el tejido y evaluar el grado de inflamación de la mucosa intestinal. Posteriormente, para obtener una mejor observación de las lesiones, en ambos protocolos se fijo el resto del tejido (yeyuno y duodeno) en formalina neutra por 24 h, se lavó con PBS (0.01 M, pH=7.4) frío y se sumergió durante 30 min en etanol al 70% (Singh *et al.*, 2016). Se cuantificó la cantidad de úlceras en estómago e intestino por rata y el índice de lesión intestinal, el cual se calculó determinando el área del intestino (mm²) y de todas las lesiones de cada rata, utilizando para ello un vernier digital (Milomex, Ltd, Bedfordshire, UK). El resultado se representó como porcentaje de intestino ulcerado por rata.

11. 9 DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS HIDROPERÓXIDOS (LOOH), MEDIANTE EL MÉTODO DE XILENOL – NARANJA, EN TEJIDO GÁSTRICO E INTESTINAL.

La peroxidación de lípidos de membrana se determinó evaluando la concentración de lípidos hidroxperoxidados (LOOH) totales en tejido estomacal e intestinal mediante el método de xilenol-naranja (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1996), con las modificaciones necesarias. Se obtuvo un segmento de aproximadamente 100 mg de la porción glandular del estómago. Se identificó la válvula ileocecal y se realizó un corte a los 10 cm, se midió 1 cm y se cortó el segmento de intestino. Los tejidos obtenidos se homogeneizaron en hielo utilizando 350 µl de Tris HCl (20mM, pH 7.4) con la ayuda de un homogenizador Ultra-Turrax T10 (Ika, China). Los homogeneizados de cada muestra se centrifugaron a

2000 xg durante 5 min a 4°C (centrifuga Hermle Z3883K 220.87, Alemania) y se recolectaron 300 µl de sobrenadante, que nuevamente fueron centrifugados a 2000 xg durante 5 min a 4°C (centrifuga Hermle Z3883K 220.87, Alemania). Posteriormente, se recuperaron 200 µl de cada muestra, y con la finalidad de precipitar las proteínas, se les agregó sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) al 5% en una relación 3:1 v/v. Las muestras se dejaron reposar durante 15 min en hielo para facilitar la precipitación de las proteínas y prevenir la formación de LOOH durante el proceso y finalmente se centrifugaron a 3000 xg durante 20 min a 4° C (centrifuga Hermle Z3883K 220.87, Alemania) (Weruaga *et al.*, 2002). Una vez que fueron procesadas las muestras, tal como se mencionó anteriormente, la reacción se realizó a partir de 45 µl de tejido homogeinizado más 55 µl de metanol al 90%. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, para después añadirles 900 µl del reactivo para la oxidación ferrosa en xilenol naranja versión 2 (FOX2), que se preparó a partir de dos soluciones: solución A (sulfato ferroso de amonio [(NH₄)₂Fe(SO₄)₂, 250 µM] y ácido sulfúrico [H₂SO₄, 25 mM]) y solución B (xilenol-naranja [100 µM] y butilhidroxitolueno [4 mM]) todo disuelto en metanol al 100% y nuevamente se dejó incubar durante 30 min. Las lecturas de las muestras se realizaron utilizando el espectrofotómetro SmartSpec Plus (Bio Rad, USA) a una longitud de onda de 560 nm. Para determinar la concentración de LOOH con la lectura de absorbancia para cada muestra, se realizó una curva patrón de t-Butilhidroperóxido (t-BuOOH) (figura 14). Se prepararon muestras de 100 µl de entre 0 a 16 nmoles en metanol al 90%. A cada muestra se agregaron 900 µl de solución FOX2 y se incubaron durante 30 min para posteriormente determinar la OD a 560 nm. Los resultados de cada muestra se presentaron como nmol de LOOH/mg de tejido.

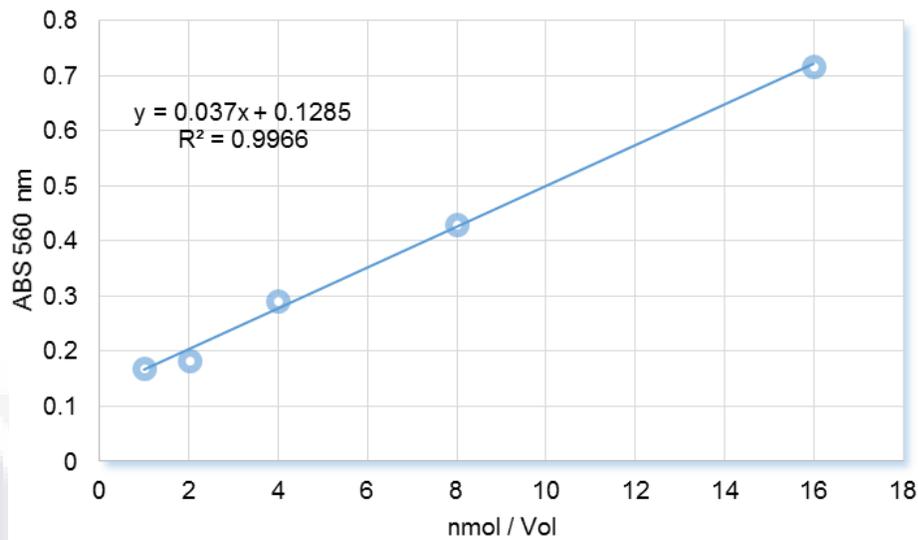


Figura 14. Curva patrón para la determinación de LOOH. Se prepararon 5 estándares con concentraciones de 1, 2, 4, 8 y 16 nm/vol (100 μ L) de t-BuOOH. La densidad óptica para cada estándar a 560 nm de longitud de onda se determinó luego de la reacción de óxido-reducción con el método xilenol-naranja con el reactivo FOX2. Para determinar los valores de LOOH en las muestras se empleó la ecuación de la recta obtenida ($Y = 0.037X + 0.1285$). Donde $Y = Abs_{560nm}$ y $X =$ concentración de LOOH (nmol/vol).

11. 10 DETERMINACIÓN DE MIELOPEROXIDASA (MPO) EN TEJIDO GÁSTRICO E INTESTINAL.

La actividad de la MPO en tejido se considera un índice cuantitativo de la inflamación en la mucosa por el infiltrado de neutrófilos y se cuantificó en muestras de estómago y yeyuno distal de acuerdo con el método descrito por Bradley y colaboradores (1982), con las modificaciones correspondientes. Se obtuvo un segmento de aproximadamente 100 mg de la porción glandular del estómago. Se identificó la válvula ileocecal y se realizó un corte a los 11 cm, se midió 1 cm y se cortó el segmento de intestino. El segmento obtenido de estómago y yeyuno se homogeneizó en 500 μ l de buffer de hexadeciltrimetil bromuro de amonio (HTAB) 0.5% preparado al 0.5% en buffer de fosfatos (50mM, pH 6.0), para después centrifugarlo a 510 xg en una centrífuga Hermle Z3883K durante 10 min a 4°C. Posteriormente, a una alícuota del sobrenadante (40 μ l) de cada muestra, se le añadió 200 μ l de una mezcla de reacción compuesta de dihidroclorhidrato de O-dianisidina (0.167 mg/ml) y peróxido de hidrógeno al 0.0003 % en buffer de fosfato (50 mM, pH 6.0). Los cambios en la absorbancia se midieron a una longitud de onda de 450 nm usando un lector de absorbancia de microplacas iMark (BioRad, Hercules, CA, USA). Una unidad (U) de MPO se definió como la degradación de

1 μmol de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por minuto a 25°C , de tal forma que los datos fueron expresados como Unidades de MPO (Hagiwara *et al.*, 2004; Kamil *et al.*, 2007; Yoda *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2014; Pozzoli *et al.*, 2006).

11. 11 ANÁLISIS POR RT-qPCR DE LA EXPRESIÓN DE GENES INFLAMATORIOS EN TEJIDO INTESTINAL.

Tras el sacrificio de los animales, se procedió a abrir su abdomen inmediatamente y se identificó la válvula ileocecal para realizar un corte a los 8 cm, se midió 1 cm y se cortó el segmento de intestino. Las muestras fueron embebidas en RNA later (Ambion, Austin, TX, USA) y almacenadas a -80°C hasta su uso. Posteriormente, la extracción y purificación de RNA se realizó mediante el kit GeneJET (Thermo Scientific, Wilmington, E. U. A) acorde con las instrucciones del proveedor. La cuantificación de RNA fue evaluada usando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y su pureza se estableció mediante la relación absorbancia a longitudes de onda 260/280. La síntesis de cDNA se realizó con el kit First Strand (Thermo Scientific, Wilmington, E. U. A) utilizando una transcriptasa reversa M-MuLV en el equipo 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se empleó el sistema Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) en el equipo StepOne (Applied Biosystems) con la siguiente programación: 3 min a 94°C ; 40 ciclos de $94^\circ\text{C}/30$ s, $60^\circ\text{C}/30$ s; con análisis de desnaturalización a $94^\circ\text{C}/15$ s, $60^\circ\text{C}/1$ min con lecturas cada 0.5°C de incremento y $95^\circ\text{C}/15$ s. Los oligonucleótidos que se utilizaron se enlistan en la tabla 4. Los datos se analizaron empleando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ utilizando la expresión de β -Actina como gen normalizador (Schmittgen & Livak, 2008).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión de genes inflamatorios			
Gen	Forward (Fw)	Reverse (Rv)	Número de acceso
iNOS2	GATGTGCTGCCTCTGGTCCT	ACTCCAATCTCGGTGCCCAT	NM_012611.3
IL-1β	AAATCTCACAGCAGCATCTC	ACTAGCAGGTCGTCATCATC	NM_031512.2
CXCL1	GCACCCAAACCGAAGTCATAG	TGTTGTCAGAAGCCAGCGTT	NM_030845.1
β-Act	GTCGTACCACTGGCATTGTG	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA	NM_031144.3

11. 12 TIPO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LA INFORMACIÓN OBTENIDA

Los datos se presentaron como la media \pm error estándar de la media (SEM). A los datos obtenidos se les aplicó un ANOVA con post-test de Bonferroni para comparar datos en estudios multicomparativos, utilizando el programa estadístico GraphPad Prism (versión 6.0). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$.



12. RESULTADOS

Se conoce de forma extensa que el uso de AINEs, particularmente su uso crónico, produce diversos efectos adversos, dentro de los cuales destacan de forma formidable complicaciones en el tracto GI, tales como úlceras, sangrado y perforación. Por lo tanto, se han desarrollado diversos modelos y ensayos, que tienen como finalidad evaluar las condiciones para generar y valorar el daño a nivel GI con el uso de AINEs, para posteriormente ensayar el uso de un péptido bioactivo, ya sea sólo o combinado con un probiótico, como tratamiento profiláctico en esta gastroenteropatía.

12. 1. CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO DE GASTROENTEROPATÍA POR LA ADMINISTRACIÓN DE AINES EN RATA WISTAR.

12. 1. 1 SUPERVIVENCIA DE LOS ANIMALES ADMINISTRADOS CON INDO

Se realizó un primer protocolo (**protocolo A**) para el cual se administraron diferentes dosis de INDO a los animales (4 mg/kg/día, 6 mg/kg/día, 8 mg/kg/día y 10 mg/kg/día), esto con la finalidad de evaluar su impacto en la mortandad de los animales y determinar la dosis más adecuada para inducir daño a nivel gastroentérico. Además, se estableció que el periodo durante el cual se administrarían las dosis dependería de la mortalidad que se presentara durante el transcurso del ensayo. En este sentido, el grupo con la dosis más alta (10 mg/kg/día) fue el que determinó el final del protocolo, ya que para el día 6 su porcentaje de mortalidad fue del 100% (0% de supervivencia); además es importante destacar que la supervivencia de este grupo se vio afectada a partir del día 3 del protocolo y fue cayendo aún más con el transcurso de los días. El grupo CONTROL al finalizar el ensayo (día 6) tuvo una supervivencia del 100%, así como también el grupo INDO 4. El grupo INDO 6 alcanzó una supervivencia del 90%, mientras que para el grupo INDO 8 esta fue del 80%, y para ambos grupos su porcentaje de supervivencia empezó a verse afectada al día 6 del protocolo (figura 15).

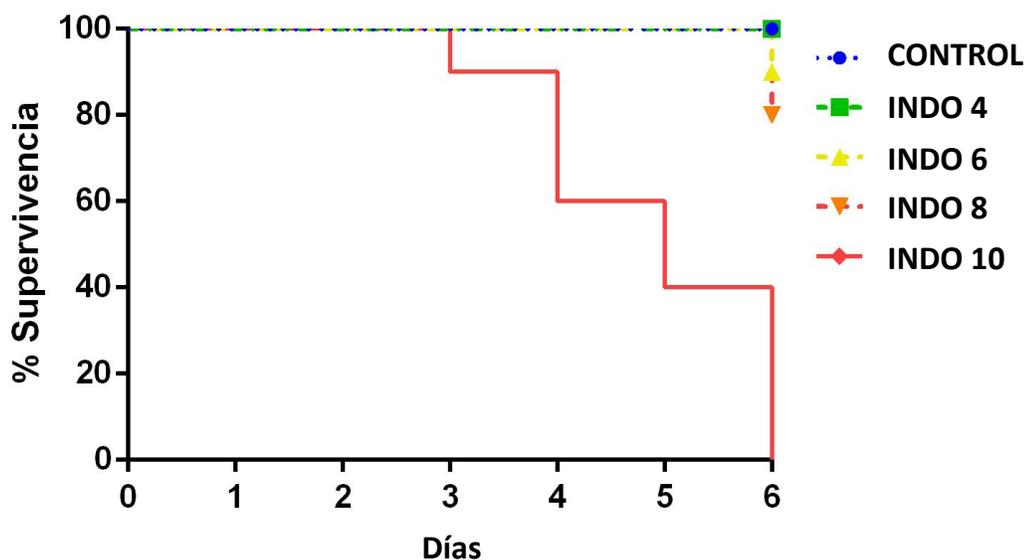


Figura 15. Supervivencia en un modelo de daño gastroentérico utilizando INDO. Se evaluó la supervivencia de los animales utilizando diferentes dosis de INDO (4mg/Kg/día, 6mg/kg/día, 8mg/kg/día, 10mg/kg/día). Además, se estableció que el final del protocolo tendría lugar cuando al menos uno de los grupos alcanzara una mortalidad del 100%. N Control= 9; N INDO 4= 10; N INDO 6= 10; N INDO 8= 10; N INDO 10= 10.

Aunque el porcentaje de supervivencia para el grupo INDO 6 e INDO 8 fue ligeramente diferente, es decir, se observó que el grupo INDO 6 tuvo una supervivencia del 90%, mientras en el grupo INDO 8 esta fue del 80%, es importante resaltar que en ambos grupos la muerte de los animales se presentó el día 6 del ensayo, motivo por el cual se decidió realizar el **protocolo B** en el cual se comparó para ambas dosis un mayor número de parámetros relacionados con daño GI. Todos estos parámetros en conjunto permitieron evaluar de forma más adecuada la gastroenteropatía inducida por el uso de este fármaco.

Entre los parámetros que se tomaron como referencia, nuevamente se incluyó el análisis de la supervivencia que tuvieron los animales, y ya que en el protocolo anterior esta disminuyó el día 6, se estableció que para la inducción de daño se administraría INDO durante 5 días y el día 6 se llevaría a cabo el sacrificio de los animales. Una vez más se observó como la supervivencia de los animales empezó a verse afectada al día 6 del protocolo. El grupo CONTROL nuevamente finalizó con el 100% de supervivencia, mientras que INDO 6 e INDO 8 tuvieron una supervivencia del 87.5% (figura 16).

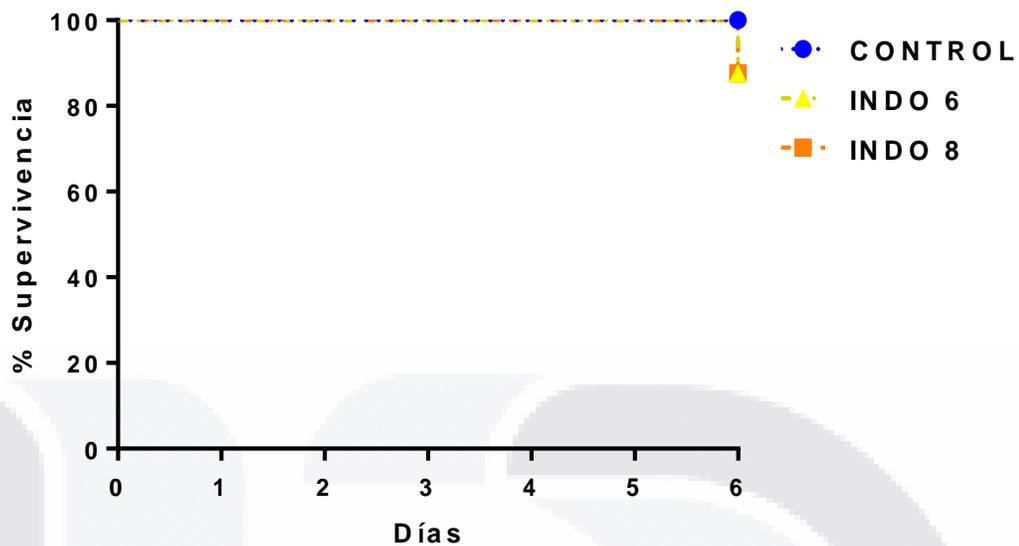


Figura 16. Supervivencia en un modelo de daño gastroentérico utilizando INDO. Se evaluó la supervivencia de los animales utilizando diferentes dosis de INDO (6mg/kg/día y 8mg/kg/día) durante 5 días y al sexto día se sacrificaron. N Control= 7; N INDO 6= 8; N INDO 8= 8.

12. 1. 2 EFECTO DE LA INDO SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO Y LÍQUIDOS

Con los resultados que se obtuvieron de la valoración de la ingesta media de alimento y líquidos para el día -1 del protocolo, se generó un rango normal esto con la finalidad de poder definir si al día 5 los valores de ambos parámetros estaban dentro o fuera de este rango. Se observó que el consumo de alimento de los animales en los tres grupos (CONTROL, INDO 6 e INDO 8) fue estadísticamente igual durante las 24 h previas a la administración de la primera dosis de indometacina (día -1). Sin embargo, como puede observarse en la figura 17, el consumo promedio de alimento que presentaron los animales administrados con indometacina tuvo una marcada disminución para el día 5 del protocolo, encontrándose por debajo del rango normal establecido. Esta caída en los valores de alimento consumido en el día 5 fue significativamente menor en un 64.18% en el grupo INDO 6 con respecto al CONTROL, y 57.43% más bajo en el grupo INDO 8 también con respecto a lo reportado para el grupo CONTROL.

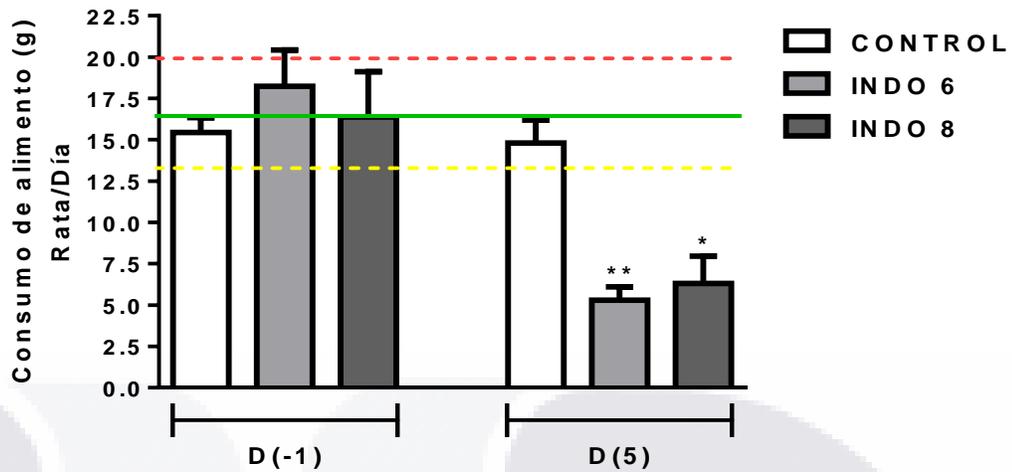


Figura 17. Efecto de la administración de INDO a los animales sobre la ingesta de alimento. Consumo de alimento de los animales en el día (D) -1 y 5, representado como consumo de alimento (g) de rata/día. *P<0.05 y **P<0.01 vs Control al D5. Línea verde= Promedio de los valores al D (-1) del protocolo; Línea amarilla= rango inferior, que se determinó restando a la media una desviación estándar; Línea roja: rango superior, que se determinó sumando a la media una desviación estándar. Control N= 7; INDO 6 N= 8; INDO 8 N= 8.

También se analizó la ingesta de líquidos de los animales, con la finalidad de evaluar si con la administración de INDO se generaba algún cambio. Con los datos del día -1 del protocolo se estableció el rango normal de ingesta de líquidos por rata. Para el día 5 el consumo promedio de líquidos para el grupo INDO 6 e INDO 8 se encontraba por debajo de este rango normal, sin embargo, no representó una diferencia significativa con respecto a lo encontrado para el grupo CONTROL en ese mismo día (figura 18).

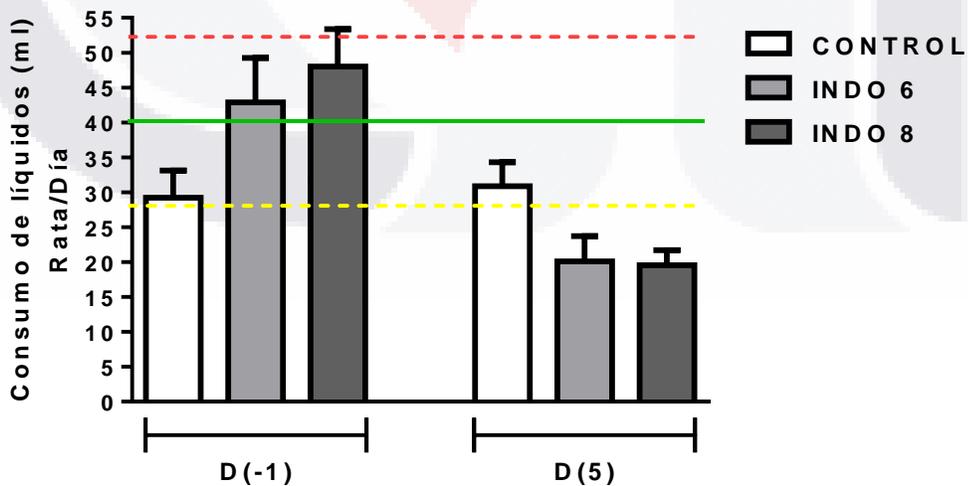


Figura 18. Efecto de la administración de INDO a los animales sobre la ingesta de líquidos. Consumo de líquidos de los animales en el día (D) -1 y 5, mismo que se representó como consumo de líquidos (ml) de rata/día. Línea verde= Promedio de los valores al D (-1) del protocolo; Línea amarilla= rango inferior, que se determinó restando a la media una desviación estándar; Línea roja: rango superior, que se determinó sumando a la media una desviación estándar. Control N= 7; INDO 6 N= 8; INDO 8 N= 8.

12. 1. 3 EFECTO DE LA INDO SOBRE EL PESO CORPORAL

De forma similar a los cambios que se observaron en el consumo de alimento de los animales, su ganancia de peso corporal también se vio afectada con la administración de indometacina. Mientras en el grupo CONTROL los animales tuvieron una ganancia de peso de 10.13% durante 5 días, en los grupos que recibieron indometacina (INDO 6 e INDO 8) se observó una ganancia de peso corporal menor. El grupo INDO 6 aumentó tan solo un 0.09% su peso corporal, lo cual significa que tuvo un incremento 99.02% significativamente menor con respecto a lo que se reportó para el grupo CONTROL; en cambio para el grupo INDO 8 se obtuvo una ganancia de peso corporal de 1.98%, lo cual es un 80.43% más bajo significativamente con respecto a lo que se obtuvo para el grupo CONTROL (figura 19).

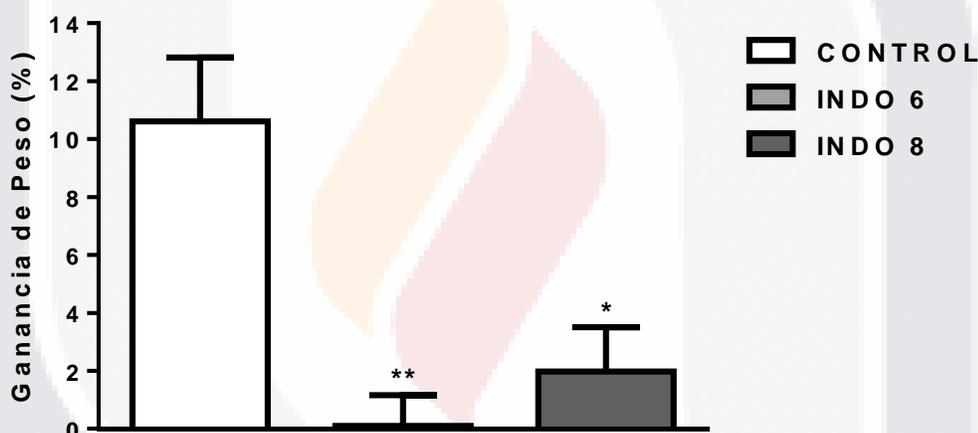


Figura 19. Efecto de la administración de INDO a los animales sobre la ganancia del peso corporal (%) de los animales. Se registró el peso de los animales al inicio (día 1) y final de la administración de INDO (día 5) y se calculó el % de ganancia de peso corporal. * P<0.01 vs Control; **P<0.005 vs Control. Control N= 7; INDO 6 N= 8; INDO 8 N= 8.

12. 1. 4 EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL DAÑO GASTROENTÉRICO

Como se muestra en la Figura 20, el estómago de los animales controles y de los animales administrados con indometacina mostró un aspecto semejante, caracterizado por un tono rosado brillante. Los animales no mostraron lesiones hemorrágicas gástricas macroscópicas detectables luego de la evaluación visual a las dosis utilizadas de INDO (6 mg/kg/día y 8 mg/kg/día). Sin embargo, con relación a la evaluación macroscópica del intestino, cabe mencionar que el intestino delgado de los animales del grupo CONTROL

mostró un aspecto normal, ya que su morfología no presentó ningún tipo de anomalía y tenía su característico tono rosado, así como también una textura turgente (figura 21 A). Sin embargo, la integridad del tejido intestinal empezó a verse comprometida como consecuencia de la administración de la indometacina, de tal forma que el grupo INDO 6 e INDO 8 desarrollaron tanto úlceras como perforaciones (figuras 21 B y C, respectivamente).



Figura 20. Análisis macroscópico de tejido gástrico de animales administrados o no con indometacina. Tras el sacrificio, se diseccionó el estómago de los animales y se evaluó macroscópicamente. A) Grupo CONTROL, sólo recibió el volumen correspondiente del vehículo (Na_2CO_3); B) Grupo INDO 6, recibió 6mg/kg/día de INDO, durante 5 días en Na_2CO_3 ; c) Grupo INDO 8, recibió 8mg/kg/día de INDO, durante 5 días en Na_2CO_3 . No se evidenciaron lesiones gástricas.



Figura 21. Análisis macroscópico de tejido intestinal de animales administrados o no con indometacina. Tras el sacrificio, se diseccionó el intestino delgado de los animales y se evaluó macroscópicamente. A) Grupo CONTROL, sólo recibió el volumen correspondiente del vehículo (Na_2CO_3); B) Grupo INDO 6, recibió 6mg/kg/día de INDO, durante 5 días en Na_2CO_3 ; c) Grupo INDO 8, recibió 8mg/kg/día de INDO, durante 5 días en Na_2CO_3 . Se evidenciaron diferentes lesiones intestinales como úlceras (\leftarrow) y perforaciones (\leftarrow).

Con la finalidad de evaluar cuantitativamente el daño generado por la indometacina a nivel intestinal, se contabilizó el número de úlceras por rata y se sumó el área de todas las zonas lesionadas por rata. En el grupo CONTROL, que únicamente recibió el vehículo de Na₂CO₃ al 5%, no se desarrolló ninguna úlcera, mientras que en el grupo INDO 6, se encontró un promedio de 6.45 úlceras por rata y de 5.04 úlceras por animal en el grupo INDO 8; por lo tanto, es evidente que ambos grupos desarrollaron un daño importante con la administración de la INDO (figura 22 A). En cuanto a los resultados que se obtuvieron para el área total de tejido ulcerado por rata, se encontró que el grupo INDO 6 tuvo un promedio de 113.12 mm²/rata y de 73.98 mm²/rata para el grupo INDO 8, lo cual corrobora que la administración de la INDO provoca un daño considerable en el intestino de los animales que recibieron ambas dosis de INDO (6 mg/kg/día y 8 mg/kg/día) (figura 22 B).

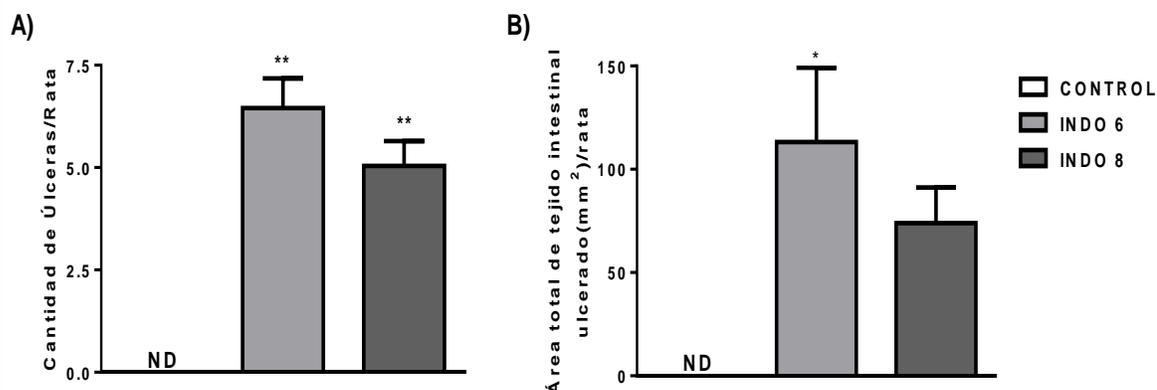


Figura 22. Cantidad de úlceras (A) y área total de tejido intestinal ulcerado/rata (B) por la administración de la INDO. Tras el sacrificio, se diseccionó el intestino delgado de los animales y se evaluó macroscópicamente. ND = No detectado. *P<0.05 vs Control; **P<0.05 vs Control. Control N= 7; INDO 6 N= 7; INDO 8 N= 7.

Es importante mencionar que, aunque los intestinos de los animales del grupo INDO 8 presentaron una menor cantidad de úlceras y una menor superficie de área ulcerada que el que recibió la dosis de 6 mg, destacó por la presencia de una gran cantidad de perforaciones, mismas que hicieron difícil trabajar con la muestra por la fragilidad del tejido.

12. 1. 5 EFECTO DE LA INDO SOBRE LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

La hemorragia es una de las complicaciones más frecuentes y a la vez más graves que se producen por el uso de los AINEs (Fornai *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2017). Estas hemorragias, junto con la disfunción intestinal que ocasiona una mala absorción de Vit B12 y de algunos metales como el hierro, ocasionan anemia (Morris *et al.*, 1992; Davis & Wallace, 1997). Por lo tanto, se determinaron los valores de Hg y Hct sanguíneos de los animales que recibieron o no indometacina. Con los resultados que se obtuvieron para cada parámetro en el día -1 del protocolo, se estableció un rango inferior y superior, esto con la finalidad de establecer el rango normal de Hg y Hct en rata Wistar y poder definir si en el día 6 los valores de estos parámetros estaban dentro o fuera de este rango normal establecido. Posteriormente se determinó el porcentaje de cambio de Hg y Hct de cada animal con respecto a los valores obtenidos en el día -1. En la figura 23 A, se puede observar como para el día 6 los valores de Hg sanguínea en el grupo INDO 6 e INDO 8 ya se encuentran por debajo del rango normal. Al determinar cuál fue su porcentaje de cambio se encontró que los animales del grupo CONTROL tenían 9.25% menos Hg el día 6 respecto al día -1, pero estos valores en el D6 estaban dentro del rango normal para rata Wistar. Los animales del grupo INDO 6 presentaron 39.79% menos Hg entre el día final e inicial del estudio, siendo esta disminución en el % de cambio 4.30 veces ($P < 0.0001$) mayor que la del grupo CONTROL. El grupo INDO 8, también disminuyó significativamente 3.52 veces más los valores de Hg sanguínea con respecto al grupo CONTROL, ya que mostró 32.64% menos Hg al día 6 que al inicio (figura 23 B).

De forma similar a los cambios que se observaron para los valores de Hg, se encontró que las dosis de INDO (6mg/kg/día y 8mg/kg/día) también afectaron los valores de Hct en la sangre de los animales. Para el día 6, tanto el grupo INDO 6 como el grupo INDO 8 tuvieron niveles de Hct por debajo de los que se establecieron como rango normal (figura 23 C). Además, al evaluar el porcentaje de cambio se observó que el grupo INDO 6 presentó 39.16% menos Hct al día 6 que antes de iniciar el tratamiento, disminuyendo significativamente el % de cambio 4.33 veces más que el grupo CONTROL (9.04% menos Hct al día 6 respecto al día 1). El grupo INDO 8 tuvo una disminución 3.41 veces mayor en el % de cambio de Hct con respecto a los de los animales del grupo CONTROL (30.91% vs 9.04%, $P < 0.005$) (figura 23 D).

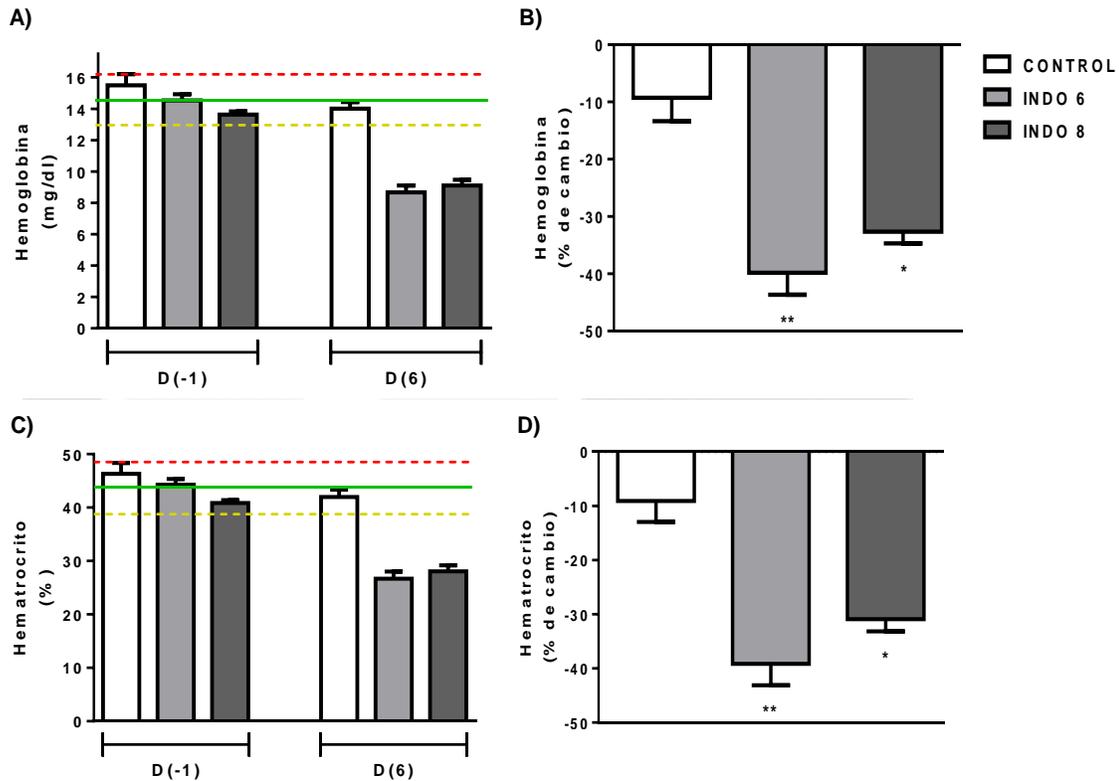


Figura 23. Efecto de la administración de INDO a los animales sobre parámetros hematológicos. El porcentaje de cambio hace referencia al valor de la variable en el día (D) del sacrificio (D 6) respecto a su valor al inicio (D -1) del protocolo. Línea verde= Promedio de los valores al D (-1) del protocolo; Línea amarilla= rango inferior, que se determinó restando a la media una desviación estándar; Línea roja: rango superior, que se determinó sumando a la media una desviación estándar. *P<0.005 vs Control; **P<0.0001 vs Control. Para D (6), N Control N= 7; N INDO 6 N= 7; N INDO 8 N= 7.

12. 1. 6 EFECTO DE LA INDO SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EVALUADOS EN SUERO

Además de las pruebas hematológicas anteriores, se realizaron también estudios bioquímicos en muestras de suero con la finalidad de evaluar los siguientes parámetros: proteínas totales, albúmina y ALT; Se evaluaron los niveles de las proteínas totales y albúmina, ya que se ha reportado por otros autores que en modelos de daño por AINEs se produce una hipoproteinemia e hipoalbuminemia a causa de las hemorragias intestinales que ocasiona esta gastroenteropatía (Fornai *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2017). Además, como causa de la inflamación hay un aumento en la permeabilidad vascular intestinal, que aunado a la alteración de la barrera de la mucosa genera una pérdida de

proteínas totales y albúmina, considerándose como una enteropatía con pérdida de proteína por vía gastrointestinal (Levitt & Levitt, 2017; Yu & Lin, 2014). Además, se analizaron los niveles de la ALT ya que permite establecer si existe algún daño a nivel hepático como consecuencia de la circulación enterohepática de la INDO.

Los resultados que se obtuvieron para las proteínas totales mostraron una disminución importante en los valores en los grupos INDO 6 e INDO 8 con respecto a los reportados para el grupo CONTROL, ya que al igual que en las gráficas de Hg y Hct, los valores obtenidos para el día 6 del protocolo estaban por debajo del rango establecido como normal (figura 24 A). El grupo INDO 6 mostró 13.61% y el grupo INDO 8 22.89% menos proteínas totales en suero el día 6 respecto al día -1, indicando que los animales tenían hipoproteinemia, con porcentajes de cambio a lo largo del tiempo significativamente diferentes a los del grupo CONTROL (9.65% mas proteínas totales en día 6 respecto al -1) (figura 24 B). En los resultados de los valores de albúmina, también se observaron cambios importantes en los grupos INDO 6 e INDO 8 con respecto a los que se encontraron en el grupo CONTROL, pues los valores obtenidos en los animales administrados con indometacina estaban por debajo del rango normal establecido (figura 24 C). Además, tal y como se muestra en la figura 24D, los animales del grupo INDO 6 e INDO 8 presentaron 27.34% y 30.71% menos albúmina, respectivamente, al final del estudio que al inicio, indicando hipoalbuminemia. Estos valores de % de cambio fueron significativamente diferentes a los del grupo CONTROL, ya que en este grupo se aumentó un 12.52% la albúmina en sangre.

Por otro lado, quedó descartado que la administración de la INDO ocasionara daño hepático, ya que al evaluar los resultados obtenidos para ALT se observó que los datos del día -1 y del día 6 estaban dentro del rango para los tres grupos de animales; de tal modo que, al analizar la razón de cambio, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos (figura 24 E y F).

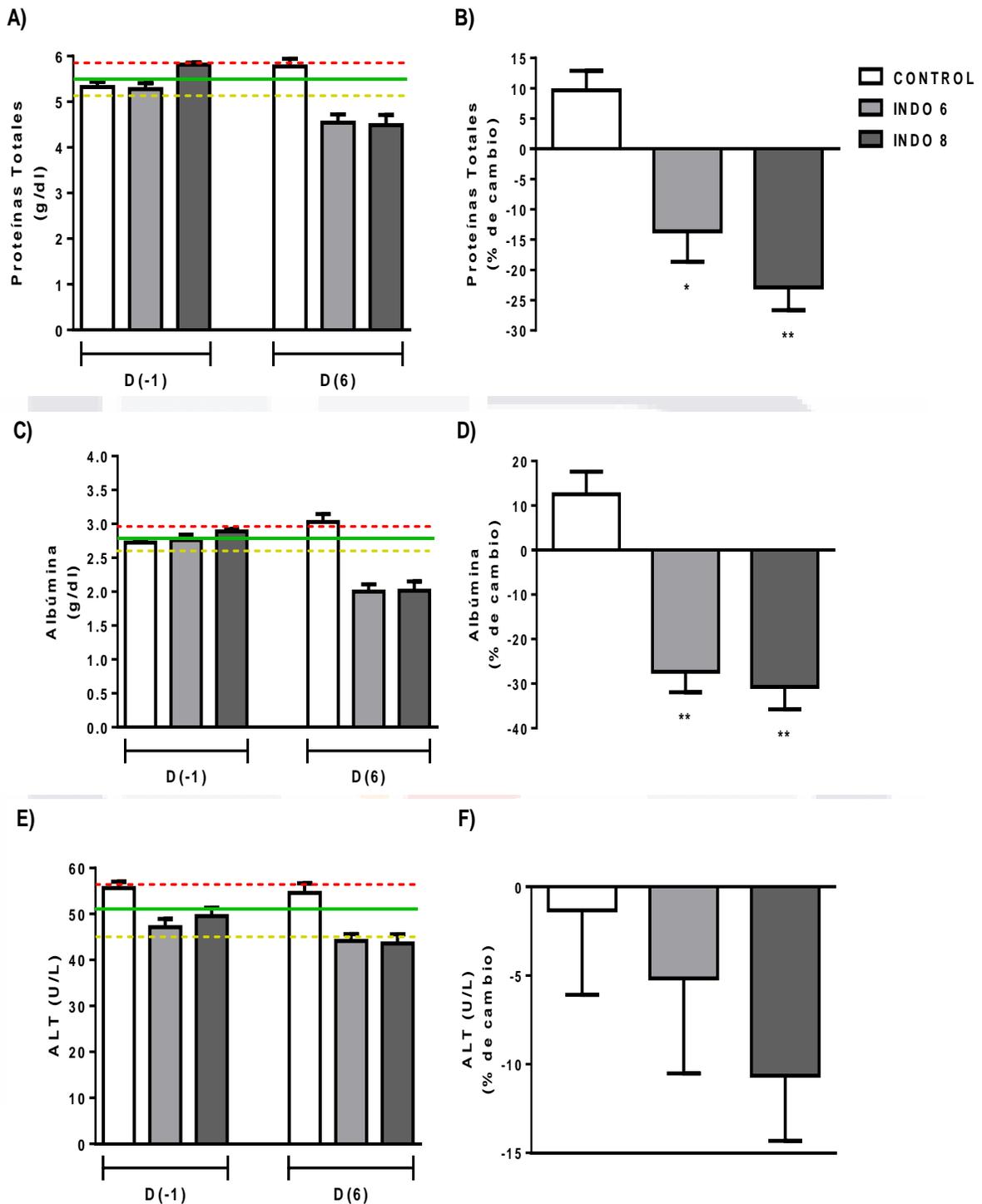


Figura 24. Efecto de la administración de INDO a los animales sobre parámetros en suero. El porcentaje de cambio hace referencia al valor de la variable en el día (D) del sacrificio (D 6) respecto a su valor al inicio (D -1) del protocolo. Línea verde = Promedio de los valores al D (-1) del protocolo; Línea amarilla= rango inferior, que se determinó restando a la media una desviación estándar; Línea roja: rango superior, que se determinó sumando a la media una desviación estándar. *P<0.01 vs Control; **P<0.0001 vs Control. Para D (6), Control N= 7; INDO 6 N= 7; INDO 8 N= 7.

12. 1. 7 DETERMINACIÓN DE LOOH EN MUESTRAS DE TEJIDO GÁSTRICO E INTESTINAL

Durante la respuesta inflamatoria, los neutrófilos son reclutados al tejido y una vez que son activados crean un ambiente citotóxico al liberar sustancias químicas nocivas como ROS, los cuales pueden reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana de la mucosa, lo que favorece la peroxidación de lípidos y daño a nivel tisular (Davies & Wallace, 1997; Nathan, 2002; Dauphine & Karsan, 2010). Por lo tanto, al evaluar la cantidad de LOOH se pretende determinar de manera indirecta la producción de ROS en la mucosa por el uso de INDO y el daño que estos han generado en membranas celulares. En el estómago, la administración de ambas dosis de INDO (6 mg/kg/día y 8 mg/kg/día) incrementó la cantidad de LOOH en el tejido gástrico de los animales, de tal modo que, se observó que el grupo INDO 6 incrementó significativamente 8.99 veces estos valores con respecto a los encontrados para el grupo CONTROL, y el grupo INDO 8 los aumentó de forma significativa 8.80 veces también tomando como referencia al grupo CONTROL (figura 25 A). Sin embargo, como ya se mencionó antes, estos datos no reflejan un daño macroscópico en el estómago, pues no se encontraron lesiones ulcerosas. En cuanto a los resultados que se obtuvieron para el intestino, se encontró que el grupo INDO 6 tuvo un incremento de 2.34 veces en la cantidad de LOOH, lo cual fue estadísticamente significativo comparado con el grupo CONTROL; sin embargo, al analizar los datos obtenidos para el grupo INDO 8 no se encontró que el incremento de la concentración de LOOH en el tejido (1.28 veces) fuera significativo con respecto a lo reportado para el grupo CONTROL, pero si fueron estadísticamente diferentes a los encontrados en el grupo INDO 6, ya que este grupo tuvo un incremento en la producción de LOOH en el tejido intestinal 1.83 veces mayor que los que se encontraron en el grupo INDO 8 (figura 25 B).

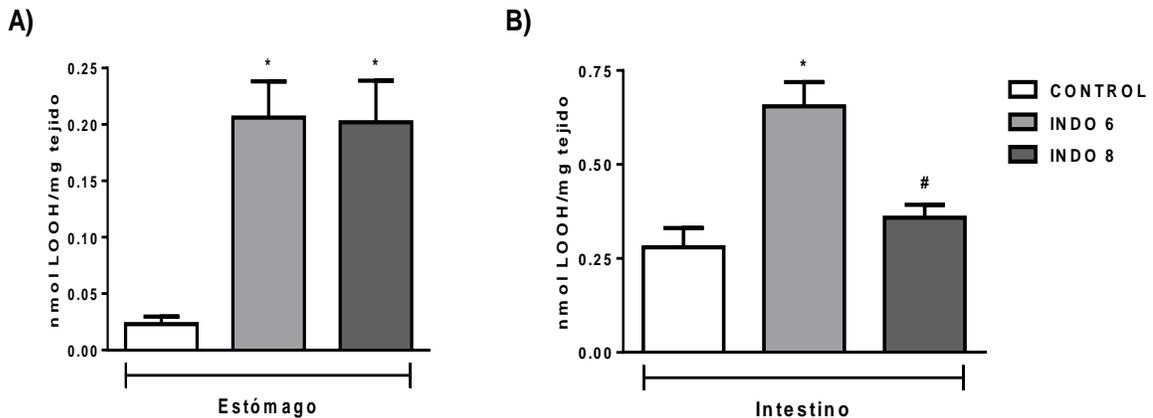


Figura 25. Determinación de LOOH en tejido estomacal (A) e intestinal (B). Se evaluó la cantidad de LOOH en un grupo de animales que sirvió como control y en otros grupos que recibieron dosis diferentes de INDO (6mg/kg/día y 8mg/kg/día) durante 5 días. *P<0.005 vs Control; #P<0.01 vs INDO 6. Control N= 7; INDO 6 N= 7; INDO 8 N= 7.

12. 2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GMP, SOLO O COMBINADO CON PROBIOTICOS (LGG), SOBRE EL DAÑO GASTROENTÉRICO INDUCIDO POR AINES EN RATA WISTAR.

Una vez concluido el protocolo B, los resultados indicaron que la administración de indometacina con ambas dosis (6 mg/kg/día y 8 mg/kg/día), durante un periodo de 5 días, inducía en los animales mayor daño a nivel entérico, que gástrico. La supervivencia en ambos grupos fue de 87.5%, sin embargo, se observó que con la dosis de 6 mg/kg/día los animales desarrollaron un mayor número de úlceras, mientras que con la dosis de 8 mg/kg/día el daño se caracterizó por la presencia de perforaciones. Por lo cual, se realizó un protocolo C con la finalidad de evaluar el efecto del GMP, solo o combinado con LGG como probiótico, sobre el daño GI inducido por AINEs, en el cual tomando en consideración los resultados del protocolo B se optó por utilizar la dosis de 6 mg/kg/día de indometacina para la inducción del modelo de daño. El GMP se administró en dosis de 500 mg/Kg/día desde 7 días antes de iniciar el desarrollo del modelo (día -7) y hasta el día 7 del protocolo. El LGG se administró una vez por día, de manera conjunta con el GMP, con una concentración final de 1×10^9 células/ml. Los animales recibieron el tratamiento de GMP y LGG 4 horas previas a la administración de la indometacina y se decidió que la inducción de daño tendría una duración de 7 días, en lugar de 6, para observar si era posible inducir daño a nivel gástrico. En cuanto a los parámetros que se evaluaron, se incluyeron los mismos del protocolo B, sin embargo, se agregó también el análisis de la

enzima MPO, tanto en muestras de tejido intestinal como gástrico, la evaluación del peso de órganos y la expresión de genes inflamatorios en tejido intestinal.

12. 2. 1 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LOS ANIMALES

En el protocolo C una vez más se incluyó el análisis de la supervivencia que tuvieron los animales y se observaron cambios con respecto a lo reportado de forma previa para el protocolo A y B. En ambos protocolos, con la dosis de 6mg/Kg/día, la muerte de los animales se presentó de forma inicial el día 6 del ensayo, sin embargo, para este protocolo en el grupo INDO (que recibió 6mg/kg/día) la supervivencia de los animales empezó a verse afectada a partir del día 5, de modo que, para el día 7 del ensayo el grupo ya contaba con una mortalidad del 21.42% (78.58% de supervivencia). El grupo CONTROL nuevamente tuvo una supervivencia del 100%. En cuanto al grupo INDO + GMP e INDO + GMP/LGG también se observó una supervivencia del 100% al finalizar con el ensayo, por lo tanto, se deduce que los pretratamientos con GMP o GMP/LGG están protegiendo a los grupos, incluso a pesar de recibir también la INDO, ya que su supervivencia se vio menos afectada que en el grupo que recibió únicamente INDO (figura 26).

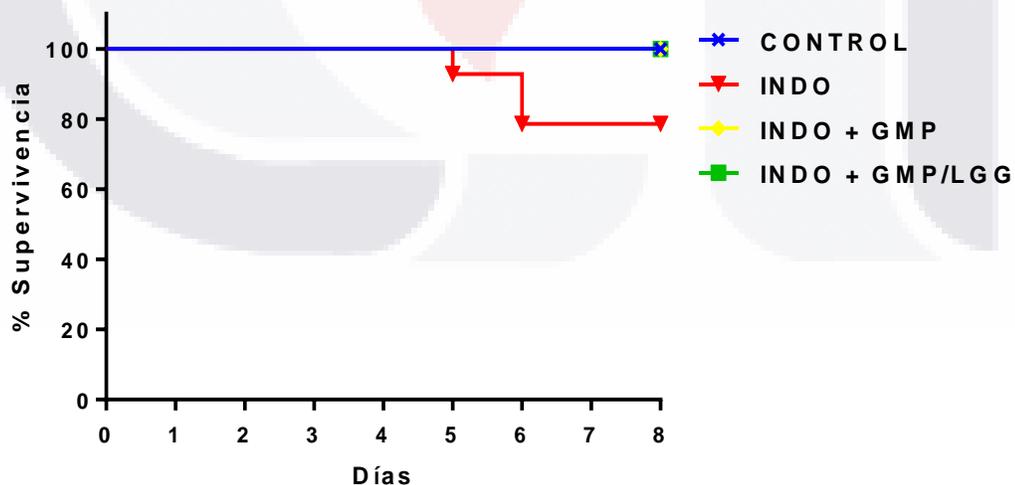


Figura 26. Efecto del GMP, solo o combinado con LGG, en la supervivencia de animales con daño GI por la administración de indometacina. Se evaluó la supervivencia de los animales utilizando como AINES INDO a una dosis de 6 mg/kg/día. El GMP y el LGG se administraron desde 7 días antes de iniciar el desarrollo del modelo (día -7) y hasta el día 7 del protocolo de inducción de daño y al octavo día los animales fueron sacrificados. CONTROL N= 14; INDO N= 10; INDO + GMP N= 18; INDO + GMP/LGG N= 18.

12. 2. 2 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO.

La ingesta de alimento que se observó en los cuatro grupos (CONTROL, INDO, INDO + GMP e INDO + GMP/LGG) fue estadísticamente igual durante las 24 h previas a recibir la primera dosis de indometacina (día -1). Sin embargo, tal como puede observarse en la figura 27, para el día 7 del protocolo el grupo inducido con indometacina tuvo una disminución significativa del 36.68% en su consumo promedio de alimento, esto con respecto a lo reportado para el grupo CONTROL. En cuanto a los valores de alimento consumido en los grupos INDO + GMP e INDO + GMP/LGG se encontró que tuvieron una ingesta promedio igual al grupo CONTROL; de tal modo que también se observó como en ambos hubo un consumo estadísticamente mayor con respecto al grupo INDO, siendo de 54.96% y 60.52% respectivamente. Por otro lado, debido a que en el protocolo B no se observaron cambios estadísticamente significativos en la ingesta de líquidos, se omitió su análisis para este ensayo.

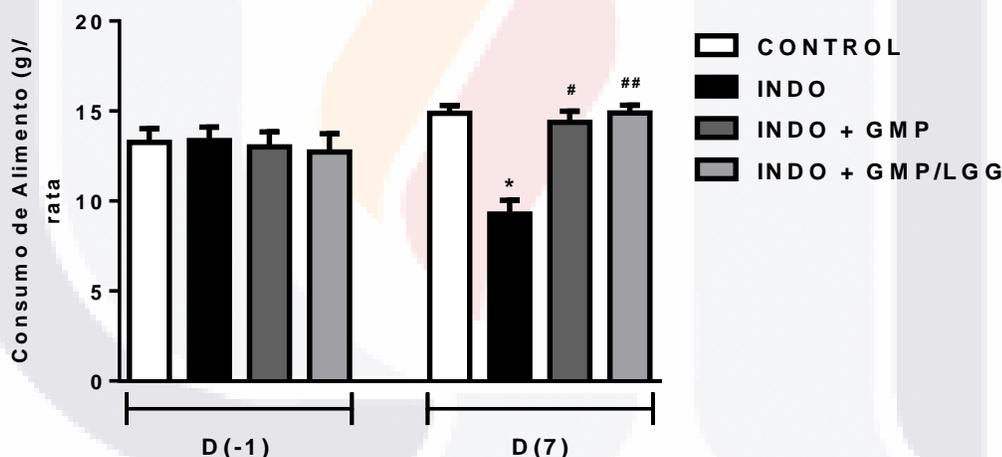


Figura 27. Consumo de alimento en ratas con gastroenteropatía por el uso de indometacina y efecto del tratamiento con GMP solo o combinado con LGG. Consumo de alimento de los animales en el día (D) - 1 y 7, representado como consumo de alimento (g) de rata/día. *P<0.01 vs CONTROL; #<P0.01, ##P<0.005 vs INDO. CONTROL N= 14; INDO N= 10; INDO + GMP N= 18; INDO + GMP/LGG N= 18.

12. 2. 3 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL PESO CORPORAL DE LOS ANIMALES.

En cuanto a la ganancia de peso corporal que tuvieron los animales, esta se vio afectada con la administración de indometacina, ya que mientras en el grupo CONTROL

los animales tuvieron una ganancia de peso de 12.11%, el grupo INDO tan solo incremento un 2.85%, lo cual significa que este incremento fue significativamente menor (4.24 veces) con respecto al grupo CONTROL. De forma similar a los cambios que se reportaron en el consumo de alimento de los animales, los grupos que recibieron el tratamiento profiláctico (INDO + GMP e INDO + GMP/LGG) no se vieron afectados en su ganancia de peso corporal al recibir las dosis de indometacina; ambos grupos mantuvieron de forma normal su ganancia de peso corporal y aunque da la impresión de que fue mayor a lo reportado para el grupo CONTROL, no se encontraron cambios significativos entre los tres grupos (CONTROL, INDO + GMP e INDO + GMP/LGG). El grupo INDO + GMP incrementó su peso corporal un 15.97%, lo cual significa que tuvo un aumento de peso 5.60 veces significativamente mayor con respecto a lo reportado para el grupo INDO; en cambio para el grupo INDO + GMP/LGG el incremento del 16.64% fue estadísticamente mayor 5.83 veces con relación al obtenido en el grupo INDO (figura 28).

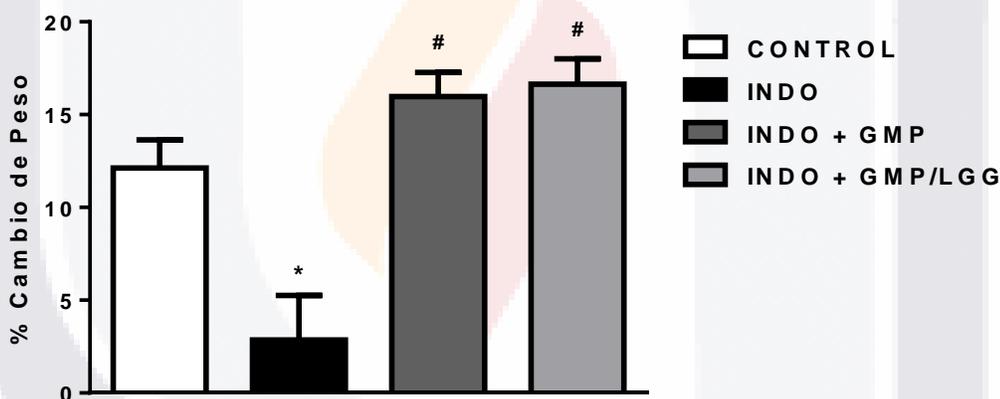


Figura 28. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con LGG, sobre la ganancia del peso corporal (%) de los animales administrados con indometacina. Se registró el peso de los animales al inicio (día 1) y final de la administración de INDO (día 7) y se calculó el % de ganancia de peso corporal. * P<0.01 vs Control; #P<0.0001 vs INDO. CONTROL N= 14; INDO N= 10; INDO + GMP N= 18; INDO + GMP/LGG N= 18.

Es importante destacar que la inducción de daño con el fármaco no provocó una disminución en el peso de los animales, sino más bien, ocasionó que el grupo INDO tuviera un estancamiento en su ganancia de peso corporal, mientras los otros tres grupos (CONTROL, INDO + GMP e INDO + GMP/LGG) mantuvieron su desarrollo de forma normal (figura 29).

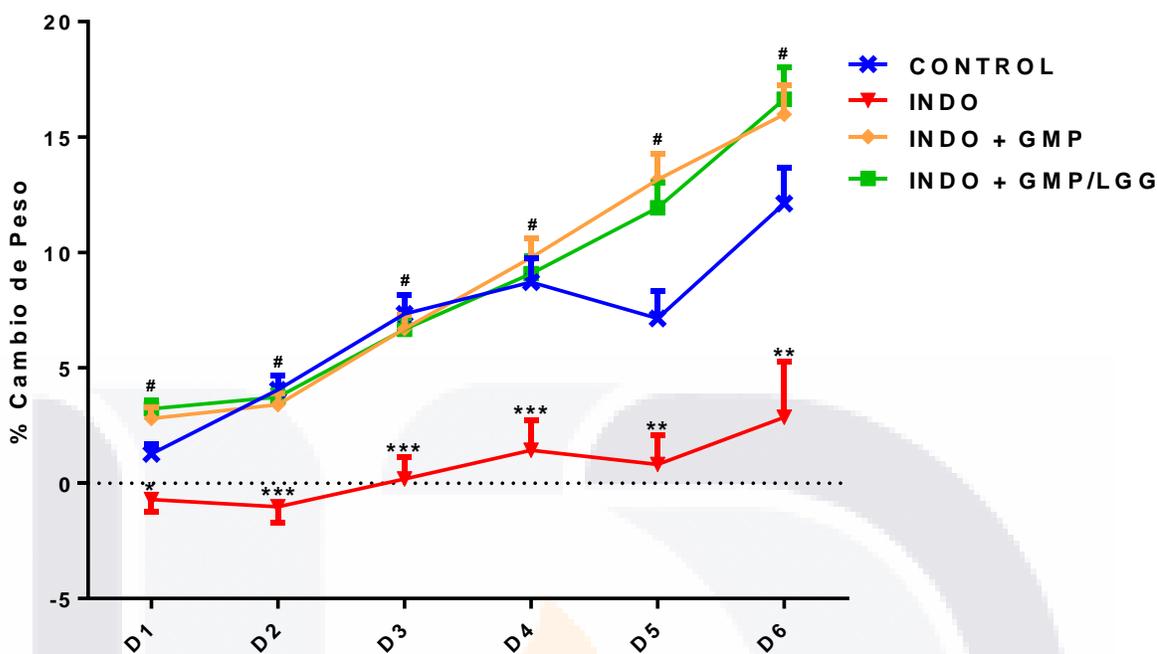


Figura 29. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con LGG, sobre la ganancia de peso corporal (%) de los animales administrados con indometacina. Se registró el peso de los animales durante la inducción del daño con indometacina cada día (D1-D6) y se calculó el porcentaje de ganancia de peso corporal diario. *P<0.01, **P<0.01, ***P<0.0001 vs Control; #P<0.0001 INDO + GMP e INDO + GMP/LGG vs INDO. CONTROL N= 14; INDO N= 10; INDO + GMP N= 18; INDO + GMP/LGG N= 18.

12. 2. 4 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS LESIONES EN TEJIDO INTESTINAL DE RATAS ADMINISTRADAS CON INDOMETACINA.

La dosificación de indometacina en los grupos INDO, INDO + GMP e INDO + GMP/LGG no ocasionó lesiones gástricas detectables luego de la evaluación visual. En cuanto a la evaluación macroscópica del intestino, cabe mencionar que el intestino delgado de los animales del grupo CONTROL mostró un aspecto normal, ya que su morfología no presentó ningún tipo de anomalía y tenía su característico tono rosado, así como también una textura turgente (figura 30 A). Sin embargo, la integridad del tejido intestinal empezó a verse comprometida en el grupo INDO, de modo que la inducción con el fármaco ocasionó eritema y úlceras (figuras 30 B). Los grupos tratados de forma profiláctica con GMP y GMP/LGG, desarrollaron menor daño que el grupo INDO, de modo que el tejido intestinal de los animales que pertenecían al grupo INDO + GMP se asemejaba en gran medida a lo reportado para el grupo CONTROL, pues no había anomalías visibles en su estructura, su color era rosado y también tenía una textura turgente (figura 30 C); en la morfología intestinal del grupo INDO + GMP/LGG el daño

también fue evidentemente menor, incluso aunque se observó presencia de eritema (figura 30 D).

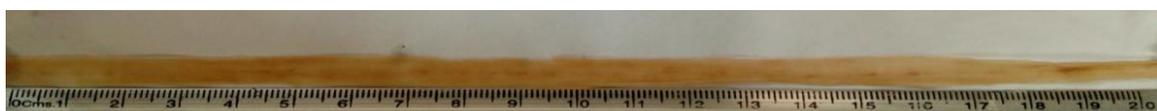
A) CONTROL



B) INDO



C) INDO + GMP



D) INDO + GMP/LGG



Figura 30. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre el daño macroscópico intestinal causado por la administración de la indometacina. Tras el sacrificio, se diseccionó el intestino delgado de los animales y se evaluó macroscópicamente. A) Grupo CONTROL, recibió 1 ml de agua potable estéril y 4 h después 1ml de Na_2CO_3 al 5 % vía oral; B) Grupo INDO, recibió 1 ml de agua potable estéril y 4 h después 6 mg/Kg de indometacina en Na_2CO_3 al 5 % vía oral; C) Grupo INDO + GMP, recibió 500 mg/Kg/día de GMP y 4 h después 6 mg/Kg de indometacina en Na_2CO_3 al 5 % vía oral; D) Grupo INDO + GMP/LGG, recibió 500 mg/Kg/día de GMP y 1×10^9 células/rata/día y 4 h después 6 mg/Kg de INDO en Na_2CO_3 al 5 %, todo mediante vía oral. Se evidenciaron diferentes lesiones intestinales como eritema (\leftarrow) y úlceras (\leftarrow).

Posteriormente, para evaluar cuantitativamente el daño generado por la indometacina a nivel intestinal, se determinó el área de las úlceras por área de intestino. En el grupo CONTROL, que únicamente recibió el vehículo (Na_2CO_3 al 5%) no se detectó daño, mientras que en el grupo INDO, el daño fue 4.38 veces mayor con respecto al que se encontró en los animales del grupo CONTROL. El grupo INDO + GMP no desarrolló daño macroscópicamente visible, y aunque en el grupo INDO + GMP/LGG se encontró un poco de eritema y algunas úlceras, el daño fue significativamente menor a lo que se encontró en el grupo INDO. Por lo tanto, se corroboró una vez más que la administración de la indometacina provoca un daño considerable en las ratas que recibieron dosis del fármaco, sin embargo, aquellos animales que fueron tratados de forma profiláctica con GMP y GMP/LGG mantuvieron íntegra la morfología de su tejido intestinal (figura 31).

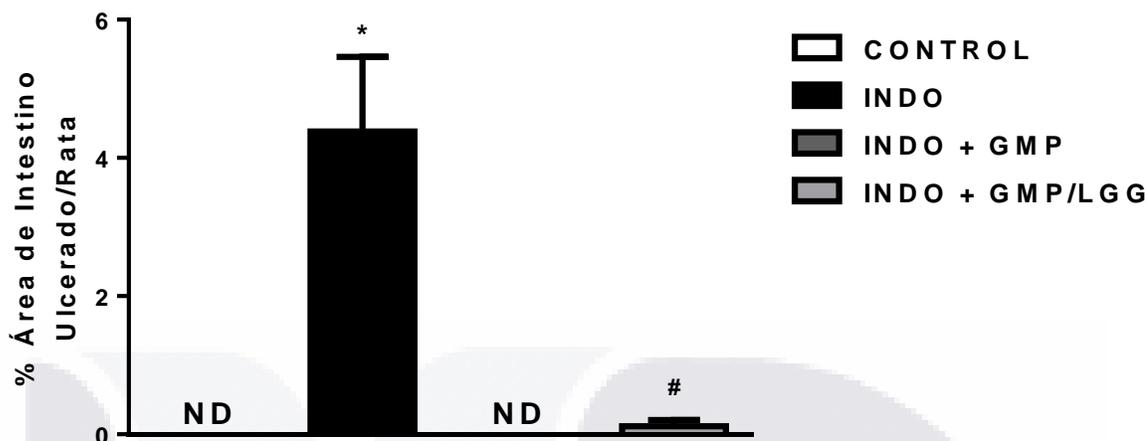


Figura 31. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre el área de intestino ulcerado en ratas administras con indometacina. Tras el sacrificio, se diseccionó el intestino delgado de los animales y se midió el área de tejido ulcerado. ND= No detectado. *P<0.0001 vs CONTROL; #P<0.0001 vs INDO. CONTROL N= 14; INDO N= 10; INDO + GMP N= 18; INDO + GMP/LGG N= 18.

12. 2. 5 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL PESO DE ÓRGANOS EN RATAS ADMINISTRADAS CON INDOMETACINA.

Durante la respuesta inflamatoria se produce una acumulación de líquido y plasma en el tejido afectado, de modo que el incremento de peso de los órganos con frecuencia indica un daño o anomalía anatómica. Por lo tanto, se midió el peso del bazo, hígado, estómago, intestino delgado e intestino grueso para evaluar si la administración de la indometacina ocasiona cambios en su peso. Estos órganos fueron seleccionados porque ya se ha reportado de manera previa que el fármaco al ser un AINEs suele ocasionar efectos adversos principalmente a nivel GI, así como también, un incremento en el peso de órganos viscerales y GI (Abimosleh *et al.*, 2013). Los resultados mostraron que no hubo cambios estadísticamente significativos en el peso del bazo e hígado (datos no mostrados); sin embargo, el peso del estómago en el grupo INDO incrementó un 8.49%, sin llegar a ser significativo con respecto al CONTROL. En cuanto a los resultados observados para el grupo INDO + GMP, se observó que disminuyó significativamente 16.86% con respecto a los datos que se tuvieron para el grupo INDO; mientras tanto, el grupo INDO + GMP/LGG mostró una tendencia por disminuir su peso, respecto al peso del estómago en los animales del grupo INDO, pero el cambio no llegó a ser significativo (figura 32).

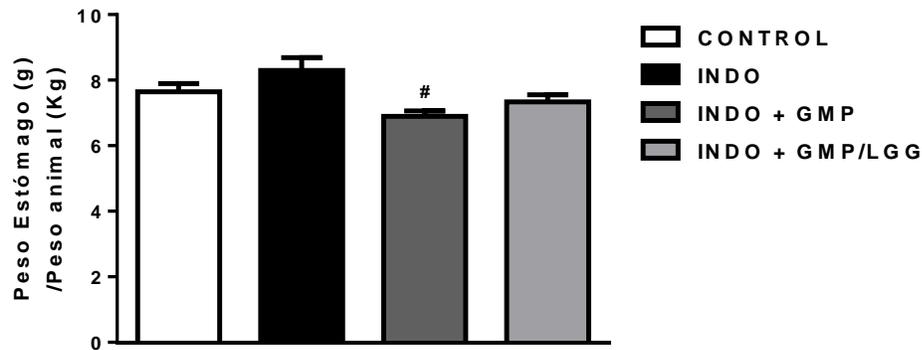


Figura 32. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre el peso del estómago en ratas administras con indometacina. Los resultados se reportaron como peso del estómago/peso del animal. [#]P<0.01 vs INDO. CONTROL N= 14; INDO N= 10; INDO + GMP N= 18; INDO + GMP/LGG N= 18.

Con relación al intestino, se observó que la indometacina modificó el peso del intestino delgado con respecto a los resultados encontrados para el grupo CONTROL. En cuanto a los animales que recibieron indometacina pero que de forma previa también recibieron un tratamiento profiláctico (GMP y GMP/LGG), no se encontró un incremento en el peso del intestino delgado, por el contrario, el peso de ambos fue significativamente menor a lo que se observó en el grupo INDO y semejantes a los del grupo CONTROL. El peso del intestino delgado de los animales del grupo INDO tuvo un incremento significativo del 42.92% respecto al grupo CONTROL, sin embargo, los valores encontrados en el grupo INDO + GMP e INDO + GMP/LGG fueron 25.84% y 36.02% menores, respectivamente, alcanzando valores semejantes a los del grupo CONTROL (figura 33). Además, se encontró que las dosis de indometacina no provocaron ningún tipo de cambio sobre la longitud del intestino delgado (resultados no mostrados)

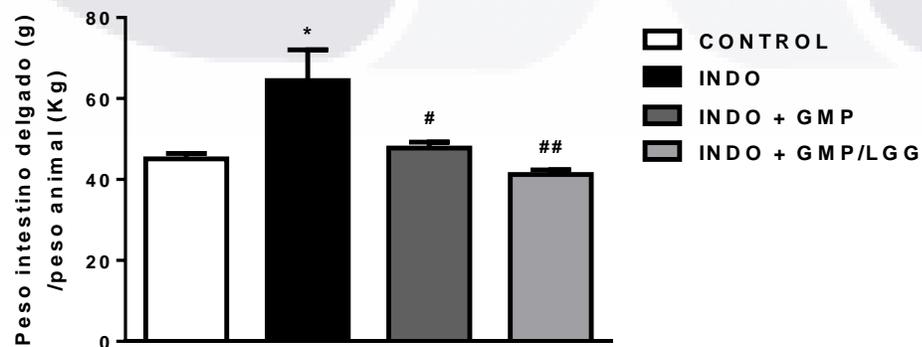


Figura 33. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre el peso del intestino delgado en ratas administras con indometacina. Los resultados se reportaron como peso del intestino/peso del animal. ^{*}P<0.005 vs CONTROL; [#]P<0.005; ^{##}P<0.0001 vs INDO. CONTROL N= 14; INDO N= 10; INDO + GMP N= 18; INDO + GMP/LGG N= 18.

De forma similar a los cambios que se reportaron en el peso del intestino delgado de los animales, se encontró un aumento significativamente importante del 59.62% en el peso del intestino grueso en el grupo INDO con respecto al CONTROL. Igualmente, el peso del intestino grueso de los grupo INDO + GMP e INDO + GMP/LGG fue 27.46% y 39.08% significativamente menor, respectivamente, a los del grupo INDO y semejante a los del grupo CONTROL (figura 34).

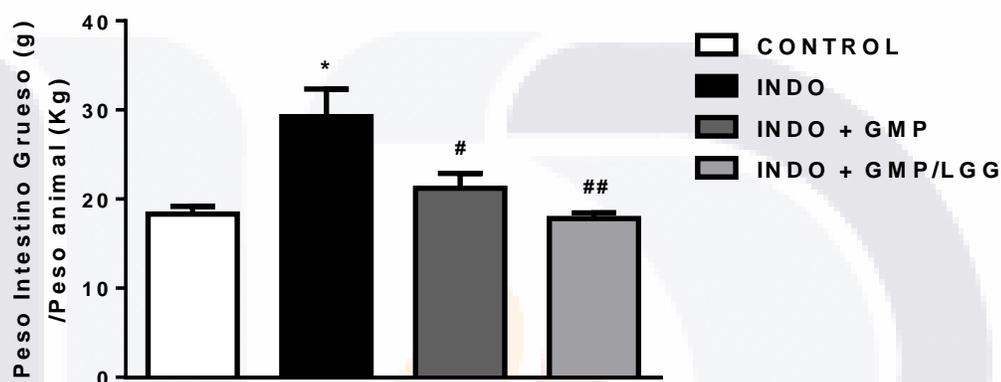


Figura 34. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre el peso del estómago en ratas administras con indometacina. Los resultados se reportaron como del intestino/peso del animal. *P<0.0001 vs CONTROL; #P<0.01, ##P<0.0001 vs INDO. CONTROL N= 14; INDO N= 10; INDO + GMP N= 18; INDO + GMP/LGG N= 18.

12. 2. 6 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN RATAS ADMINISTRADAS CON INDOMETACINA.

En el protocolo B, se encontró que los animales tenían una disminución significativa en los valores de Hg y Hct cuando eran dosificados con indometacina durante un periodo de 5 días. Por lo tanto, se decidió volver a tomar en consideración ambos parámetros para evaluar si el tratamiento con GMP y GMP/LGG disminuían la hemorragia, que es una complicación de las más habituales por el uso de los AINEs (Singh *et al.*, 2017; Fornai *et al.*, 2013). Sin embargo, ya que la disminución en los niveles de ambos parámetros (Hg y Hct) podría vincularse con una disfunción en la mucosa intestinal que altera la absorción de hierro (anemia ferropénica) y vitamina B12 (anemia perniciosa) se llevó a cabo un análisis de los índices de Wintrobe (MCV, MCH y MCHC) ya que indican con precisión cuánto mide en promedio un eritrocito en volumen, peso y concentración de Hg (Torrens., 2015). Nuevamente, con los resultado obtenidos durante el día -1 se estableció un rango normal de Hg y Hct, así como también de MCV, MCH y

MCHC en las ratas Wistar; esto se logró utilizando la media de los valores obtenidos, y aplicando ± 1 desviación estándar para determinar el rango tanto inferior como superior de los valores, de modo que, al día 8 del protocolo se evaluaron los resultados obtenidos, así como también el porcentaje de cambio que tuvieron los animales para los valores de Hg, Hct, HCV, MCH y MCHC (figura 35 A y C; 36 A, C y E, respectivamente). En la figura 35 A, se puede observar como para el día 8 los valores de Hg sanguínea en el grupo INDO estuvieron por debajo del rango normal, mientras que en los grupos que recibieron los tratamientos, los valores se acercaron o incluso alcanzaron el rango normal. Así, al determinar su porcentaje de cambio se encontró que los animales del grupo INDO disminuyeron 39.35% sus valores de Hg, lo cual representó un cambio significativo con respecto al grupo CONTROL. El grupo INDO + GMP disminuyó tan solo 8.49%, mientras en el grupo INDO + GMP/LGG el porcentaje de cambio fue positivo, con 1.09% más Hg el día final respecto al inicial, siendo en ambos casos significativamente menor la disminución en los valores de Hg que la del grupo INDO. Es importante mencionar que los niveles de Hg de los animales del grupo INDO + GMP/LGG fueron significativamente mayores respecto a los del grupo INDO + GMP. De igual modo, se encontró que la dosis de indometacina (6 mg/Kg/día) también afectó los niveles de Hct en la sangre de los animales, ya que para el día 8, el grupo INDO tuvo 37.91% menos Hct en el día 8 respecto al día inicial, valores significativamente menores que los del grupo CONTROL. Por otro lado, nuevamente se observó que los grupos con tratamiento profiláctico (INDO + GMP e INDO + GMP/LGG) disminuyeron muy poco sus valores, ya que en el grupo INDO +GMP el porcentaje de cambio fue de 6.62% menos Hct al día 8 respecto al día 1, mientras en el grupo INDO +GMP/LGG fue de 1.35% más Hct al final que al inicio del protocolo, lo cual significa que los valores de ambos grupos fueron significativamente más altos que lo reportado en el grupo INDO. También para los valores de Hct se encontró que los resultados obtenidos para el grupo INDO + GMP/LGG fueron estadísticamente más altos que los encontrados para el grupo INDO + GMP (figura 35 D).

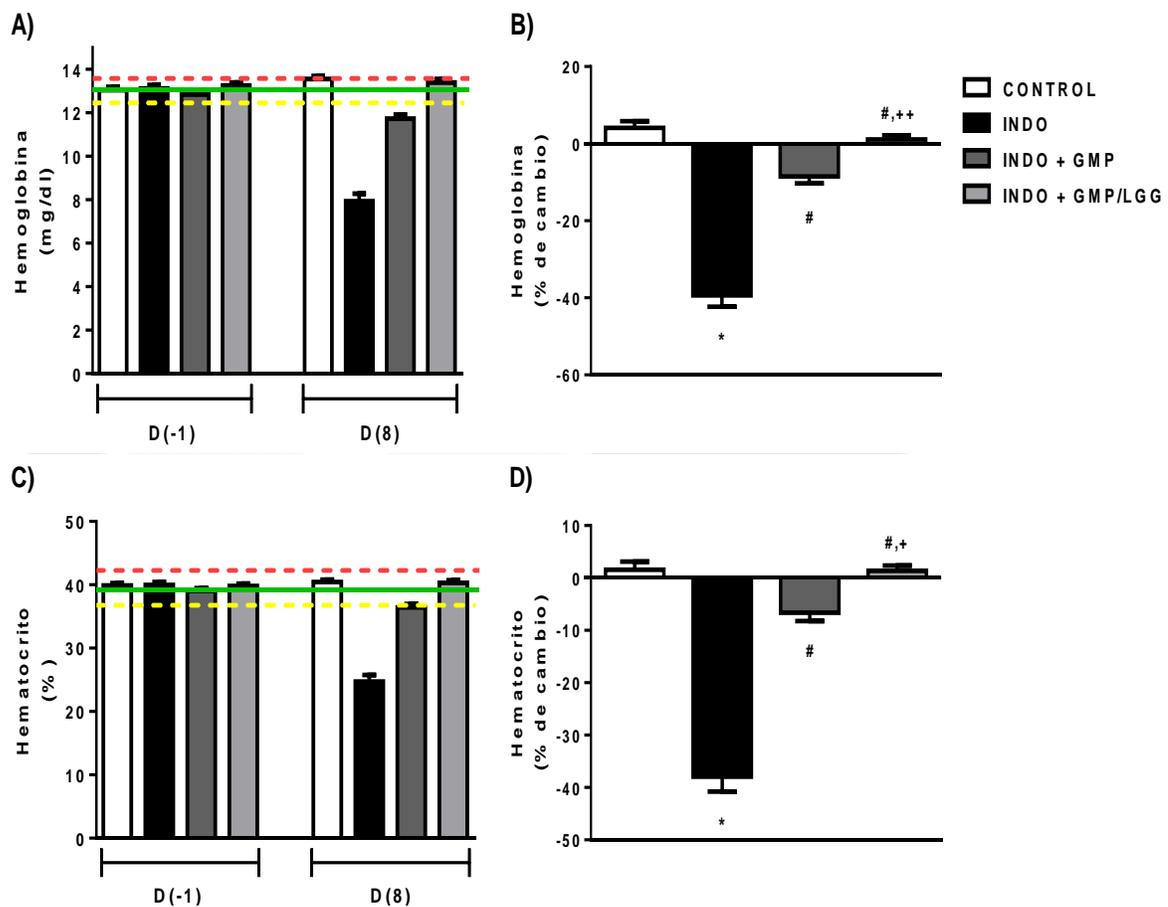


Figura 35. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre parámetros hematológicos evaluados en ratas administradas con indometacina. El porcentaje de cambio hace referencia al valor de la variable en el día del sacrificio (D8) respecto a su valor al inicio (D-1) del protocolo. Línea verde= Promedio de los valores al día -1 del protocolo; Línea amarilla= rango inferior, que se determinó restando a la media una desviación estándar; Línea roja: rango superior, que se determinó sumando a la media una desviación estándar. *P<0.0001 vs CONTROL; #P<0.0001 vs INDO; +P<0.01, ++P<0.005 vs INDO + GMP. Para D8, CONTROL N= 14; INDO N= 10; INDO + GMP N= 18; INDO + GMP/LGG N= 18.

En cuanto a los resultados obtenidos para el análisis de MCV, MCH y MCHC se encontró que los valores en los animales administrados con indometacina con o sin tratamiento se encontraron dentro del rango establecido como normal para nuestros animales de experimentación (tabla 5).

Tabla 5. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre los índices de Wintrobe				
MCV				
	CONTROL	INDO	INDO+GMP	INDO+GMP/LGG
D (-1)	65.5±0.63	63.5±0.53	63.9±0.58	63.8±0.55
D (8)	64.1±0.58	63.2±0.82	64.9±0.69	63.3±0.63
Rango Normal	61.8-66.6			
MCH				
	CONTROL	INDO	INDO+GMP	INDO+GMP/LGG
D (-1)	21.5±0.21	20.9±0.27	21±0.21	21.2±0.22
D (8)	21.5±0.20	20.2±0.28	20.9±0.22	21±0.26
Rango Normal	20.2-22.1			
MCHC				
	CONTROL	INDO	INDO+GMP	INDO+GMP/LGG
D (-1)	32.8±0.14	32.8±0.18	32.9±0.14	33.3±0.13
D (8)	33.5±0.07	32.1±0.20	32.2±0.13	33.2±0.16
Rango Normal	32.3-33.6			

12. 2. 7 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EVALUADOS EN SUERO DE RATAS ADMINISTRADAS CON INDOMETACINA.

Al igual que en el protocolo B, se realizaron los estudios bioquímicos para proteínas totales, albúmina y ALT, ya que se ha reportado que son buenos indicadores de la gastroenteropatía que ocasiona el uso de los AINEs (Fornai *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2017); y de igual modo, se estableció para todos los parámetros un rango de normalidad tomando como referencia los valores que se obtuvieron durante el día -1 del ensayo, utilizando la media de los valores obtenidos, y aplicando ± 1 desviación estándar para determinar el rango tanto inferior como superior de los valores, así como también el porcentaje de cambio que tuvieron los animales. Los resultados del día 8 del protocolo para las proteínas totales, mostraron una disminución significativa de los valores del grupo INDO, con respecto a los valores reportados para el grupo CONTROL. En el grupo INDO hubo 9.19% menos proteínas totales en el día 8 respecto al día inicial. En cambio, los grupos con el tratamiento de GMP y GMP/LGG tuvieron un porcentaje de cambio positivo con respecto al grupo INDO, de modo que se encontró 12.27% y 5.55% más proteínas totales en suero, respectivamente, el día final con relación al inicial (figura 36 A y B). Así mismo, la dosis de indometacina (6mg/Kg/día) también disminuyó los valores de

albúmina, ya que para el día 8 el grupo INDO tuvo 16.81% menos albúmina respecto al día inicial, valor que fue significativamente menor al reportado para el grupo CONTROL; por otro lado, se encontró que los grupos INDO + GMP e INDO + GMP/LGG incrementaron de manera significativa los valores de albúmina sérica, con relación a lo reportado para el grupo INDO (figura 36 C y D). Al disminuir los valores séricos de la albúmina y de las proteínas totales, tras la administración de la INDO, es posible asociar que la disminución de estos parámetros y la de los valores reportados para Hg y Hct es causada por las hemorragias intestinales que son tan características de la gastroenteropatía por el uso de AINEs. Además, se descarta que el fármaco ocasionara daño hepático, ya que al evaluar los resultados obtenidos para ALT se observó que los dato del día -1 y del día 8 estaban dentro del rango de normalidad, de modo que, al analizar la razón de cambio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los grupos (figura 36 E y F).

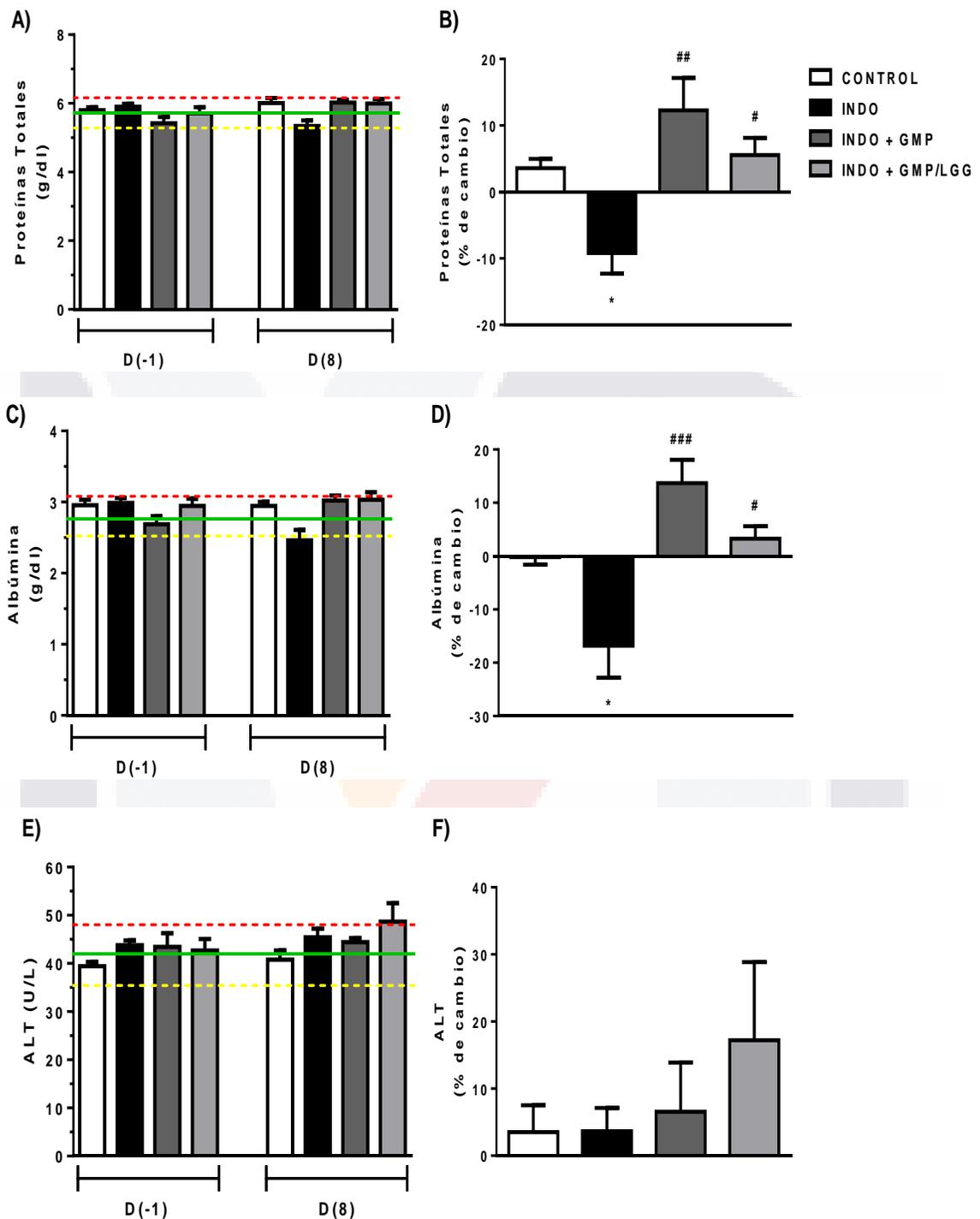


Figura 36. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre parámetros evaluados en suero de ratas administras con indometacina. El porcentaje de cambio hace referencia al valor de la variable en el día del sacrificio (D8) respecto a su valor al inicio (D-1) del protocolo. Línea verde= Promedio de los valores al día -1 del protocolo; Línea amarilla= rango inferior, que se determinó restando a la media una desviación estándar; Línea roja: rango superior, que se determinó sumando a la media una desviación estándar. *P<0.05 vs Control; #P<0.05, ###P<0.001, ####P<0.0001 vs INDO. Para D8, CONTROL N= 14; INDO N= 10; INDO + GMP N= 18; INDO + GMP/LGG N= 18.

12. 2. 8 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA DETERMINACIÓN DE MPO EN MUESTRAS DE TEJIDO GÁSTRICO E INTESTINAL DE RATAS ADMINISTRADAS CON INDOMETACINA.

En la enteropatía por AINEs se produce un incremento en la extravasación de neutrófilos; éstos una vez que son activados transmigran a través del endotelio en el tejido inflamado y por medio de un proceso que se conoce como degranulación crean un ambiente citotóxico liberando sustancias químicas nocivas, muchas de ellas almacenadas en los gránulos citoplasmáticos, de modo que, generan un potente estallido respiratorio en el que juega un papel muy importante la enzima MPO (Davies & Wallace, 1997; Headland, & Norling, 2015). Los neutrófilos contienen la enzima MPO en sus gránulos azurófilos, por lo que el análisis de la actividad MPO es indicativo de la cantidad de neutrófilos que se han infiltrado al tejido. En las pruebas realizadas al tejido gástrico para evaluar la presencia de MPO, no se encontraron cambios significativos entre los grupos (figura 37 A). En el tejido intestinal la actividad de la enzima MPO, fue evidentemente más alta en el grupo INDO con respecto al grupo CONTROL, ya que en el grupo que recibió indometacina tuvo un incremento significativo de 2.95 veces con respecto a los datos encontrados para los animales del grupo CONTROL. En cuanto a los animales que fueron tratados con GMP, se encontró que la actividad de la enzima disminuyó de forma significativa un 70.04% con respecto a lo que se observó para el grupo INDO, sin embargo, en el grupo INDO + GMP/LGG, no se encontró ningún cambio estadísticamente significativo con respecto a lo reportado para el grupo INDO (figura 37 B).

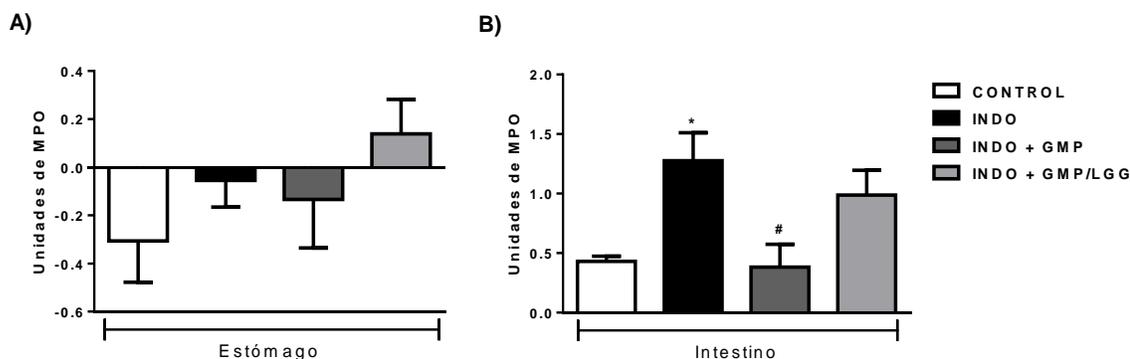


Figura 37. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre la actividad de la enzima MPO en tejido estomacal (A) e intestinal (B) de ratas administradas con indometacina. Se evaluó la actividad de la enzima MPO en un grupo de animales que recibieron un tratamiento profiláctico con la finalidad de evaluar de manera indirecta la presencia de neutrófilos. *P<0.05 vs CONTROL; #P<0.05 vs INDO. CONTROL N= 14; INDO N= 10; INDO + GMP N= 18; INDO + GMP/LGG N= 18.

12. 2. 9 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA DETERMINACIÓN DE LOOH EN MUESTRAS DE TEJIDO GÁSTRICO E INTESTINAL DE RATAS ADMINISTRADAS CON INDOMETACINA.

La determinación de LOOH mediante el método xilenol-naranja demostró ser bastante eficiente durante el protocolo B, por lo cual, se optó por utilizarla para evaluar si el tratamiento con GMP y GMP/LGG disminuía la producción de estas sustancias químicas. En el estómago, la administración de indometacina incrementó significativamente 1.51 veces la producción de LOOH en el tejido gástrico de los animales del grupo INDO con respecto al CONTROL, sin embargo, en los grupos que recibieron indometacina y de forma previa fueron tratadas con GMP y GMP/LGG hubo una disminución significativa en cuanto a la producción de LOOH, de modo que, el grupo INDO + GMP disminuyó 53.10%, mientras en el grupo INDO + GMP/LGG esta disminución fue del 60.23% respecto al grupo INDO (figura 38A). En cuanto a los resultados que se obtuvieron para el intestino, se encontró que el grupo INDO tuvo un incremento estadísticamente importante que fue de 2.76 veces con respecto a los animales del grupo CONTROL. Los animales del grupo INDO + GMP e INDO + GMP/LGG, tuvieron una cantidad significativamente menor de LOOH en el tejido intestinal que fue de un 51.96% y 58.87% menos, respectivamente (figura 38B).

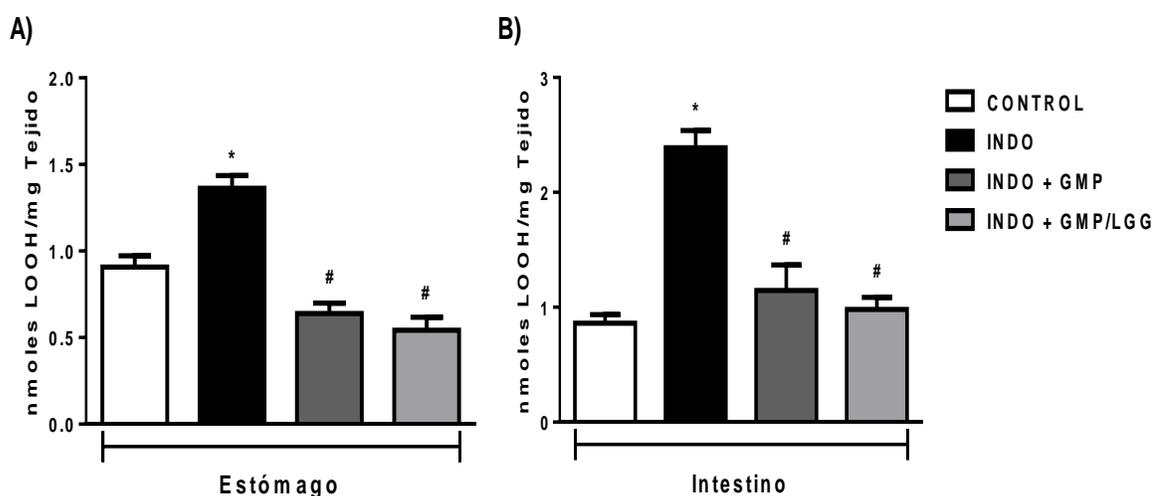


Figura 38. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre los niveles de LOOH en tejido estomacal (A) e intestinal (B) de ratas administradas con indometacina. Se evaluó la cantidad de LOOH en un grupo de animales que recibieron un tratamiento profiláctico con la finalidad de evaluar si tenía la capacidad de atenuar la producción de ROS en la gastroenteropatía por el uso de AINES. *P<0.005 vs CONTROL; #P<0.0001 vs INDO. CONTROL N= 14; INDO N= 10; INDO + GMP N= 18; INDO + GMP/LGG N= 18.

12. 2. 10 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES INFLAMATORIOS EN TEJIDO INTESTINAL DE RATAS ADMINISTRADAS CON INDOMETACINA.

Con la finalidad de evaluar el grado de inflamación que ocasiona el uso de la indometacina y si los tratamientos profilácticos (GMP y GMP/LGG) podían atenuar esta respuesta, se decidió evaluar la expresión de CXCL-1 (quimioattractante de neutrófilos) (Ley., 2008; Dembic., 2015; Sawant *et al.*, 2016), IL-1 β (citocina pro-inflamatoria) (López-Castejon & Brough, 2011; Dinarello., 2017) e iNOs (enzima involucrada en el estallido respiratorio) (Mollace., 2005; Zha *et al.*, 2010).

En el grupo INDO se observó un incremento estadísticamente significativo en la expresión de CXCL-1 de 6.37 veces respecto al grupo CONTROL; además al evaluar la expresión de IL-1 β e iNOS, se encontró que su expresión se encontraba aumentada de forma significativa (13.88 y 18.19 veces, respectivamente) en los animales que recibieron las dosis de indometacina con respecto a los niveles de expresión que se encontraron en los del grupo CONTROL. El tratamiento con GMP favoreció la disminución de la expresión de los mRNA de CXCL-1, IL-1 β e iNOS, encontrándose una disminución significativa del 43.91%, 75.46% y 80.37%, respectivamente, al comparar con el grupo INDO. Además, la reducción significativa de la expresión de estos genes proinflamatorios se mantuvo con la coadministración de GMP y LGG al lograr porcentajes de disminución de 63.24%, 81.46% y 89.58% respecto al grupo INDO, sin observar una mejora en el efecto con respecto al obtenido al tratar a los animales únicamente con GMP (figura 39).

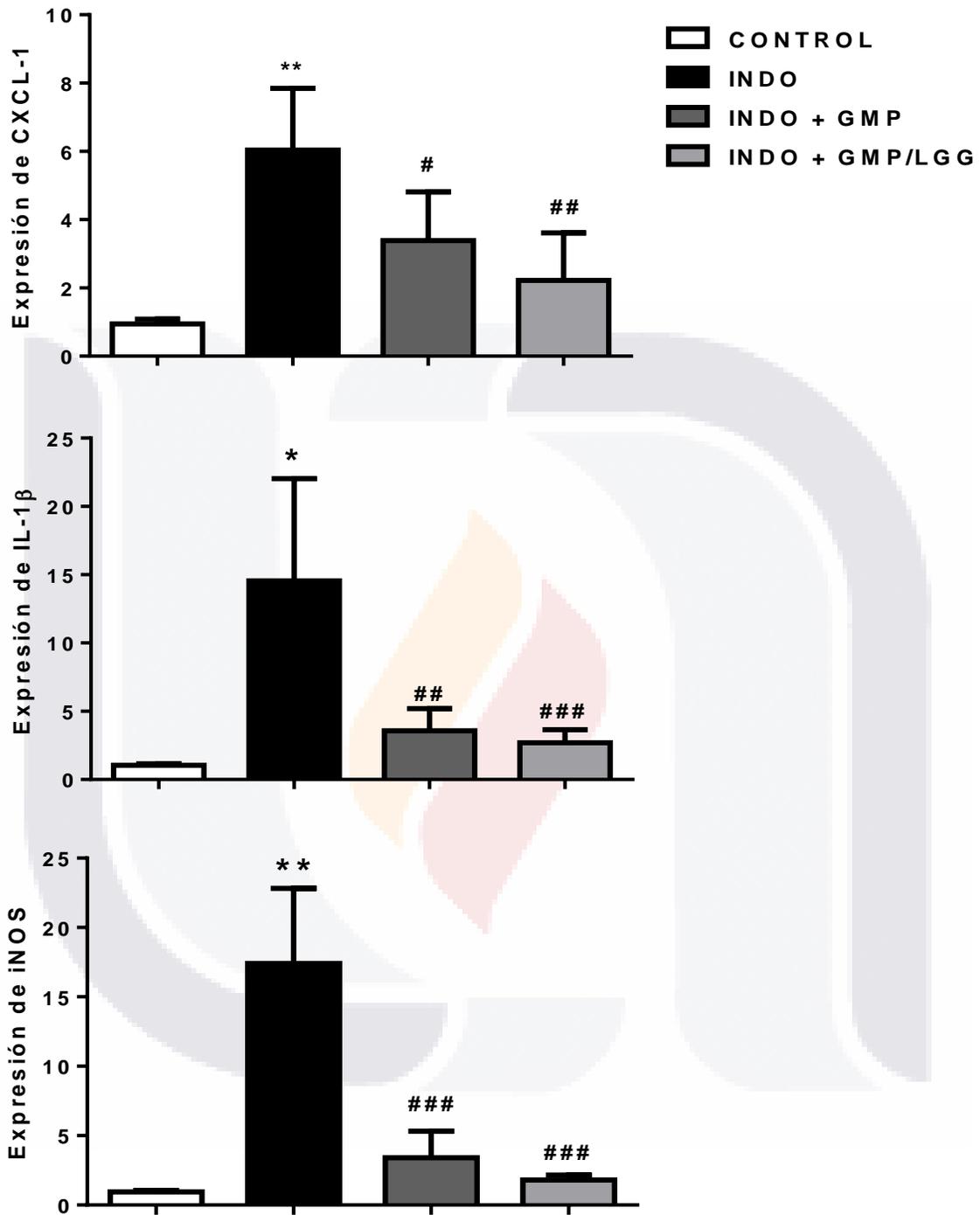


Figura 39. Efecto del tratamiento con GMP, solo o combinado con el LGG, sobre la expresión de genes inflamatorios en ratas administradas con indometacina. *P<0.001, **P<0.0001 vs CONTROL; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.0001 vs INDO. CONTROL N= 5; INDO N= 5; INDO + GMP N= 5; INDO + GMP/LGG N= 5.

13. DISCUSIÓN

La estructura anatómica de la mucosa GI está integrada por diversos componentes que la protegen ante su frecuente exposición a sustancias con un amplio rango de temperaturas, pH y osmolaridad, así como también a sustancias con acciones detergentes o citotóxicas y productos bacterianos capaces de inducir respuestas inflamatorias (Wallace, 2008). Sin embargo, es erróneo suponer que la barrera GI es totalmente impenetrable, ya que son diversos los agentes que pueden provocar un desequilibrio, de modo que la mucosa sea más susceptible a las lesiones; algunos a mencionar son fármacos anticancerígenos, compuestos bifosfonatos y AINEs, así como también compuestos que causen irritación al tejido (alcohol, radicales libres, etc.) (Wallace, 2001).

Más de 30 millones de personas en el mundo recurren al uso de AINEs cada día, ya que, por sus propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias se indican de forma amplia como una opción de tratamiento en condiciones reumáticas y musculoesqueléticas (artritis reumatoide y osteoartritis), desordenes cerebrovasculares y como analgésicos en el tratamiento del dolor de origen variable (Davies & Wallace, 1997; Kamil *et al.*, 2007; Sivalingam *et al.*, 2007; Abimosleh *et al.*, 2013).

Por las aplicaciones que tienen estos fármacos, el uso de los AINEs (particularmente su uso crónico) incrementa con la edad; se estima que entre un 10 a 40% de las personas mayores de 65 años hacen uso de estos fármacos (Conaghan, 2012). Además, se ha observado que a largo plazo del 15 al 40% de los usuarios desarrollan úlceras gastroduodenales; el 70% tiene inflamación intestinal y hasta un 30% desarrolla erosiones o úlceras intestinales (Massó *et al.*, 2010; Bjarnason *et al.*, 2018).

A pesar de las severas complicaciones que ocasiona el uso de estos fármacos, suspender su uso no es una opción viable, puesto que son muchos los pacientes para los que por el tipo de patología que han desarrollado, estos fármacos constituyen su única opción farmacológica debido a su amplia distribución y bajo costo. Con la finalidad de atenuar las complicaciones que ocasionan estos fármacos en la mucosa gástrica, las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pautas de tratamiento actuales recomiendan el uso de PPI como una estrategia de elección en pacientes con factores de riesgo de dolor y sangrado gástrico que reciban tratamiento con AINEs (Pozzoli *et al.*, 2007; Conaghan, 2012; Lué & Lanas, 2016). Sin embargo, de acuerdo con resultados reportados por investigaciones recientes el tratamiento concomitante de AINEs con PPI se asocia con un menor riesgo de sangrado gástrico, pero no parece ser efectivo para prevenir la enteropatía causada por los AINEs (Lué & Lanas, 2016). Existe incluso evidencia que sugiere que el tratamiento concomitante de AINEs con PPI, además de no ser efectivo para evitar la enteropatía, llega a exacerbarla (Otani *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2017).

En este trabajo se estandarizó un modelo murino de daño GI con la administración continua de indometacina, que es un AINE derivado del ácido indol-acético con actividad antipirética, analgésica y antiinflamatoria muy efectiva, que por lo tanto, se prescribe en condiciones como espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis reumatoide, bursitis, tendinitis, sinovitis y otras enfermedades inflamatorias (Sivalingam *et al.*, 2007; Suleyman *et al.*, 2010; Lucas, 2016).

Al ser administrada oralmente, la indometacina comienza a absorberse a las 2 horas (Lucas, 2016). El mecanismo de acción de los AINEs es a través de la inhibición de las enzimas COX-1 (constitutiva) y COX-2 (inducible), las cuales tienen como función principal llevar a cabo la síntesis de PGs (Conaghan, 2012). La indometacina al ser un fármaco no selectivo tiene un efecto más intenso sobre la COX-1 que sobre la COX-2 (Scheiman, 2009; Lucas, 2016).

Las PGs constituyen una importante línea de defensa en el sistema GI, ya que tienen como función estimular la secreción de bicarbonato, mantener la integridad y proliferación de los enterocitos, y regular el flujo de la circulación sanguínea (Wallace, 2011). En la mucosa gástrica los eventos adversos por el uso de AINEs se relacionan principalmente con la inhibición de PGs derivadas de COX-1, por lo tanto, el tejido se vuelve más vulnerable ante el daño inducido por el ácido luminal y la pepsina, lo cual incrementa el riesgo de sufrir ulceraciones (Shigeta *et al.*, 1998; Massó *et al.*, 2010). Sin embargo, en la enteropatía la inhibición de COX no es el único mecanismo implicado, pues aparentemente el daño inicia poco después de la administración oral del fármaco,

mediante una acción local persistente causada por la circulación enterohepática y los efectos sistémicos posteriores a su absorción (Whittle, 2004; Scarpignato & Hunt, 2010; Wallace, 2011).

Algunos estudios han demostrado que el uso continuo de AINEs induce respuestas de estrés en los enterocitos, específicamente en el retículo endoplásmico y mitocondrias, lo cual provoca un desacoplamiento en la fosforilación oxidativa con la consiguiente deficiencia de ATP y muerte celular (Boelsterli *et al.*, 2012). Posteriormente, el incremento en la permeabilidad de la mucosa intestinal facilita la translocación del lumen del intestino a la submucosa de ácidos biliares, secreciones pancreáticas y bacterias que activan la cascada inflamatoria (Scarpignato & Hunt, 2010; Bjarnason *et al.*, 2018). Algunos de los componentes de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, sirven como PAMP's; por ejemplo, el LPS que también se conoce por ser una endotoxina, que se asocia con la porción extracelular de TLR4 (Akira *et al.*, 2006). Una vez que se produce el reconocimiento de los ligandos, los TLRs activan vías de señalización que culminan con la activación de NF- κ B, el cual se libera de I κ B y se traslada al núcleo, donde regula la transcripción y traducción de genes inflamatorios como el TNF- α (Ashley *et al.*, 2012). El TNF- α induce la expresión de otras citocinas proinflamatorias y mediadores inflamatorios (como lo son IL-1 β e iNOS), que en combinación con quimiocinas (como CXCL1), favorecen el reclutamiento y activación de células proinflamatorias (macrófagos, neutrófilo, linfocitos, etc) en el tejido dañado (Nathan, 2002; Fukumoto *et al.*, 2011; Ashley *et al.*, 2012). Los gránulos azurófilos de los neutrófilos poseen cantidades elevadas de MPO, que es una enzima utilizada para generar ROS como el superóxido y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂); así como también azurocidina (proteína que incrementa la permeabilidad bacteriana), lisozimas, defensinas y proteasas (catepsina G, elastasas y proteasa 3) (Wilgus *et al.*, 2013). Por lo tanto, la infiltración masiva de neutrófilos favorece también el desarrollo de la lesión tisular, ya que la liberación de todos los efectores mencionados poseen un efecto tóxico que amplifican la respuesta inflamatoria (Stadnyk, 2002; Ashley *et al.*, 2012).

La estandarización del modelo murino de daño GI inducido con indometacina se basó en gran medida en el trabajo de Abimosleh y colaboradores (2013), donde utilizaron ratas macho Sprague Dawley (140-170 g) y dosificaron el fármaco utilizando como

vehículo agua; además, estandarizaron de forma previa la dosis del fármaco utilizando 6, 8 y 10 mg/kg de peso de indometacina en dosis diarias durante 7 días. En este proyecto, para determinar la dosis óptima, se realizó un ensayo de supervivencia (protocolo A) con ratas macho Wistar (150-200 g), en donde los animales recibieron 4, 6, 8, y 10 mg/kg de peso de indometacina en una solución de Na₂CO₃ al 5%. Aunque son muchos los estudios que sugieren una dosis de 10 mg/kg de peso para inducir la gastroenteropatía por el uso de AINEs (Wallace *et al.*, 2011; Satho *et al.*, 2012), el protocolo A hizo evidente que esta dosis era demasiado agresiva, ya que la supervivencia de los animales se vio fuertemente afectada. De igual modo, Sha y colaboradores (2013) reportaron que la administración oral de indometacina, resuspendida en una solución de carboximetilcelulosa al 1%, en ratones macho ICR (aproximadamente 30 g) a dosis de 10 mg/kg y durante 7 días, induce daño intestinal de manera que provoca una disminución importante en la supervivencia, con sólo un 28.6% de animales vivos tras los 7 días de administración.

Mientras que Abimosleh *et al.* (2013) sostienen que para generar un modelo de daño entérico en rata Sprague-Dawley la dosis adecuada de indometacina es de 8 mg/kg de peso, utilizando como vehículo agua, durante un periodo de 5 días. Kwak *et al.* (2016) logran establecer su modelo de daño intestinal en un protocolo experimental con rata Sprague-Dawley en el cual administran indometacina a 15 mg/kg de peso en 2 días. Ambos grupos sugieren que dosis menores a las que usaron no generan ningún evento adverso en la mucosa GI de los animales tratados con el fármaco. Sin embargo, en un protocolo reportado por Kamil *et al.* (2007) la enteropatía por el uso de AINEs se logró mediante la administración de 6 mg/kg de peso de indometacina, durante un periodo de 7 días, en ratas macho Sprague Dawley (165 g). Se puede observar que, a pesar de tratarse de la misma cepa de ratas en estos tres modelos, las dosis y tiempo de inducción de daño son muy variadas. En el protocolo A desarrollado en este trabajo la muerte de los animales inició el día 3 del ensayo y llegó a su totalidad durante el día 6 a dosis de 10 mg/kg de peso cada día. Además, se encontró que los animales que recibieron una dosis de 6 mg/kg de peso tuvieron una menor mortalidad, que aquellos que fueron administrados por 8 mg/kg, pero debido a que la supervivencia de los animales con ambas dosis empezó a verse afectada el mismo día del ensayo (día 6) se realizó un protocolo B, con la finalidad de comparar el efecto de ambas dosis evaluando un mayor número de parámetros relacionados con daño GI.

En el modelo de Abimosleh *et al.* (2013) los parámetros que se tomaron en cuenta para validar el daño entérico por el uso de AINEs fueron: cambios en el peso corporal, ingesta de agua y alimento, y consistencia de heces fecales, así como también cambios en la conducta del animal dañado (disminución de movilidad y agilidad, así como piel erizada), peso de órganos y daño en intestino (evaluado por la formación de úlceras y la actividad de la MPO, que es un indicador ampliamente utilizado para evaluar la infiltración de neutrófilos en tejido inflamado). En cambio, Singh *et al.*, (2016) utilizaron como parámetros de referencia: cambios en el peso corporal, ingesta de alimento, cambios en los valores de Hg, Hct, proteínas totales, albúmina, y ALT, índice de lesión (se determinó sumando el área de las úlceras/animal) y la lipoperoxidación (LPO) del tejido intestinal.

Durante la duración del protocolo B, la administración de indometacina con ambas dosis (6 mg/kg y 8 mg/kg) provocó una disminución en la ingesta de alimento de los animales, lo cual repercutió también de forma importante en su ganancia de peso, ya que fue menor con respecto al Control, de modo que esto coincide con lo que encontraron tanto Abimosleh *et al.* (2013) como Singh *et al.*, (2016) para ambos parámetros. En cuanto al consumo de agua que tuvieron los animales del ensayo B, no se encontraron cambios significativos en su ingesta, lo cual difiere de lo reportado por Abimosleh y colaboradores (2013), ya que ellos encontraron que la administración de la indometacina ocasiona un incremento en el consumo de agua de los animales.

Además, se evaluó de manera macroscópica el tejido gástrico e intestinal de los animales que recibieron una dosis de 6 mg/kg y 8 mg/kg de indometacina. Los animales no mostraron lesiones macroscópicas en el estómago luego de la evaluación visual. En cuanto al tejido intestinal para el protocolo B, los animales que recibieron la dosis de 6 mg/kg de peso de indometacina desarrollaron eritema y úlceras, mientras que aquellos con dosis de 8 mg/kg tuvieron más perforaciones que úlceras, lo que puede indicar un daño en etapas más avanzadas de la enteropatía. En la literatura que existe con respecto al tema, los modelos experimentales para la investigación del daño inducido por el uso de indometacina son diferentes a nivel gástrico y entérico. Por lo regular, la indometacina produce lesiones en la porción glandular del estómago después de 4 a 6 h de inyectar una dosis de 20 a 35 mg/kg en ratas o ratones en ayuno (Kato *et al.*, 2009; Rios *et al.*, 2010; Zelena & Filaretova, 2010; Filaretova *et al.*, 2011). En cambio, para la inducción de daño

entérico se inyecta mediante vía subcutánea una dosis menor de indometacina (10 mg/kg) a ratas o ratones sin ayuno y se evalúa el área de daño 24 h después de la inyección (Kamei *et al.*, 2008; Yoda *et al.*, 2010; Kawahara *et al.*, 2011). Sin embargo, Filaretova y colaboradores (2011) reportaron que en un modelo realizado con ratas macho Sprague Dawley (300 g), que se mantuvieron en ayuno durante 24 h y recibieron una inyección subcutánea de 35 mg/Kg de peso de indometacina, desarrollaron erosión hemorrágica en la porción glandular del estómago 4 h después de la administración del fármaco, que se curó casi en su totalidad 48 h más tarde; no obstante, de manera paralela a la curación incrementó el daño a nivel entérico, de modo que concluyeron que la cicatrización gástrica inducida por la indometacina va seguida por efectos adversos en la mucosa intestinal. Por lo tanto, para inducir daño mediante dosis vía oral es necesario la administración continua del fármaco durante un periodo de al menos 7 días con una dosis menor a 10 mg/kg (Kamil *et al.* 2007; Abimosleh *et al.* 2013). El esquema de inducción de daño que usamos para el protocolo B (dosis de 6 y 8 mg/kg de peso de indometacina, durante 5 días) provocó que los animales desarrollarán una enteropatía, lo cual es congruente con la información reportada en la literatura.

Singh y colaboradores (2016, 2017) reportan que la inducción de daño con diclofenaco provoca un declive en los valores de Hg, Hct, proteínas totales y albúmina; esto como consecuencia del sangrado asociado a la presencia de úlceras y perforaciones, lo cual, a su vez favorece un cambio de color en las heces de los animales tratados con el fármaco que va del marrón al negro. En los resultados obtenidos en el protocolo B también se pudo observar concordancia con lo reportado por Singh *et al.* (2016, 2017), ya que debido a la inducción de daño por el fármaco se encontró una disminución significativa en los valores de Hg, Hct, proteínas totales y albúmina, así como también un cambio en el color y consistencia de las heces de los animales con daño inducido con indometacina (resultado no mostrado).

Además, es importante mencionar que los niveles bajos tanto de Hg como de Hct también pueden estar vinculados con una disfunción en la mucosa intestinal, que altera la absorción de hierro y vitamina B12, ambos necesarios en la síntesis de Hg (Morris *et al.*, 1992; Davies & Wallace, 1997). La anemia ferropénica se caracteriza por eritrocitos hipocrómicos microlíticos, con anisocitosis (anomalías en el tamaño de los glóbulos rojos);

sin embargo, estos signos no son patognomónicos (Barragán-Ibañez *et al.*, 2016). Por lo tanto, para establecer un diagnóstico de anemia ferropénica es necesario determinar los índices de Wintrobe, es decir, volumen corpuscular medio (HCV), Hg corpuscular media (MCH) y la concentración de Hg corpuscular media (MCHC); no obstante, para incrementar la precisión del diagnóstico lo ideal es realizar una evaluación de ferritina en suero (Rockey, 2005; Bresci, 2009; Barragán-Ibañez *et al.*, 2016; Camaschella, 2017). La hepcidina es una proteína de fase aguda, que durante el proceso inflamatorio citocinas como IL-1 β y el TNF- α inducen su expresión, lo cual resulta en: una disminución en la producción de eritropoyetina (EPO) por el riñón, la inhibición de la acción de la EPO en células eritroides lo cual conduce a un estado pro-apoptótico (Barragán-Ibañez *et al.*, 2016; Camaschella, 2017). Además, la expresión de hepcidina, que incrementa bajo el estímulo inflamatorio causa una disminución en la absorción intestinal de hierro y la retención de hierro en macrófagos, lo cual a su vez incrementa también los valores de ferritina intracelulares (Weiss & Goodnough, 2005; Smith *et al.*, 2013; Camaschella, 2017). Por otro lado, la anemia perniciosa consiste en una enfermedad autoinmune en donde la atrofia de la mucosa gástrica afecta principalmente el cuerpo y fondo del estómago, reduciendo el número de células parietales que producen el factor intrínseco necesario para la absorción de vitamina B12, de tal forma que, su diagnóstico se basa en la demostración de anemia megaloblástica, niveles bajos de vitamina B12 en suero, atrofia gástrica y la presencia de anticuerpos contra las células parietales gástricas o factor intrínseco (Bizzaro & Antico, 2014; Toh, 2016).

En un estudio *in vitro* realizado en células epiteliales gástricas de rata de la línea RGM-1 se encontró que al usar una concentración 1mM de indometacina, disminuyó el potencial mitocondrial transmembranal, lo cual a su vez inhibió la fosforilación oxidativa (Nagano *et al.*, 2005). El desacoplamiento de la fosforilación oxidativa induce la activación de proteínas apoptóticas (caspasa 3 y 9), cambios en actividades específicas de enzimas mitocondriales (citrito sintasa, succinato deshidrogenasa y citocromo C oxidasa), disminución en la producción de ATP, así como también la acumulación de adenosin difosfato (ADP) y adenosin monofosfato (AMP) (Somasundaram *et al.*, 1995; Matsui *et al.*, 2011). Por lo tanto, se produce una estimulación de la glucólisis en los enterocitos, filtración de iones calcio (Ca⁺²) y citocromo C al citosol, aumento en la producción de ROS y un desequilibrio osmótico, que favorece la peroxidación celular de los lípidos de la

membrana y disfunción de las uniones intercelulares, que a su vez incrementan la permeabilidad de la mucosa y la apoptosis celular (Somasundaram *et al.*, 1995; Higuchi *et al.*, 2009; Matsui *et al.*, 2011; Boelsterli *et al.*, 2012; Bjarnason *et al.*, 2018).

La peroxidación de los lípidos de la membrana o lipoperoxidación (LPO), es un mecanismo que indica la producción de ROS, en donde de forma global el proceso requiere de tres pasos: inicio, propagación y terminación. Durante la etapa de inicio, se produce la formación de un lípido radical (L), que en la fase de propagación reacciona con el oxígeno para formar un peroxil lipídico (LOO), el cual extrae un hidrógeno de otra molécula lipídica para generar un nuevo L y un lípido hidroperóxidado (LOOH), sin embargo, el proceso llega a la fase de terminación sólo hasta que una molécula antioxidante dona un átomo de hidrogeno al LOO y evita la formación de más radicales (Yin *et al.*, 2011; Ayala *et al.*, 2014). Los productos primarios durante el proceso son los lípidos hidroperóxidados (LOOH) y los aldehídos que pueden formarse como productos secundarios son el malondialdehído (MDA), el propanal, hexanal y el 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Ayala *et al.*, 2014). En los ensayos realizados por Singh y colaboradores (2016, 2017), encontraron que el diclofenaco induce un incremento en los niveles de MDA en tejido gástrico e intestinal lo cual asocian con un incremento en la producción de ROS. De igual manera, Fornai *et al.* (2014, 2017) mencionan que en la enteropatía inducida por indometacina en rata Wistar (3 mg/kg de peso, durante un periodo de 14 días), incrementan los niveles de MDA como consecuencia de la peroxidación de lípidos. Para este estudio en el protocolo B se evaluó la producción de LOOH en tejido gástrico e intestinal mediante el método de xilenol-naranja (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1996). De manera remarcable, a pesar de tratarse de métodos distintos, es evidente que el uso de AINEs incrementa de forma significativa la LPO en el tejido GI, lo cual significa que el fármaco está causando una lesión mitocondrial que disminuye el potencial mitocondrial transmembranal e induce la formación de un poro de transición de permeabilidad mitocondrial, lo cual favorece la liberación de citocromo C, que genera ROS y desencadena la cascada de caspasas y la LPO celular (Matsui *et al.*, 2011; Mei *et al.*, 2011). Sin embargo, es posible que el incremento de ROS también se deba a la presencia de neutrófilos, ya que se sabe que estos se infiltran en la mucosa intestinal durante el proceso inflamatorio (Ashley *et al.*, 2012).

En el protocolo B, la validación del daño entérico inducido por indometacina quedo demostrada por los cambios metabólicos, bioquímicos e inflamatorios: disminución en el consumo de alimento y peso corporal, sangrado en intestino que se ve reflejado en la reducción de Hg, Hct, proteínas totales y albúmina, formación de úlceras en tejido intestinal, y peroxidación lipídica. De modo que, en base a los resultados que se observaron en todos estos parámetros se determinó que la dosis óptima para la inducción de daño fue de 6 mg/kg de peso administrados por un mínimo de 5 días.

Teniendo en cuenta el alto consumo de AINEs y la alta prevalencia de efectos adversos que se generan por su uso desmedido, particularmente en el tracto GI, resulta imprescindible el desarrollo de nuevas terapias que restauren el daño inducido por estos fármacos, en especial en pacientes sometidos a un tratamiento a largo plazo con AINEs. En este contexto, ha incrementado el interés por evaluar los componentes bioactivos de los alimentos, así como también productos de origen natural que, en comparación con los tratamientos farmacológicos convencionales, no provoquen otras comorbilidades.

Una vez demostrado el daño GI inducido mediante la administración esofágica de indometacina, se estableció un esquema de pretratamiento con el GMP, el cual es un péptido de 64 aminoácidos que por medio de la quimosina se libera al suero de la leche durante la fabricación del queso (Saito & Itoh, 1992; Thomä-Worriger *et al.*, 2006). Debido a las propiedades prebióticas (Chen *et al.*, 2012), antiinflamatorias (Doddauao *et al.*, 2005; Requena *et al.*, 2008; Requena *et al.*, 2010; González *et al.*, 2014), inmunomoduladoras (Jiménez *et al.*, 2012; Jiménez *et al.*, 2016, Roldan *et al.*, 2016, Muñoz *et al.*, 2017) y antioxidantes del GMP (Xu *et al.*, 2013), se estima que podría funcionar como un adecuado tratamiento ante el daño inducido por el uso crónico de AINEs, ya que cada una de las propiedades mencionadas pueden tener un efecto en la atenuación de los mecanismos mediante los cuales estos fármacos inducen daño GI. El GMP se administró de manera oral a una dosis de 500 mg/kg de peso, diariamente desde 7 días previos a la inducción con indometacina y durante la duración del protocolo de daño (7 días). Además, con la finalidad de evaluar el efecto del GMP, se utilizó LGG en coadministración en otro grupo experimental ya que la información que se tiene con respecto a este probiótico es que promueve la regeneración de las células epiteliales, particularmente en los márgenes de la úlcera y modula las respuestas inflamatorias (Lam *et al.*, 2007; Uchida *et al.*, 2004;

Uchida *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2012; Dharmani *et al.*, 2013). El LGG se administró una vez por día, de manera conjunta con el GMP, con una concentración final de 1×10^9 células/ml. Los animales recibieron el tratamiento de GMP y LGG 4 horas previas a la administración de la indometacina (protocolo C).

Debido a sus propiedades nutraceuticas y por no ser inmunogénico (Mikkelsen *et al.*, 2006), el GMP ya se emplea de forma amplia dentro de la industria alimenticia y farmacéutica, y ensayos clínicos han probado su seguridad en humanos con daño GI (Hvas *et al.*, 2016). Así mismo, son diversos los ensayos clínicos que confirman que el uso del LGG es seguro en pacientes con un estado de salud delicado como es el caso de bebés con bajo peso al nacer, mujeres embarazadas, pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y con ventilador mecánico (Kalliomäki *et al.*, 2001; Salminen *et al.*, 2004; Boyle *et al.*, 2008; Kopp *et al.*, 2008; Luoto *et al.*, 2010; Manzoni *et al.*, 2011). Durante el protocolo C no solo la seguridad de ambos pretratamientos (GMP y GMP/LGG) quedó demostrada, también fue evidente que tuvieron un efecto protector contra el daño ocasionado por la indometacina, ya que la supervivencia al dar el tratamiento con GMP sólo o combinado con LGG no tiene ninguna modificación importante, es decir, es del 100%. Sin embargo, no solo la supervivencia de los animales reflejó el efecto benéfico de ambos tratamientos, otras variables evaluadas demostraron la disminución del daño.

Gracias al tratamiento con GMP o GMP/LGG se evitó la disminución en la ingesta de alimento asociada al daño GI que causa la indometacina. Por lo tanto, la ganancia de peso para los animales con los tratamientos fue muy semejante a la de los controles. Estos resultados coinciden con lo reportado en un modelo de daño intestinal con diclofenaco (Kim *et al.*, 2005) en donde el tratamiento con calostro (fuente importante de GMP) no provocó cambios significativos en cuanto a la ingesta de alimento y el peso de los animales. Así mismo Daddaoua *et al.*, (2005) menciona que el GMP en un modelo de colitis inducida por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) provocó una disminución en la anorexia y pérdida de peso de los animales, y se aventuran a formular la hipótesis de que este cambio se produce como consecuencia a la disminución en la expresión de IL-1 β y TNF- α , secundaria a la prevención del daño por el uso del GMP. De igual modo, Cui y colaboradores (2017) observaron que en un modelo de colitis inducida por famaxodona

los animales que recibieron dosis de GMP mantuvieron una ingesta de alimento similar a la del grupo control, de tal forma que, al concluir con el protocolo el peso de los animales se restableció.

En cuanto a los parámetros evaluados en sangre, los valores obtenidos para Hg y Hct se restablecieron a sus niveles normales en aquellos grupos que fueron inducidos con indometacina pero que recibieron de forma previa un tratamiento con GMP o GMP/LGG. Además, es importante mencionar que el cotratamiento de GMP y LGG mejora lo generado con el tratamiento sólo con GMP; sin embargo, ésta es la única variable donde se observa una mejora del efecto del GMP con LGG. Por otro lado, los resultados evaluados para los índices de Wintrobe (MCV, MCH y MCHC) se mantuvieron dentro del rango normal, por lo cual la disminución en los valores de Hg no parece asociarse con una anemia ferropénica y se vincularía más con el sangrado intestinal que es de las principales complicaciones por el uso de AINES (Adebayo *et al.*, 2006). Además, durante la enteropatía por estos fármacos se ha reportado de forma previa una condición denominada “enteropatía perdedora de proteínas” (Sylvester, 2011; Yu & Lin, 2014; Levitt & Levitt, 2017), en donde los descensos de proteínas séricas y albúmina sirven como índices de fuga vascular. En este sentido, Kim *et al.* (2005) mencionan que la hipoproteinemia e hipoalbuminemia se previno con el uso del calostro bovino sin aumentar los perfiles bioquímicos séricos de la función hepática (ALT). Lo cual también fue algo que observamos durante el protocolo C, de modo que una vez más los pretratamientos demostraron tener un efecto protector.

Al hacer el sacrificio de los animales, en el trabajo de Abimosleh *et al.* (2013) observaron que el tratamiento con indometacina provocó un incremento en el peso del timo, hígado, bazo, intestino delgado e intestino grueso. De forma inicial, para este proyecto se evaluó el peso de bazo, hígado, estómago, intestino delgado e intestino grueso, sin embargo, se observó que para el protocolo C en los animales administrados con indometacina sólo se incrementó el peso del estómago, intestino delgado e intestino grueso. El aumento de peso de los órganos es altamente probable que se deba a una hiperemia y edema de la mucosa o submucosa, que a su vez se combina con la infiltración de células inflamatorias (Wiig, 2011; Abimosleh *et al.* 2013). Además, es importante destacar que con el tratamiento de GMP y GMP/LGG hubo una disminución a

la normalidad en el peso de estos órganos. Si bien el aumento de peso del intestino es indicativo de un probable proceso inflamatorio, otros autores han reportado que la disminución de su longitud también indica el grado de daño y pérdida de funcionalidad del intestino delgado (Nagai *et al.*, 2017). No obstante, en este trabajo no se encontró que la inducción de daño con indometacina disminuyera de forma significativa la longitud del intestino de los animales.

La curación del tejido ulcerado es un proceso complejo que involucra mecanismos como migración y proliferación celular, reepitelización y angiogénesis, regulados por factores de crecimiento, factores de transcripción y citocinas que favorecen la cicatrización de las úlceras (Choi *et al.*, 2008). Al evaluar los parámetros de inflamación y daño en los tratamientos con GMP y GMP/LGG se observó que a nivel intestinal hubo una disminución casi en su totalidad del tejido ulcerado. En un estudio realizado en colitis ulcerativa con famoxadone (Cui *et al.*, 2017), en donde se administró GMP durante 4 días, hubo una disminución del daño en la mucosa GI y se observó que el epitelio de la mucosa estaba relativamente intacto. Un efecto similar fue reportado por Bessette *et al.* (2016) en un modelo de daño con indometacina (10 mg/Kg vía subcutánea), donde el pretratamiento con β -casofensina (un péptido de 30 aminoácidos presente en productos derivados de leche fermentada) disminuye el daño macroscópico y microscópico a manera dosis dependiente (4 μ L/g peso corporal de una solución de 0.01 a 100 μ M). En cuanto al uso de probióticos, se ha documentado que favorecen la cicatrización del tejido ulcerado probablemente mediante un mecanismo específico al promover la proliferación celular y la angiogénesis, disminuyendo la apoptosis (Lam *et al.*, 2007). En este sentido, Lam y colaboradores (2007) observaron que la administración de 2×10^9 células/día de LGG, durante un periodo de tres días, disminuye el tamaño de las úlceras inducidas en ratas macho Sprague-Dawley por la aplicación en el lumen gástrico de una solución de ácido acético. Ellos observaron que con la administración de LGG la proliferación celular incrementaba en un 54% y las células apoptóticas disminuían un 33%; además, encontraron que el LGG estimuló a manera dosis dependiente la angiogénesis en el margen de la úlcera. Sin embargo, para dilucidar el mecanismo mediante el cual el LGG favorecía el proceso de cicatrización evaluaron la expresión de diversos factores de crecimiento, y encontraron que la administración de LGG incrementaba la expresión de ornitina descarboxilasa (ODC), del linfoma 2 de las células B (Bcl-2), del factor de

crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). La ODC es la enzima limitante de algunas poliaminas (incluidas la espermidina, espermina y putrescina) involucradas en la proliferación, migración y diferenciación celular; además, su agotamiento puede causar una disminución en la expresión de proteínas de uniones adherentes (AJs) como la E-cadherina, B-catenina y catenina (Ye *et al.*, 2001; Timmons *et al.*, 2012; Orlando *et al.*, 2018). En cuanto a las proteínas de la familia Bcl-2, se sabe que poseen funciones pro y anti-apoptóticas (Siddiqui *et al.*, 2015). Lam y colaboradores (2007) especulan que al aumentar la expresión de ODC y de Bcl-2, ambas podrían tener un efecto sinérgico al disminuir la relación de apoptosis celular/proliferación celular, lo cual promovería el proceso de cicatrización de la úlcera gástrica. En este sentido, Lui *et al.*, (2005) observaron que en la apoptosis inducida mediante TNF- α en células de leucemia promielocítica humana HL-60 y Jurkat T, el incremento en la expresión de ODC disminuye la expresión de ROS y evita la disminución de Bcl-2, al prevenir la liberación de citocromo C de las mitocondrias e inactivar a la caspasa 8, 9 y 3. Por lo tanto, respalda la hipótesis de que el aumento en la expresión de ODC y Bcl-2 consiste en un mecanismo anti-apoptótico. No obstante, VEGF y EGF también aceleran la cicatrización de las úlceras, ya que ambos estimulan la angiogénesis (Sakurai *et al.*, 2004; Tamura *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2008). En los resultados del presente trabajo, se puede observar que el pretratamiento con GMP, solo o combinado con LGG, evita casi en su totalidad la ulceración del tejido intestinal por la administración de indometacina. Sería interesante analizar los niveles de expresión de ODC, Bcl-2, VEGF y EGF en intestino para poder definir si estos factores están participando en el efecto protector de los tratamientos sobre el proceso de ulceración. Por otro lado, otra cepa de probiótico que se ha explorado para la prevención del daño por AINEs es el *Lactobacillus plantarum*. Su administración en un grupo de 10 voluntarios sanos, a los cuales se les administró diferentes dosis de indometacina vía oral, logró restablecer la población de células T reguladoras (CD4+/FoxP3) disminuida por efecto de la indometacina, por lo que se genera atenuación de la respuesta inflamatoria (De Vos *et al.*, 2017). De igual manera, en nuestro trabajo se demostró que la coadministración de GMP y LGG genera una disminución del proceso inflamatorio al verse disminuido el peso del intestino delgado y grueso, y los niveles de LOOH, así como la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias en tejido intestinal.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Durante el proceso inflamatorio entérico se da una infiltración de células proinflamatorias, dentro de las que destaca el neutrófilo. Éste posee una serie de enzimas líticas y oxidativas que son capaces de generar daño en el tejido donde se activan (Higashiyama *et al.*, 2012; Kakimoto *et al.*, 2010). Con la finalidad de evaluar la utilidad del GMP como nutracéutico, usando un modelo con mayor conexión fisiopatológica a la que se observa en la enfermedad inflamatoria del intestino humano, Ortega-González y colaboradores (2013) realizaron un ensayo donde indujeron colitis utilizando dos vías: 1) mediante la transferencia de linfocitos por vía intraperitoneal a ratones hembra C57BL/6 y 2) por la adición de dextrano sulfato de sodio (DSS) en el agua potable de ratones hembra C57BL/6, durante un periodo de ocho días. En ambos modelos encontraron que el pretratamiento con GMP normalizó la actividad de la enzima MPO, que incrementó durante la inducción de la colitis. Por otro lado, Requena *et al.*, 2009 reportan que la administración de 500 mg/día de GMP de manera previa a la inducción de ileítis por TNBS reduce de manera significativa la actividad de MPO. Para este estudio, la actividad de la enzima MPO se vio disminuida cuando se da un pretratamiento de GMP frente al daño entérico generado por la administración de indometacina. Sin embargo, no se observó una mejora de este parámetro cuando se coadministra GMP junto con LGG, ya que no se modifica la actividad incrementada de la enzima por la indometacina. Tomando en cuenta este resultado pareciera ser que el uso de LGG contrarresta el efecto protector del GMP. Sin embargo, este efecto no es observado en ninguno de los otros parámetros evaluados. La propuesta del uso de bacterias probióticas como tratamiento del daño intestinal ha sido controversial en los últimos tiempos, pues estudios anteriores realizados utilizando a LGG en la enteropatía producida por el uso de AINEs, demostraron que la administración vía oral de LGG exacerba el daño inducido por la administración de AINEs (Kamil *et al.*, 2007), utilizando un esquema de tratamiento que incluía una administración de 1×10^9 células/2 veces al día/día, durante un periodo de 7 días. En nuestro modelo, si bien no encontramos que el probiótico (LGG) potenciara sus efectos con el uso de un prebiótico (GMP), tampoco encontramos que el esquema de coadministración que utilizamos (1×10^9 células/día, durante un periodo de 7 días previos a la inducción de daño) exacerbe el daño de la indometacina.

El NO desempeña un papel importante en la regulación de funciones celulares en los sistemas cardiovascular, neuronal e inmunológico, así como también en el tracto GI.

En condiciones normales, las fuentes enzimáticas de NO en mucosa GI se limitan a las formas constitutivas de la NO sintasa (NOS): NOS neuronal (nNOS, tipo I) y NOS endotelial (eNOS, tipo III). Sin embargo, la otra isoforma de NOS se denomina NOS inducible (iNOS, tipo II) que se expresa en estados de inflamación y actividad inmune por factores como citocinas y LPS, principalmente en células inflamatorias (macrófagos y neutrófilos) (Wallace & Miller, 2000; Whittle, 2004). Kawahara y colaboradores (2011) observaron que en el daño entérico inducido mediante una inyección subcutánea de indometacina (10 mg/kg de peso) en ratones macho C57BL/6 incrementó la expresión de iNOS. Durante el protocolo C, los animales con daño entérico tuvieron un incremento en los valores de iNOS, sin embargo, el tratamiento profiláctico con GMP y GMP/LGG provocó una normalización en la expresión de este gen inflamatorio. De igual modo Daddaoua *et al.*, (2005) mencionan que, en un modelo de colitis ulcerativa, el pretratamiento con GMP atenúa la sobreexpresión de iNOS. De modo que estos hallazgos sugieren que los pretratamientos (GMP y GMP/LGG) protegen la mucosa intestinal contra la lesión inducida por la indometacina a través de una inhibición en la expresión de iNOS, entre otros mecanismos.

Otani *et al.*, (2017) sugieren que el mecanismo mediante el cual los AINEs causan daño entérico es como consecuencia a la deficiencia de PGs y a la disfunción mitocondrial, de modo que el LPS de las enterobacterias Gram-negativas y la HMGB1 liberada por las células epiteliales dañadas, se unen al TLR4 en los macrófagos lo que induce, vía NF- κ B, MyD88 y NLRP-3, la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β y de quimiocinas (CXCL1) que en conjunto inducen la infiltración de neutrófilos en la mucosa y submucosa del intestino delgado, causando daño en el intestino delgado a través de la liberación de ROS y de otras sustancias tóxicas. La quimiocina CXCL-1 actúa como una señal para el reclutamiento de neutrófilos periféricos al sitio de infección y luego activa la liberación de proteasas y ROS para la muerte microbiana en el tejido (Jin *et al.*, 2014). En el protocolo C, la expresión de esta quimiocina incrementó con las dosis de indometacina, sin embargo, su expresión se vio disminuida en aquellos animales que recibieron como pretratamiento el GMP sólo o combinado con LGG. Lo anterior tiene una estrecha relación con lo reportado por Requena *et al.* (2008) en donde en un modelo de ileítis el GMP reguló la secreción de IL-8 (equivalente a CXCL1 de rata) de los monocitos. Además, el efecto antiinflamatorio del

GMP también quedó demostrado durante el modelo de colitis publicado por Daddaoua *et al.*, (2005) donde se demostró que la administración sobre todo a manera de pretratamiento de 500 mg/kg de peso por día de GMP disminuye la inflamación evaluada a través de cambios en los niveles de la enzima iNOS, IL-1 y TGF- β . De igual manera López-Posadas *et al.* (2010) en otro modelo de colitis en ratas hembra inducido con DSS observó que el pretratamiento con GMP a 500 mg/kg de peso por día disminuye la inflamación del tejido por la disminución de las citocinas IL-1 β e IL-6. Además, en base a la evidencia experimental durante el año 2016 en el Departamento de Hepatología y Gastroenterología, del Hospital Universitario de Aarhus en Dinamarca se reportó por primera vez en pacientes que presentan colitis ulcerativa del íleon que la administración continua de 30 g de GMP por día, durante 2 meses mejora significativamente los signos y síntomas de la enfermedad, así como la calidad de vida de los pacientes (Hvas *et al.*, 2016).

14. CONCLUSIONES

El modelo de enteropatía en rata Wistar se estableció con dosis de 6 mg/kg de peso/día de indometacina, durante un periodo mínimo de cinco días. Dicho modelo se caracterizó por una disminución en el consumo de alimento de los animales, que a su vez derivó en un descenso en su peso corporal. Además, también se encontró que los animales tuvieron un declive en los valores de Hg, Hct, proteínas totales y albúmina. En cuanto al daño del tejido intestinal, mediante la evaluación macroscópica visual del daño se encontró eritema y úlceras; mientras que, por medio de la evaluación bioquímica, se encontró un incremento en la lipoperoxidación del tejido tanto gástrico como intestinal.

Una vez que se tuvo bien caracterizado el daño que induce la indometacina sobre la mucosa entérica, se evaluó el efecto de un tratamiento profiláctico con GMP, solo o combinado con LGG. El GMP, al cual se le atribuyen propiedades prebióticas, antiinflamatorias, inmunomoduladoras y antioxidantes, al ser administrado de forma profiláctica a la inducción de daño, durante un periodo de siete días, demostró ser altamente efectivo al disminuir los efectos adversos inducidos por el uso de la indometacina. El GMP disminuyó la producción de ROS que se demostró mediante una disminución en la LPO del tejido entérico. La reducción del proceso inflamatorio se observó mediante la disminución de la expresión de genes inflamatorios (IL-1 β , iNOS y CXCL1) en el tejido intestinal. Al no haber activa una respuesta inflamatoria no se activó el reclutamiento de neutrófilos, lo cual a su vez disminuyó también la producción de ROS, y fue demostrado mediante una disminución en la producción de la enzima MPO en el tejido intestinal. Por lo tanto, hubo una disminución en su totalidad del tejido intestinal ulcerado, de modo que al no haber daño en el tejido se produjo una normalización en los valores de Hg, Hct, proteínas totales y albúmina, sin modificar los valores de ALT lo que indica ausencia de daño hepático por recirculación enterohepática de indometacina. Además, favoreció que el consumo de alimento de los animales se mantuviera de forma normal y en consecuencia tuvieron un incremento de su peso corporal adecuado.

Como conclusión final, el GMP como tratamiento profiláctico en la enteropatía inducida por el uso de indometacina es altamente efectivo al disminuir las complicaciones asociadas a este fármaco y quedó demostrado en este trabajo, ya que evitó la formación de úlceras al intervenir de forma efectiva en muchos de los mecanismos mediante los cuales los AINEs inducen daño en la mucosa GI.



15. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichtman, Andrew H, & Pillai, Shiv. (2012). *Inmunología celular y molecular* (7a ed.). Barcelona: Elsevier España.
- Abd El-Salam, M.H. (2006). Separation of Casein Glycomacropptide From Whey: Methods of Potential Industrial Application. *Int J Dairy Sci*, 1: 93-99.
- Abimosleh, S.M., Tran, C.D., & Howarth, G.S. (2013). Emu Oil Reduces Small Intestinal Inflammation in the Absence of Clinical Improvement in a Rat Model of Indomethacin-Induced Enteropathy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013: 1-10. Doi: 10.1155/2013/429706.
- Acheson, D.W., & Luccioli, S. (2004). Mucosal Immune Responses. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), 387- 404.
- Adebayo, D., & Bjarnason, I. (2006). Is Non-Steroidal Anti-Inflammaory Drug (NSAID) Enteropathy Clinically More Important than NSAID Gastropathy? *Postgraduate medical journal*, 82(965), 186-91.
- Agbowuro, A.A., Huston, W.M., Gamble, A.B., & Tyndall, J.D.A. (2017). Proteases and Protease Inhibitors in Infectious Diseases. *Medicinal Research Reviews*, 38(4), 1295-1331. Doi: 10.1002/med.21475.
- Aguilera-Montilla, N., Pérez-Blas, M., López-Santalla, M., & Martín-Villa, J. M. (2004). Mucosal Immune System: A Brief Review. *Inmunología*, 23(2), 207-2016.
- Akbari, O., Stock, P., DeKruyff, R.H., & Umetsu, D.T. (2003). Role of Regulatory T Cells in Allergy and Asthma. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 627-633.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124 (4), 783-801. Doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- Alessandri, A.L., Sousa, L.P., Lucas, C.D., Rossi, A.G., Pinho, V., & Teixeira, M.M. (2013). Resolution of Inflammation: Mechanisms and Opportunity for Drug Development. *Pharmacology and Therapeutics*, 139(2), 189-212.
- Allen, A., & Flemström, G. (2005). Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288(1), C1-C19. Doi: 10.1152/ajpcell.00102.2004
- Amara, A. A., & Shibl, A. (2015). Role of Probiotics in Health Improvement, Infection Control and Disease Treatment and Management. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(2), 107–114. Doi: 10.1016/j.jsps.2013.07.001.

- Arakawa, T. (2012). Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: Its pathophysiology and clinical relevance. *World Journal of Gastroenterology*, 18(35), 4811.
- Arrese, M., Cabrera, D., Kalergis, A., & Feldstein, M. (2016). Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(5), 1294-1303.
- Ashley, N., Weil, Z., & Nelson, R. (2012). Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43: 385-406.
- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2014). Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 938-956.
- Atay, S., Tarnawski, A. S., & Dubois, A. (2000). Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 61(3-4), 105-124.
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., & Holm, L. (2001). The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(5), G922-G929.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014: 1-31.
- Azuma, N., Yamauchi, K., & Mitsuoka, T. (1984). Bifidus Growth-Promoting Activity of a Glycomacropeptide Derived from Human κ -Casein. *Agric Biol Chem*; 48: 2159-2162.
- Baganz, N. L., & Blakely, R. D. (2012). A Dialogue between the Immune System and Brain, Spoken in the Language of Serotonin. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(1), 48-63.
- Bai, K. (1985). On the Mechanism of Cereobiogen Readjustment to Dysbiosis. *Prog Clin Biol Res*. 181: 169-170.
- Baizabal-Aguirre V., Rosales C., López-Macías C., & Gómez M. (2014). Control and Resolution Mechanisms of the Inflammatory Response. *Mediators of Inflammation*, 2014(3), 2.
- Banerjee, A. K. (1990). Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and the Ileum. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 83(9), 600.
- Barnes, P. J. (2001). Histamine and Serotonin. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 14(5), 329-339. Doi: 10.1006/pupt.2000.0318.

- Barragán-Ibañez, G., Santoyo-Sánchez, A., & Ramos-Peñafiel, C.O. (2016). Iron Deficiency Anaemia. *Revista Médica Del Hospital General de México*, 79(2), 88-97.
- Bennet, M., & Gilroy, D. W. (2016). Lipid Mediators in Inflammation. *Microbiology Spectrum*, 4(6). Doi: 10.1128/microbiolspec.mchd-0035-2016.
- Berger, M., Gray, J. A., & Roth, B. L. (2009). The Expanded Biology of Serotonin. *Annual Review of Medicine*, 60(1), 355-366.
- Bessette, C., Benoit, B., Sekkal, S., Bruno, J., Estienne, M., Léonil, J., ... Plaisancié, P. (2016). Protective effects of β -casofensin, a bioactive peptide from bovine β -casein, against indomethacin-induced intestinal lesions in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(4), 823–833. Doi: 10.1002/mnfr.201500680.
- Bevins, C.L., & Salzman, N.H. (2011). Paneth Cells, Antimicrobial Peptides and Maintenance of Intestinal Homeostasis. *Nat Rev Microbiol*, 9: 356-368.
- Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: Determinants of Survival and Growth in the Gut. *Am J Clin Nutr* 73(Suppl 2), S399-S405.
- Bezkorovainy, A., Grohlich, D., & Nichols, J.H. (1979). Isolation of a Glycopolypeptide Fraction with Lactobacillus bifidus Subspecies Pennsylvanicus Growth-Promoting Activity from Whole Human Milk Casein. *Am J Clin Nutr*, 32: 1428-1432.
- Bhat, Z. F., & Bhat, H. (2011). Milk and Dairy Products as Functional Foods: A Review. *International Journal of Dairy Science*, 6: 1-12.
- Bischoff, S.C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.D., Serino, M., ... Wells, J.M. (2014). Intestinal Permeability – A New Target for Disease Prevention and Therapy. *BMC Gastroenterology*, 14(1). Doi: 10.1186/s12876-014-0189-7.
- Bizzaro, N., & Antico, A. (2014). Diagnosis and Classification of Pernicious Anemia. *Autoimmunity Reviews*, 13(4-5), 565-568. Doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.042.
- Bjarnason, I., Scarpignato, C., Holmgren, E., Olszewski, M., Rainsford, K.D., & Lanas, A. (2018). Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract from Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Gastroenterology*, 154(3), 500-514.
- Blackler, R. W., Gemici, B., Manko, A., & Wallace, J. L. (2014). NSAID-Gastroenteropathy: New Aspects of Pathogenesis and Prevention. *Current Opinion in Pharmacology*, 19, 11–16. Doi: 10.1016/j.coph.2014.05.008.
- Boelsterli, U.A., Redinbo, M.R., & Saitta, K.S. (2012). Multiple NSAID-Induced Hits Injure the Small Intestine: Underlying Mechanisms and Novel Strategies. *Toxicological Sciences*, 131(2), 654-667. Doi: 10.1093/toxsci/kfs310.

- Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). The Two NF- κ B Activation Pathways and their Role in Innate and Adaptive Immunity. *Trends in Immunology*, 25(6), 280-288.
- Borchers, A.T., Selmi, C., Meyers, F.J., Keen, C.L. & Gershwin, M.E. (2009) Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* 44: 26-46.
- Borrueal, N., Carol, M., Casellas, F., Antolin, M., de Lara, F., Espin, E.,... Malagelada, J.R. (2002) Increased Mucosal Tumour Necrosis Factor Alpha Production in Crohn's Disease can be Downregulated Ex Vivo by Probiotic Bacteria. *Gut* 51: 659-664.
- Botting, R., & Ayoub, S. S. (2005). COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 72(2), 85-87. Doi: 10.1016/j.plefa.2004.10.005
- Boyle, R.J., Mah, L.J., Chen, A., Kivivuori, S., Robins-Browne, R.M., & Tang, M.L.K. (2008). Effects of Lactobacillus GG Treatment During Pregnancy on the Development of Fetal Antigen-Specific Immune Responses. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(12), 1882-1890. Doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.03100.x.
- Bradley, P. P., Priebe, D. A., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. *Journal of Investigative Dermatology*, 78(3), 206-209.
- Brash, A.R. (2001). Arachidonic Acid as a Bioactive Molecule. *J Clin Invest*, 107:1339-1345.
- Brasier, A.R. (2006). The NF- κ B Regulatory Network. *Cardiovascular Toxicology*, 6(2), 111-130. Doi: 10.1385/ct:6:2:111.
- Breder, C.D., DeWitt, D.L., & Kraig, R.P., (1995) Characterization of Inducible Cyclooxygenase in Rat Brain. *J Comp Neurol*, 355: 296-315.
- Bresci, G. (2009). Occult and Obscure Gastrointestinal Bleeding: Causes and Diagnostic Approach in 2009. *World journal of gastrointestinal endoscopy*, 1(1), 3-6.
- Brody, P. (2000). Biological Activities of Bovine Glycomacropeptide. *Br J Nutr*, 84: S39-46.
- Brune, K., & Hinz, B. (2004) The Discovery and Development of Antiinflammatory Drugs. *Arthritis Rheum*, 50(8), 2391-9.
- Bull, M.J., & Plummer, N.T (2014). Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integr Med (Encinitas)* 13: 17-22.
- Burnett, B., & Levy, P. (2012). 5-Lipoxygenase Metabolic Contributions to NSAID-Induced Organ Toxicity. *Advances in Therapy*, 29(2), 79-98.

- Cain, A.M., & Karpa, K.D. (2011). Clinical Utility of Probiotics in Inflammatory Bowel Disease. *Altern Ther Health Med* 17: 72-79.
- Camaschella, C. (2017). New Insights Into Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia. *Blood Reviews*, 31(4), 225-233. Doi: 10.1016/j.blre.2017.02.004.
- Capurso, L. (2019). Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 53: S1-S41. Doi: 10.1097/mcg.0000000000001170
- Carrasco-Pozo, C., Castillo, R. L., Beltrán, C., Miranda, A., Fuentes, J., & Gotteland, M. (2016). Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Protection by Quercetin Against Indomethacin-Induced Damage: Role of NF- κ B and Nrf2. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 27: 289-298. Doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.09.016.
- Cashman, J.N. (1996). The Mechanisms of Action of NSAIDs in Analgesia. *Drugs*, 52(Supplement 5), 13-23. Doi: 10.2165/00003495-199600525-00004.
- Castells, M. (2006). Mast Cell Mediators in Allergic Inflammation and Mastocytosis. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 26(3), 465-485.
- Chabance, B., Jollés, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, L., & Fiat, A.M. (1995). Characterization of an Antithrombotic Peptide from Kappa-Casein in Newborn Plasma After Milk Ingestion. *Br J Nutr*, 73: 583-90.
- Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J.C., Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P.,...Fiat, A.M. (1998). Casein Peptide Release and Passage to the Blood in Humans During Digestion of Milk or Yogurt. *Biochimie*, 80: 155-65.
- Chandrashekara S. (2014). Quantification of inflammation: Needs and challenges. *Internet Journal of Rheumatology and Clinical Immunology*, 2(S1), 1-7.
- Chapleau, C.E., White, R.P., & Robertson, J.T. (1980). Cerebral Vasodilation and Prostacyclin. The Effects of Aspirin and Meclofenamate in Vitro. *Journal of Neurosurgery*, 53(2), 188-192.
- Chen, L., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2006). Food Protein-Based Materials as Nutraceutical Delivery Systems. *Trends in Food Science & Technology*, 17(5), 272–283. Doi: 10.1016/j.tifs.2005.12.011.
- Chen, Q., Cao, J., Jia, Y., Liu, X., Yan, & Y., Pang, G. (2012). Modulation of Mice Fecal Microbiota by Administration of Casein Glycomacropeptide. *Microbiol Res*, 3: e3.
- Cheng, X., Gao, D.-X., Song, J.-J., Ren, F.-Z., & Mao, X.-Y. (2015). Casein Glycomacropeptide Hydrolysate Exerts Cytoprotection Against H₂O₂-Induced

- Oxidative Stress in RAW 264.7 Macrophages Via ROS-Dependent Heme Oxygenase-1 Expression. *RSC Advances*, 5(6), 4511-4523.
- Choi, G., Park, H., Kim, K., Choi, H., Jang, K., Chung, M., ... Moon, W. (2008). Increased Expression of Epidermal Growth Factor Receptor and Betacellulin During the Early Stage of Gastric Ulcer Healing. *Molecular Medicine Reports*.
- Clayburgh, D. R., Shen, L., & Turner, J. R. (2004). A Porous Defense: The Leaky Epithelial Barrier in Intestinal Disease. *Laboratory Investigation*, 84(3), 282-291.
- Collado, M. C., Jalonen, L., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2006). Protection Mechanism of Probiotic Combination Against Human Pathogens: *In Vitro* Adhesion To Human Intestinal Mucus. *Asia Pac J Clin Nutr*, 15(4), 570-575.
- Collado, M.C., Hernandez, M. & Sanz, Y. (2005) Production of Bacteriocin-Like Inhibitory Compounds by Human Fecal Bifidobacterium Strains. *J Food Prot*, 68: 1034-1040.
- Conaghan, P. (2012). A Turbulent Decade for NSAIDs: Update on Current Concepts of Classification, Epidemiology, Comparative Efficacy, and Toxicity. *Rheumatology International*, 32(6), 1491-1502.
- Cone, J. (2001). Inflammation. *The American Journal of Surgery*, 182(6), 558-562.
- Corfield, A. P. (2015). Mucins: A Biologically Relevant Glycan Barrier in Mucosal Protection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(1), 236-252.
- Cosmi, L., Maggi, L., Santarasci, V., Liotta, F., & Annunziato, F. (2013). T Helper Cells Plasticity in Inflammation. *Cytometry Part A*, 85(1), 36-42.
- Cotter, P.D., Hill, C. & Ross, R.P. (2005) Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food. *Nat Rev Microbiol*, 3: 777-788.
- Cui, Y., Zhu, C., Ming, Z., Cao, J., Yan, Y., Zhao, P., ... Chen, Q. (2017). Molecular Mechanisms by Which Casein Glycomacropeptide Maintains Internal Homeostasis in Mice with Experimental Ulcerative Colitis. *PLOS ONE*, 12(7), e0181075.
- Cummings, J. H., Antoine, J.M., Azpiroz, F., Bourdet-Sicard, R., Brandtzaeg, P., Calder, P. C., ... Watzl, B. (2004). PASSCLAIM1-Gut Health and Immunity. *European Journal of Nutrition*, 43(S2), ii118-ii173. Doi: 10.1007/s00394-004-1205-4.
- Daddaoua, A., Puerta, V., Zarzuelo, A., Suárez, M. D., Sánchez de Medina, F., & Martínez-Augustín, O. (2005). Bovine Glycomacropeptide Is Anti-Inflammatory in Rats with Hapten-Induced Colitis. *The Journal of Nutrition*, 135(5), 1164-1170.

- Dauphinee, S. M., & Karsan, A. (Ed). (2010). *Endothelial Dysfunction and Inflammation*. Basel, Switzerland: Editorial Birkhäuser.
- Davies, N. M., & Wallace, J. L. (1997). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Gastrointestinal Toxicity: New Insights into an Old Problem. *Journal of Gastroenterology*, 32(1), 127-133. Doi: 10.1007/bf01213310.
- Davies, P., Bailey, P.J., Goldenberg, M.M., & Ford-Hutchinson, A.W. (1984). The Role of Arachidonic Acid Oxygenation Products in Pain and Inflammation. *Ann Rev Immunol*, 2: 335-357.
- De Vos, P., Mujagic, Z., de Haan, B. J., Siezen, R. J., Bron, P. A., Meijerink, M., ... Troost, F. J. (2017). Lactobacillus plantarum Strains Can Enhance Human Mucosal and Systemic Immunity and Prevent Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Induced Reduction in T Regulatory Cells. *Frontiers in Immunology*, 8.
- Dembic, Z. (2015). Cytokines of the Immune System. *The Cytokines of the Immune System*, 241–262. Doi: 10.1016/b978-0-12-419998-9.00007-9
- Dennis, E. A., & Norris, P. C. (2015). Eicosanoid Storm in Infection and Inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, 15(8), 511-523.
- Deplancke, B., & Gaskins, H. R. (2001). Microbial Modulation of Innate Defense: Goblet Cells and the Intestinal Mucus Layer. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 1131S-1141S.
- Dharmani, P., De Simone, C., & Chadee, K. (2013). The Probiotic Mixture VSL#3 Accelerates Gastric Ulcer Healing by Stimulating Vascular Endothelial Growth Factor. *PLoS ONE*, 8(3), e58671. Doi: 10.1371/journal.pone.0058671.
- Dinarello, C. A. (2017). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews*, 281(1), 8-27. Doi: 10.1111/imr.12621
- Donkor, O. N., Ravikumar, M., Proudfoot, O., Day, S. L., Apostolopoulos, V., Paukovics, G., ... Gill, H. (2012). Cytokine profile and induction of T helper type 17 and regulatory T cells by human peripheral mononuclear cells after microbial exposure. *Clinical & Experimental Immunology*, 167(2), 282–295.
- DuBois, R.N., & Smalley, W.E. (1996). Cyclooxygenase, NSAIDs, and Colorectal Cancer. *Journal of Gastroenterology*, 31(6), 898-906. Doi: 10.1007/bf02358623.
- Dvory-Sobol, H., Cohen-Noyman, E., Kazanov, D., Figer, A., Birkenfeld, S., Madar-Shapiro, L., ... Arber, N. (2006). Celecoxib leads to G2/M arrest by induction of p21 and down-regulation of cyclin B1 expression in a p53-independent manner. *European Journal of Cancer*, 42(3), 422–426. Doi: 10.1016/j.ejca.2005.11.009

- Espin, J. C., Garcia-Conesa, M. T., & Tomas-Barberan, F. A. (2007). Nutraceuticals: Facts and Fiction. *Phytochemistry*, 68: 2986-3008.
- Fava, F., & Danese, S. (2011). Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease: Friend of Foe? *World Journal of Gastroenterology*, 17(5), 557-566.
- Ferrer, R., & Moreno, J. J. (2010). Role of eicosanoids on intestinal epithelial homeostasis. *Biochemical Pharmacology*, 80(4), 431-438. Doi: 10.1016/j.bcp.2010.04.033
- Filaretova, L. P., Bagaeva, T. R., Morozova, O. Y., & Zelena, D. (2011). The Healing of NSAID-Induced Gastric Lesion may be Followed by Small Intestinal and Cardiovascular Side Effects. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 62 (6), 619-625.
- Fiorucci, S., Antonelli, E., Distrutti, E., Rizzo, G., Mencarelli, A., Orlandi, S., ... Wallace, J. L. (2005). Inhibition of Hydrogen Sulfide Generation Contributes to Gastric Injury Caused by Anti-Inflammatory Nonsteroidal Drugs. *Gastroenterology*, 129(4), 1210-1224. Doi: 10.1053/j.gastro.2005.07.060
- FitzGerald, G. A., & Patrono, C. (2001). The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. *New England Journal of Medicine*, 345(6), 433-442.
- Flach, J., van der Waal, M. B., Kardinaal, A. F. M., Schloesser, J., Ruijschop, R. M. A. J., & Claassen, E. (2018). Probiotic research priorities for the healthy adult population: A review on the health benefits of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* BB-12. *Cogent Food & Agriculture*, 4(1).
- Fong, F.L.Y., Kirjavainen, P., Wong, V.H.Y., & El-Nezami, H. (2015). Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on Dendritic Cells, Macrophages and Monocytes from Healthy Donors. *Journal of Functional Foods*, 13: 71-79.
- Fornai, M., Antonioli, L., Colucci, R., Pellegrini, C., Giustarini, G., Testai, L., ... Blandizzi, C. (2013). NSAID-Induced Enteropathy: Are the Currently Available Selective COX-2 Inhibitors All the Same? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 348(1), 86-95. Doi: 10.1124/jpet.113.207118.
- Fornai, M., Antonioli, L., Pellegrini, C., Colucci, R., Sacco, D., Tirota, E., ... Scarpignato, C. (2016). Small Bowel Protection Against NSAID-Injury in Rats: Effect of Rifaximin, a Poorly Absorbed, GI Targeted, Antibiotic. *Pharmacological Research*, 104, 186-196.
- France, M. M., & Turner, J. R. (2017). The Mucosal Barrier at a Glance. *Journal of Cell Science*, 130(2), 307-314. Doi: 10.1242/jcs.193482.

- Frölich, J. (1997). A Classification of NSAIDs According to the Relative Inhibition of Cyclooxygenase Isoenzymes. *Trends in Pharmacological Sciences*, 18(1), 30-34.
- Fukumoto, K., Naito, Y., Takagi, T., Yamada, S., Horie, R., Inoue, K., ...Yoshikawa, T. (2011). Role of Tumor Necrosis Factor- α in the Pathogenesis of Indomethacin-Induced Small Intestinal Injury in Mice. *International Journal of Molecular Medicine*, 27(3). Doi: 10.3892/ijmm.2011.602.
- Fuller R. (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Gabay, C., & Kushner, I. (1999). Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *New England Journal of Medicine*, 340(6), 448-454.
- Ghosh, S., & Hayden, M.S. (2008). New Regulators of NF- κ B in Inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 8(11), 837-848. Doi: 10.1038/nri2423.
- Ghosh, S., & Karin, M. (2002). Missing Pieces in the NF- κ B Puzzle. *Cell*, 109(2), S81-S96.
- Ghosh, S., May, M.J., & Kopp, E, B. (1998). NF- κ B and Rel Proteins: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-60.
- Grace, R.F., Lin, Y., Edwards, S.R., Power, I., & Mather, L.E. (2001). Effects of Diclofenac in the Rat Tail Ischaemia–Reperfusion Injury Model of Acute Hyperalgesia. *Pain*, 89(2), 117-125. Doi: 10.1016/s0304-3959(00)00372-9.
- Grajek, W., Olejnik, A., & Sip, A. (2005). Probiotics, Prebiotics and Antioxidants as Functional Foods. *Acta Biochemical Polonica*, 52: 665-71.
- Granato, D., Branco, G.F., Cruz, A.G., Faria, J. de A.F., & Shah, N.P. (2010). Probiotic Dairy Products as Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 455-470. Doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x.
- Groschwitz, K.R. & Hogan, S.P. (2009). Intestinal Barrier Function: Molecular Regulation and Disease Pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, 124: 3-22.
- Gudis, K., & Sakamoto, C. (2005). The Role of Cyclooxygenase in Gastric Mucosal Protection. *Digestive Diseases and Sciences*, 50 (1), S16-S23.
- Gul, K., Singh, A. K., & Jabeen, R. (2015). Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(16), 2617-2627. Doi: 10.1080/10408398.2014.903384
- Hagiwara, M., Kataoka, K., Arimochi, H., Kuwahara, T., & Ohnishi, Y. (2004). Role of Unbalanced Growth of Gram-Negative Bacteria in Ileal Ulcer Formation in Rats

- Treated with a Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug. *The Journal of Medical Investigation*, 51(1-2), 43-51. Doi: 10.2152/jmi.51.43.
- Hahn D.W., Carraher, R., & McGuire, J.L. (1982). Effects of Suprofen and Other Prostaglandin Synthetase Inhibitors in a New Animal Model Formyometrial Hyperactivity. *Prostaglandins*, 23(1), 1-16.
- Hansson, G., Libby, P., Schönbeck, U., & Yan, Z. (2002). Innate and Adaptive Immunity in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation Research*, 91(4), 281-91.
- Hansson, G.C. (2012). Role of Mucus Layers in Gut Infection and Inflammation. *Current Opinion in Microbiology*, 15(1), 57-62. Doi: 10.1016/j.mib.2011.11.002.
- Harris, R.C., McKanna, J.A., Akai, Y., Jacobson, H.R., DuBois, R.N., & Breyer, M.D. (1994). Cyclooxygenase-2 is Associated with the Macula Densa of Rat Kidney and Increases with Salt Restriction. *J Clin Invest*, 94: 2504-2510.
- Hart, A.L., Lammers, K., Brigidi, P., Vitali, B., Rizzello, F., Gionchetti, P., ... Stagg, A.J (2004) Modulation of Human Dendritic Cell Phenotype and Function by Probiotic Bacteria. *Gut*, 53: 1602-1609.
- Hartsock, A., & Nelson, W.J. (2008). Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(3), 660-669. Doi: 10.1016/j.bbamem.2007.07.012.
- Hasler, C.M. (2002). Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges - A Position Paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of Nutrition*, 132(12), 3772-3781. Doi: 10.1093/jn/132.12.3772.
- Hawcroft, G., D'Amico, M., Albanese, C., Markham, A.F., Pestell, R.G., & Hull, M.A. (2002). Indomethacin Induces Differential Expression of β -catenin, γ -catenin and T-cell Factor Target Genes in Human Colorectal Cancer Cells. *Carcinogenesis*, 23(1), 107-114.
- Hawkey, C. (1999). COX-2 Inhibitors. *The Lancet*, 353(9149), 307-314. Doi: 10.1016/s0140-6736(98)12154-2.
- Hayashi, S., Kurata, N., Yamaguchi, A., Amagase, K., & Takeuchi, K. (2014). Lubiprostone Prevents Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Small Intestinal Damage by Suppressing the Expression of Inflammatory Mediators via EP4 Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 349(3), 470-479.
- Headland, S. E., & Norling, L. V. (2015). The Resolution of Inflammation: Principles and Challenges. *Seminars in Immunology*, 27(3), 149-160.

- Hermes, R.G., Molist, F., Perez, J.F., Gómez de Segura, A., Ywazaki, M., Davin, R.,... Martín-Orúe, S.M. (2013). Casein Glycomacropeptide in the Diet May Reduce Escherichia coli Attachment to the Intestinal Mucosa and Increase the Intestinal Lactobacilli of Early Weaned Piglets After an Enterotoxigenic E. coli K88 Challenge. *Br J Nutr*, 109: 1001-1012.
- Higashiyama, M., Hokari, R., Kurihara, C., Ueda, T., Watanabe, C., Tomita, K., ... Miura, S. (2012). Indomethacin-induced small intestinal injury is ameliorated by cilostazol, a specific PDE-3 inhibitor. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 47(8-9), 993-1002. Doi: 10.3109/00365521.2012.690043.
- Higuchi, K., Umegaki, E., Watanabe, T., Yoda, Y., Morita, E., Murano, M., ... Arakawa, T. (2009). Present Status and Strategy of NSAIDs-Induced Small Bowel Injury. *Journal of Gastroenterology*, 44(9), 879-888. Doi: 10.1007/s00535-009-0102-2.
- Hirst, B. H. (2011). The Gastric Mucosal Barrier. *Comprehensive Physiology*.
- Holdsworth, S. R., & Gan, P.-Y. (2015). Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(12), 2243-2254.
- Hong, W.S., Chen, Y.P., & Chen, M.J. (2010). The Antiallergic Effect of Kéfir Lactobacilli. *J Food Sci*, 75: H244-H253.
- Hvas, C. L., Dige, A., Bendix, M., Wernlund, P. G., Christensen, L. A., Dahlerup, J. F., & Agnholt, J. (2016). Casein glycomacropeptide for active distal ulcerative colitis: a randomized pilot study. *European Journal of Clinical Investigation*, 46(6), 555-563.
- Ishiguro, H., & Kawahara, T. (2014). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Prostatic Diseases. *BioMed Research International*, 2014: 6.
- Isoda, H., Kawasaki, Y., Tanimoto, M., Dosako, S., & Idota, T. (1999). Use of Compounds Containing or Binding Sialic Acid to Neutralize Bacterial Toxins. *European Patent*, 385: 118.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., & Salminen, S. (2001). Probiotics: Effects on Immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 444s-450s.
- Jiménez, M., Chávez, N., & Salinas, E. (2012). Pretreatment with Glycomacropeptide Reduces Allergen Sensitization, Alleviates Immediate Cutaneous Hypersensitivity and Protects from Anaphylaxis. *Clin Exp Immunol*, 170: 18-27.
- Jiménez, M., Cervantes-García, D., Muñoz, Y.H., García, A., Haro, L.M.Jr., & Salinas, E. (2016). Novel Mechanisms Underlying the Therapeutic Effect of

- Glycomacropeptide on Allergy; Change in Gut Microbiota, Upregulation of TGF- β and Inhibition of Mast Cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 171(3-4), 217-226.
- Jin, L., Batra, S., Douda, D. N., Palaniyar, N., & Jeyaseelan, S. (2014). CXCL1 Contributes to Host Defense in Polymicrobial Sepsis via Modulating T Cell and Neutrophil Functions. *The Journal of Immunology*, 193(7), 3549-3558.
- Jones, R. (2001). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Prescribing: Past, Present, and Future. *The American Journal of Medicine*, 110(1), S4-S7.
- Kakimoto, K., Takai, S., Murano, M., Ishida, K., Yoda, Y., Inoue, T., ... Higuchi, K. (2009). Significance of Chymase-Dependent Matrix Metalloproteinase-9 Activation on Indomethacin-Induced Small Intestinal Damages in Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(2), 684-689.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., & Isolauri, E. (2001). Probiotics in Primary Prevention of Atopic Disease: A Randomised Placebo-Controlled Trial. *The Lancet*, 357(9262), 1076-1079.
- Kamei, K., Kubo, Y., Kato, N., Hatazawa, R., Amagase, K., & Takeuchi, K. (2008). Prophylactic Effect of Irsogladine Maleate 624 Against Indomethacin-Induced Small Intestinal Lesions in Rats. *Dig Dis Sci*, 53: 2657-2666.
- Kamil, R., Geier, M. S., Butler, R. N., & Howarth, G. S. (2007). Lactobacillus rhamnosus GG Exacerbates Intestinal Ulceration in a Model of Indomethacin-Induced Enteropathy. *Digestive Diseases and Sciences*, 52 (5), 1247-1252.
- Kanekanian, A. (2014). The Health Benefits of Bioactive Compounds from Milk and Dairy Products. *Milk and Dairy Products as Functional Foods*, 1-22.
- Karin, M., Lawrence, T., & Nizet, V. (2006). Innate Immunity Gone Awry: Linking Microbial Infections to Chronic Inflammation and Cancer. *Cell*, 124(4), 823-835.
- Kato, S., Aihara, E., Yoshii, K., & Takeuchi, K. (2005). Dual action of prostaglandin E2 on gastric acid secretion through different EP-receptor subtypes in the rat. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(1), G64-G69.
- Kato, S., Ohkawa, F., Ito, Y., Amagase, K., & Takeuchi, K. (2009). Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Aggravation of Indomethacin-Induced Gastric Damage in Adjuvant Arthritic Rats. *J Physiol Pharmacol*, 60: 147-155.
- Kaumann, A., & Levy, F. (2006). 5-Hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(3), 674-706.

- Kawahara, R., Yasuda, M., Hashimura, H., Amagase, K., Kato, S., & Takeuchi, K. (2011). Activation of Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors Ameliorates Indomethacin-Induced Small Intestinal Ulceration in Mice. *Eur J Pharmacol*, 650: 411-417.
- Kawano, S., & Tsuji, S. (2000). Role of mucosal blood flow: A conceptual review in gastric mucosal injury and protection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15(s1), 1-6. Doi: 10.1046/j.1440-1746.2000.02142.x
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*, 5. Doi:10.3389/fimmu.2014.00461
- Khoder, G., Menhali, A., Yassir, F., & Karam, S. (2016). Potential Role of Probiotics in the Management of Gastric Ulcer (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(1), 3-17. Doi: 10.3892/etm.2016.3293
- Kim, J.W., Jeon, W.K., Yun, J.W., Park, D.I., Cho, Y.K, Sung, I.K.,... Shin, M.S. (2005). Protective Effects of Bovine Colostrum on Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Induced Intestinal Damage in Rats. *Asia Pac J Clin Nutr*, 14 (1), 103-7.
- Kirkby, N. S., Lundberg, M. H., Harrington, L. S., Leadbeater, P. D., Milne, G. L., Potter, C. M., ...Mitchell, J. A. (2012). Cyclooxygenase-1, not Cyclooxygenase-2, is Responsible for Physiological Production of Prostacyclin in the Cardiovascular System. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(43), 17597-602.
- König, J., Wells, J., Cani, P. D., García-Ródenas, C. L., MacDonald, T., Mercenier, A., ... Brummer, R.-J. (2016). Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 7(10), e196-e196.
- Konturek, S. J., Konturek, P. C., Pawlik, T., Sliwowski, Z., Ochmański, W., & Hahn, E. G. (2004). Duodenal Mucosal Protection by Bicarbonate Secretion and its Mechanisms. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 55: 5-17.
- Kopp, M. V., Hennemuth, I., Heinzmann, A., & Urbanek, R. (2008). Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Probiotics for Primary Prevention: No Clinical Effects of Lactobacillus GG Supplementation. *Pediatrics*, 121(4), e850-e856.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-Derived Bioactive Peptides - Opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297-1308.
- Kowalski, M., & Makowska, J. (2015). Seven Steps to the Diagnosis of NSAIDs Hypersensitivity: How to Apply a New Classification in Real Practice? *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 7(4), 312-20.

- Kwak, D. S., Lee, O. Y., Lee, K. N., Jun, D. W., Lee, H. L., Yoon, B. C., & Choi, H. S. (2016). The Effect of DA-6034 on Intestinal Permeability in an Indomethacin-Induced Small Intestinal Injury Model. *Gut Liver*, 10(3): 406-11.
- Laine, L., Takeuchi, K., & Tarnawski, A. (2008). Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. *Gastroenterology*, 135(1), 41-60.
- Lam, E. K., Yu, L., Wong, H. P., Wu, W. K., Shin, V. Y., Tai, E. K., ... Cho, C. H. (2007). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG Enhances Gastric Ulcer Healing in Rats. *Eur J Pharmacol*, 565: 171-179.
- Lanas, A., Benito, P., Alonso, J., Hernández-Cruz, B., Barón-Esquivias, G., Perez-Aísa, Á., ... Gonzalez-Juanatey, J. R. (2014). Recomendaciones para una Prescripción Segura de Antiinflamatorios no Esteroides: Documento de Consenso Elaborado por Expertos Nominados por 3 Sociedades Científicas (SER-SEC-AEG). *Reumatología Clínica*, 10(2), 68-84. Doi: 10.1016/j.reuma.2013.10.004.
- Lee, S. H., Soyoola, E., Chanmungam, P., Hart, S., Sun, W., Zhong, H., ... Hwang, D. (1992). Selective Expression of Mitogen Inducible Cyclooxygenase in Macrophages Stimulated with Lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, 267: 25943-25948.
- Lesurtel, M., Soll, C., Graf, R., & Clavien, P.-A. (2007). Role of Serotonin in the Hepato-GastroIntestinal Tract: An Old Molecule for New Perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(6), 940-952. Doi: 10.1007/s00018-007-7377-3.
- Levitt, D., & Levitt, M. (2017). Protein Losing Enteropathy: Comprehensive Review of the Mechanistic Association with Clinical and Subclinical Disease States. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 10: 147-168. Doi: 10.2147/ceg.s136803.
- Ley, K. (2008). The Microcirculation in Inflammation. *Microcirculation*, 387-448.
- Li, E. W. Y., & Mine, Y. (2004). Immunoenhancing Effects of Bovine Glycomacropeptide and Its Derivatives on the Proliferative Response and Phagocytic Activities of Human Macrophagelike Cells, U937. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2704-2708. Doi: 10.1021/jf0355102.
- Li, T., Chen, B., Du, M., Song, J., Cheng, X., Wang, X., & Mao, X. (2017). Casein Glycomacropeptide Hydrolysates Exert Cytoprotective Effect against Cellular Oxidative Stress by Up-Regulating HO-1 Expression in HepG2 Cells. *Nutrients*, 9(1), 31. Doi: 10.3390/nu9010031.
- Lichtenberger, L. M. (2001). Where is the Evidence that Cyclooxygenase Inhibition is the Primary Cause of Non-Steroidal Antiinflammatory Drug (NSAID)-Induced

- Gastrointestinal Injury? Topical Injury Revisited. *Biochemical Pharmacology*, 61 (6), 631-637.
- Lim, Y. J., & Chun, H. J. (2013). Recent Advances in NSAIDs-Induced Enteropathy Therapeutics: New Options, *New Challenges. Gastroenterology Research and Practice*, 2013: 1-7. Doi:10.1155/2013/761060.
- Lin, Y. P., Thibodeaux, C. H., Peña, J. A., Ferry, G. D., & Versalovic, J. (2008). Probiotic *Lactobacillus reuteri* Suppress Proinflammatory Cytokines Via c-Jun. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(8), 1068-1083. Doi: 10.1002/ibd.20448.
- Linden, S. K., Sutton, P., Karlsson, N. G., Korolik, V., & McGuckin, M. A. (2008). Mucins in the Mucosal Barrier to Infection. *Mucosal Immunology*, 1(3), 183-197.
- Liu, G.-Y., Hung, Y.-C., Hsu, P.-C., Liao, Y.-F., Chang, W.-H., Tsay, G. J., & Hung, H.-C. (2005). Ornithine Decarboxylase Prevents Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Apoptosis by Decreasing Intracellular Reactive Oxygen Species. *Apoptosis*, 10(3), 569–581. Doi: 10.1007/s10495-005-1891-2.
- Lonigro, A. J., Hagemann, M. H., Stephenson, A. H., & Fry, C. L. (1978). Inhibition of Prostaglandin Synthesis by Indomethacin Augments the Renal Vasodilator Response to Bradykinin in the Anesthetized Dog. *Circulation Research*, 43(3), 447-455. Doi: 10.1161/01.res.43.3.447.
- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(4), 189–195.
- López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433-30437.
- López-Posadas, R., Requena, P., González, R., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Sánchez de Medina, F., & Martínez-Augustín, O. (2010). Bovine Glycomacropeptide Has Intestinal Antiinflammatory Effects in Rats with Dextran Sulfate-Induced Colitis. *The Journal of Nutrition*, 140(11), 2014-2019. Doi: 10.3945/jn.109.118448.
- López-Varela, S., González-Gross, M., & Marcos, A. (2002). Functional Foods and the Immune System: A Review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(S3), S29-S33.
- Lovejoy, F. H. Jr. (1978). Aspirin and Acetaminophen: A Comparative View of their Antipyretic and Analgesic Activity. *Pediatrics*, 62(5), 904-909.
- Lucas, S. (2016). The Pharmacology of Indomethacin. Headache: *The Journal of Head and Face Pain*, 56(2), 436-446. Doi: 10.1111/head.12769.

- Lué, A., & Lanás, A. (2016). Protons Pump Inhibitor Treatment and Lower Gastrointestinal Bleeding: Balancing Risks and Benefits. *World Journal of Gastroenterology*, 22(48), 10477. Doi: 10.3748/wjg.v22.i48.10477.
- Lundgren, O., Jodal, M., Jansson, M., Ryberg, A. T., & Svensson, L. (2011). Intestinal Epithelial Stem/Progenitor Cells Are Controlled by Mucosal Afferent Nerves. *PLoS ONE*, 6(2). Doi: 10.1371/journal.pone.0016295
- Luoto, R., Isolauri, E., & Lehtonen, L. (2010). Safety of LactobacillusGG Probiotic in Infants with Very Low Birth Weight: Twelve Years of Experience. *Clinical Infectious Diseases*, 50(9), 1327-1328. Doi: 10.1086/651694.
- Luster A. D., & Maclean, J. (2001). Chemokines and Chemokine Receptors. En K. Ley (ed). *Physiology of Inflammation* (pp. 90-110). New York, E. U. A: Springer.
- Mahadevan, V. (2014). Anatomy of the stomach. *Surgery (Oxford)*, 32(11), 571-574.
- Mahajan, B., & Singh, V. (2014). Recent Trends in Probiotics and Health Management: A Review. *Vinod S, IJPSR*, 5(5), 1643-1652.
- Mahdy, A. M., & Webster, N. R. (2011). Histamine and Antihistamines. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 12(7), 324-329.
- Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpoulou, G., Tsakalidou, E., ... De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*, 157(3), 241-247. Doi: 10.1016/j.resmic.2005.09.002
- Malin, M., Verronen, P., Mykkänen, H., Salminen, S., & Isolauri, E. (1996). Increased Bacterial Urease Activity in Faeces in Juvenile Chronic Arthritis: Evidence of Altered Intestinal Microflora? *Rheumatology*, 35(7), 689-694.
- Manzoni, P., Lista, G., Gallo, E., Marangione, P., Priolo, C., Fontana, P., ... Farina, D. (2011). Routine Lactobacillus rhamnosus GG Administration in VLBW Infants: A Retrospective, 6-year Cohort Study. *Early Human Development*, 87: S35-S38.
- Markiewski, M. M., & Lambris, J. D. (2007). The Role of Complement in Inflammatory Diseases From Behind the Scenes into the Spotlight. *The American Journal of Pathology*, 171(3), 715-727.
- Massó González, E. L., Patrignani, P., Tacconelli, S., & Rodríguez, L. A. G. (2010). Variability among nonsteroidal antiinflammatory drugs in risk of upper gastrointestinal bleeding. *Arthritis & Rheumatism*, 62(6), 1592-1601.

- Matsui, H., Shimokawa, O., Kaneko, T., Nagano, Y., Rai, K., & Hyodo, I. (2011). The Pathophysiology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAID)-Induced Mucosal Injuries in Stomach and Small Intestine. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 48(2), 107–111. Doi: 10.3164/jcbrn.10-79.
- Matsumoto, S., Hara, T., Hori, T., Mitsuyama, K., Nagaoka, M., Tomiyasu, N., ... Sata, M. (2005). Probiotic Lactobacillus-Induced Improvement in Murine Chronic Inflammatory Bowel Disease is Associated with the Down-Regulation of Pro-Inflammatory Cytokines in Lamina Propria Mononuclear Cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 140(3), 417-426.
- McCarthy, J. (2003). Double Blind, Placebo Controlled Trial of Two Probiotic Strains in Interleukin 10 Knockout Mice and Mechanistic Link with Cytokine Balance. *Gut*, 52(7), 975-980. Doi: 10.1136/gut.52.7.975.
- McCarthy, R., Mills, S., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2014). Bioactive Peptides from Casein and Whey Proteins. *Milk and Dairy Products as Functional Foods*: 23-54. Doi: 10.1002/9781118635056.ch2.
- McInnes, I. B. (2017). Cytokines. *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*, 396-407. Doi: 10.1016/b978-0-323-31696-5.00026-7.
- Medzhitov R. (2008). Origin and Physiological Roles of Inflammation. *Nature* 454:428-35.
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, 140(6), 771-776. Doi: 10.1016/j.cell.2010.03.006.
- Mei, Q., Diao, L., Xu, J., Liu, X., & Jin, J. (2011). A Protective Effect of Melatonin on Intestinal Permeability is Induced by Diclofenac Via Regulation of Mitochondrial Function in Mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(4), 495-502. Doi: 10.1038/aps.2010.225.
- Meşe, G., Richard, G., & White, T. W. (2007). Gap Junctions: Basic Structure and Function. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11), 2516-2524.
- Mikkelsen, T. L., Rasmussen, E., Olsen, A., Barkholt, V., & Frøkiær, H. (2006). Immunogenicity of κ -Casein and Glycomacropeptide. *Journal of Dairy Science*, 89(3), 824-830. Doi: 10.3168/jds.s0022-0302(06)72145-2.
- Miyoshi, H., VanDussen, K. L., Malvin, N. P., Ryu, S. H., Wang, Y., Sonnek, N. M., ... Stappenbeck, T. S. (2016). Prostaglandin E2 promotes intestinal repair through an adaptive cellular response of the epithelium. *The EMBO Journal*, 36(1), 5–24.

- Mohajer, B., & Ma, T. Y. (2000). Eicosanoids and the small intestine. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 61(3-4), 125-143. Doi: 10.1016/s0090-6980(00)00068-x
- Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L., & Gwaltney-Brant, S. M. (2008). Serotonin: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31(3), 187-199.
- Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., & Sahu, P. S. (2016). Milk Derived Bioactive Peptides and their Impact on Human Health – A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), 577-583. Doi: 10.1016/j.sjbs.2015.06.005.
- Mollace, V. (2005). Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors. *Pharmacological Reviews*, 57(2), 217-252. Doi: 10.1124/pr.57.2.1
- Monnai, M., & Otani, H. (1997). Effect of Bovine kappa-caseinoglycopeptide on Secretion of Interleukin-1 Family Cytokines by P388D1 Cells, a Line Derived from Mouse Monocyte/Macrophage. *Milchwissenschaft*, 52(4): 192-196.
- Montalto, M., Gallo, A., Gasbarrini, A., & Landolfi, R. (2012). NSAID Enteropathy: Could Probiotics Prevent It? *Journal of Gastroenterology*, 48(6), 689–697.
- Moran, G. W., Leslie, F. C., Levison, S. E., & McLaughlin, J. T. (2008). Enteroendocrine Cells: Neglected Players in Gastrointestinal Disorders? *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 1(1), 51–60.
- Morimoto, A., Murakami, N., & Watanabe, T. (1988). Effect of Prostaglandin E2 on Thermoresponsive Neurons in the Preoptic and Ventromedial Hypothalamic Regions of Rats. *The Journal of Physiology*, 405(1), 713-725.
- Morris, A. J., Wasson, L. A., & MacKenzie, J. F. (1992). Small Bowel Enteroscopy in Undiagnosed Gastrointestinal Blood Loss. *Gut*, 33(7), 887–889.
- Mótyán, J., Tóth, F., & Tózsér, J. (2013). Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules*, 3(4), 923-942. Doi: 10.3390/biom3040923.
- Mountzouris, K. C., McCartney, A. L., & Gibson, G. R. (2002). Intestinal Microflora of Human Infants and Current Trends for its Nutritional Modulation. *British Journal of Nutrition*, 87(05), 405-420. Doi: 10.1079/bjn2002563.
- Mowat, A. M. (2003). Anatomical Basis of Tolerance and Immunity to Intestinal Antigens. *Nature Reviews Immunology*, 3(4), 331-341. Doi: 10.1038/nri1057.
- Mukai, T., Kaneko, S., Matsumoto, M., & Ohori, H. (2004). Binding of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus reuteri to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), 357-362. Doi: 10.1016/s0168-1605(03)00317-9

- Mukherjee, D., Nissen, S. E., & Topol, E. J. (2001). Risk of Cardiovascular Events Associated with Selective COX-2 Inhibitors. *JAMA*, 286(8), 954-959.
- Muñoz, F., Cervantes, M., Cervantes-García, D., Jiménez, M., Ventura-Juárez, J., & Salinas, E. (2017). Glycomacropeptide Attenuates Inflammation, Pruritus, and Th2 Response Associated with Atopic Dermatitis Induced by 2,4-Dinitrochlorobenzene in Rat. *Journal of Immunology Research*: 1-11.
- Muraki, M., Fujiwara, Y., Machida, H., Okazaki, H., Sogawa, M., Yamagami, H., ... Arakawa, T. (2014). Role of Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Severe Small Intestinal Damage in Chronic Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Users. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 49(3), 267-273. Doi: 10.3109/00365521.2014.880182.
- Nagai, K., Ueno, Y., Tanaka, S., Hayashi, R., Shinagawa, K., & Chayama, K. (2017). Polysaccharides derived from Ganoderma lucidum fungus mycelia ameliorate indomethacin-induced small intestinal injury via induction of GM-CSF from macrophages. *Cellular Immunology*, 320: 20-28.
- Nagano, Y., Matsui, H., Muramatsu, M., Shimokawa, O., Shibahara, T., Yanaka, A., ... Nakamura, Y. (2005). Rebamipide Significantly Inhibits Indomethacin-Induced Mitochondrial Damage, Lipid Peroxidation, and Apoptosis in Gastric Epithelial RGM-1 Cells. *Digestive Diseases and Sciences*, 50(S1), S76-S83.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420:846-52.
- Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving Inflammation. *Cell*, 140(6), 871-882.
- Nguyen, T., Chai, J., Li, A., Akahoshi, T., Tanigawa, T., & Tarnawski, A. S. (2007). Novel Roles of Local Insulin-Like Growth Factor-1 Activation in Gastric Ulcer Healing. *The American Journal of Pathology*, 170(4), 1219-1228.
- Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., Ling, K. L., & Wolff, S. P. (1996). Low-Density Lipoprotein is the Major Carrier of Lipid Hydroperoxides in Plasma. Relevance to Determination of Total Plasma Lipid Hydroperoxide Concentrations. *The Biochemical journal*, 313 (Pt 3), 781-6.
- Odenwald, M. A., & Turner, J. R. (2013). Intestinal Permeability Defects: Is it Time to Treat? Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice *Journal of the American Gastroenterological Association*, 11(9), 1075-1083.
- Orlando, A., Linsalata, M., Bianco, G., Notarnicola, M., D'Attoma, B., Scavo, M., ... Russo, F. (2018). Lactobacillus rhamnosus GG Protects the Epithelial Barrier of Wistar

- Rats from the Pepsin-Trypsin-Digested Gliadin (PTG)-Induced Enteropathy. *Nutrients*, 10(11), 1698. Doi: 10.3390/nu10111698.
- Ortega-González, M., Capitán-Cañadas, F., Requena, P., Ocón, B., Romero-Calvo, I., Aranda, C.,...Martínez-Augustin, O. (2013). Validation of Bovine Glycomacropeptide as an Intestinal Anti-Inflammatory Nutraceutical in the Lymphocyte-Transfer Model of Colitis. *British Journal of Nutrition*, 111(07), 1202-1212.
- Ortega-González, M., Capitán-Cañadas, F., Requena, P., Ocón, B., Romero-Calvo, I., Aranda, C., ... Martínez-Augustin, O. (2013). Validation of bovine glycomacropeptide as an intestinal anti-inflammatory nutraceutical in the lymphocyte-transfer model of colitis. *British Journal of Nutrition*, 111(07), 1202–1212. Doi: 10.1017/s0007114513003590
- Otani, H., & Monnai, M. (1995). Induction of an Interleukin-1 Receptor Antagonist-like Component Produced from Mouse Spleen Cells by Bovine κ -Caseinoglycopeptide. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(6), 1166-1168.
- Otani, H., Horimoto, Y., & Monnai, M. (1996). Suppression of Interleukin-2 Receptor Expression on Mouse CD4+T Cells by Bovine κ -Caseinoglycopeptide. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(6), 1017-1019. Doi: 10.1271/bbb.60.1017.
- Otani, K., Tanigawa, T., Watanabe, T., Shimada, S., Nadatani, Y., Nagami, Y., ... Arakawa, T. (2017). Microbiota Plays a Key Role in Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Small Intestinal Damage. *Digestion*, 95(1), 22-28. Doi: 10.1159/000452356.
- Ouyang, W., Kolls, J. K., & Zheng, Y. (2008). The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity*, 28(4), 454-467.
- Pai, R., Soreghan, B., Szabo, I. L., Pavelka, M., Baatar, D., & Tarnawski, A. S. (2002). Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: A novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nature Medicine*, 8(3), 289-293. Doi: 10.1038/nm0302-289
- Pai, R., Soreghan, B., Szabo, I. L., Pavelka, M., Baatar, D., & Tarnawski, A. S. (2002). Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: A novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nature Medicine*, 8(3), 289-293. Doi: 10.1038/nm0302-289

- Pathmakanthan, S., Li, C. K., Cowie, J., & Hawkey, C. J. (2004). Lactobacillus plantarum 299: Beneficial In Vitro Immunomodulation in Cells Extracted from Inflamed Human Colon. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 19(2), 166-173.
- Pearce, F. L. (1991). Biological effects of histamine: An overview. *Agents and Actions*, 33(1-2), 4-7. Doi:10.1007/bf01993112
- Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., ... Cassatella, M. A. (2009). Evidence for a Cross-Talk Between Human Neutrophils and Th17 Cells. *Blood*, 115(2), 335-343. Doi: 10.1182/blood-2009-04-216085.
- Pena, J. A., & Versalovic, J. (2003). Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF-alpha production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cellular Microbiology*, 5(4), 277-285.
- Peña, J. A., & Versalovic, J. (2003). Lactobacillus rhamnosus GG Decreases TNF-alpha Production in Lipopolysaccharide-Activated Murine Macrophages by a Contact-Independent Mechanism. *Cellular Microbiology*, 5(4), 277-285.
- Peskar, B. M. (2001). Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense. *J Physiol Pharmacol*, 52: 555-568.
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal Epithelial Cells: Regulators of Barrier Function and Immune Homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 141-153.
- Pozzoli, C., Menozzi, A., Grandi, D., Solenghi, E., Ossiprandi, M. C., Zullian, C., ... Coruzzi, G. (2006). Protective Effects of Proton Pump Inhibitors Against Indomethacin-Induced Lesions in the Rat Small Intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 374(4), 283-291. Doi: 10.1007/s00210-006-0121-y.
- Proell, M., Riedl, S., Fritz, J., Rojas, A., Schwarzenbacher, R., & Gay, N. (2008). The Nod-Like Receptor (NLR) Family: A Tale of Similarities and Differences. *PLoS ONE*, 3(4).
- Quigley, E. M. M., & Flourie, B. (2007). Probiotics and irritable bowel syndrome: a rationale for their use and an assessment of the evidence to date. *Neurogastroenterology & Motility*, 19(3), 166-172.
- Rahman, M. M., & McFadden, G. (2011). Modulation of NF-kB signalling by microbial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 291-306. Doi: 10.1038/nrmicro2539.
- Ramsay, P. T., & Carr, A. (2011). Gastric Acid and Digestive Physiology. *Surgical Clinics of North America*, 91(5), 977-982. Doi: 10.1016/j.suc.2011.06.010

- Rani, K., Rana, R., & Datt, S. (2012). Review on latest overview of proteases. *Int J Current Life Sci*, 2: 12-18.
- Rao, P., & Knaus, E. E. (2008). Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 81.
- Reddy, K. K., Vidya Rajan, V. K., Gupta, A., Aparoy, P., & Reddanna, P. (2015). Exploration of Binding Site Pattern in Arachidonic Acid Metabolizing Enzymes, Cyclooxygenases and Lipoxygenases. *BMC Research Notes*, 8(1). Doi: 10.1186/s13104-015-1101-4.
- Rengarajan, J., Szabo, S. J., & Glimcher, L. H. (2000). Transcriptional Regulation of Th1/Th2 Polarization. *Immunology Today*, 21(10), 479-483.
- Requena, P., Daddaoua, A., Guadix, E., Zarzuelo, A., Suárez, M. D., Sánchez de Medina, F., & Martínez-Augustin, O. (2009). Bovine Glycomacropeptide Induces Cytokine Production in Human Monocytes Through the Stimulation of the MAPK and the NF- κ B Signal Transduction Pathways. *Br J Pharmacol*, 157: 1232-1240.
- Requena, P., Daddaoua, A., Martínez-Plata, E., González, M., Zarzuelo, A., Suárez, M. D.,... Martínez-Augustin O. (2008). Bovine Glycomacropeptide Ameliorates Experimental Rat Ileitis by Mechanisms Involving Downregulation of Interleukin 17. *British Journal of Pharmacology*; 154: 825-832.
- Requena, P., González, R., López-Posadas, R., Abadía-Molina, A., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., ... Martínez-Augustin, O. (2010). The Intestinal Antiinflammatory Agent Glycomacropeptide Has Immunomodulatory Actions on Rat Splenocytes. *Biochemical Pharmacology*, 79(12), 1797-1804. Doi: 10.1016/j.bcp.2010.02.008.
- Reville, K., Crean, J. K., Vivers, S., Dransfield, I., & Godson, C. (2006). Lipoxin A4 Redistributes Myosin IIA and Cdc42 in Macrophages: Implications for Phagocytosis of Apoptotic Leukocytes. *The Journal of Immunology*, 176(3), 1878-1888.
- Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(5), 986-1000.
- Rios, E. R. V., Rocha, N. F. M., Venâncio, E. T., Moura, B. A., Feitosa, M. L., Cerqueira, G. S., ... Fonteles, M. M. de F. (2010). Mechanisms Involved in the Gastroprotective Activity of Esculin on Acute Gastric Lesions in Mice. *Chemico-Biological Interactions*, 188(1), 246-254. Doi: 10.1016/j.cbi.2010.07.020.

- Robinson, K., Deng, Z., Hou, Y., & Zhang, G. (2015). Regulation of the Intestinal Barrier Function by Host Defense Peptides. *Frontiers in Veterinary Science*, 2.
- Robitaille, G. (2013). Growth-Promoting Effects of Caseinomacropeptide from Cow and Goat Milk on Probiotics. *J Dairy Res*, 80: 58-63.
- Rockey, D. C. (2005). Occult Gastrointestinal Bleeding. *Gastroenterology Clinics of North America*, 34(4), 699–718. Doi: 10.1016/j.gtc.2005.08.010.
- Roldán, N. R., Jiménez, M., Cervantes-García, D., Marín, E., & Salinas, E. (2016). Glycomacropeptide Administration Attenuates Airway Inflammation and Remodeling Associated to Allergic Asthma in Rat. *Inflammation Research*, 65(4), 273–283. Doi: 10.1007/s00011-015-0913-y.
- Roselli, M., Finamore, A., Britti, M.S. and Mengheri, E. (2006). Probiotic Bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG Protect Intestinal Caco-2 Cells from the Inflammation-Associated Response Induced by Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Br J Nutr*, 95: 177-1184.
- Ross & Pawlina (2012). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Rothschild, D. E., McDaniel, D. K., Ringel-Scaia, V. M., & Allen, I. C. (2018). Modulating inflammation through the negative regulation of NF-κB signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, 103(6), 1131-1150. Doi: 10.1002/jlb.3mir0817-346rrr.
- Rousseaux, C., Thuru, X., Gelot, A., Barnich, N., Neut, C., Dubuquoy, L., ... Desreumaux, P. (2006). *Lactobacillus acidophilus* Modulates Intestinal Pain and Induces Opioid and Cannabinoid Receptors. *Nature Medicine*, 13(1), 35-37. Doi: 10.1038/nm1521.
- S. Tarnawski, A., Ahluwalia, A., & K. Jones, M. (2012). The Mechanisms of Gastric Mucosal Injury: Focus on Microvascular Endothelium as a Key Target. *Current Medicinal Chemistry*, 19(1), 4-15. Doi: 10.2174/092986712803414079
- Saito, T., & Itoh, T. (1992). Variations and Distributions of O-glycosidically Linked Sugar Chains in Bovine k-casein. *J Dairy Sci*, 75: 1768-1774.
- Sakurai, T. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor Increases Messenger RNAs Encoding Cyclooxygenase-II and Membrane-Associated Prostaglandin E Synthase in Rat Luteal Cells. *Journal of Endocrinology*, 183(3), 527-533.
- Salminen, M. K., Tynkkynen, S., Rautelin, H., Poussa, T., Saxelin, M., Ristola, M., ... Järvinen, A. (2004). The Efficacy and Safety of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG on Prolonged, Noninfectious Diarrhea in HIV Patients on Antiretroviral Therapy:

- A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Study. *HIV Clinical Trials*, 5(4), 183-191. Doi: 10.1310/6f83-n39q-9ppp-lmvv.
- Salvo-Romero, E., Alonso-Cotoner, C., Pardo-Camacho, C., Casado-Bedmar, M., & Vicario, M. (2015). The Intestinal Barrier Function and its Involvement in Digestive Disease. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 107(11), 686-696.
- Sanman, L. E., & Bogyo, M. (2014). Activity-Based Profiling of Proteases. *Annual Review of Biochemistry*, 83(1), 249-273. Doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035352.
- Sarkar, S. (2007). Potential of Prebiotics as Functional Foods – A Review. *Nutrition & Food Science*, 37(3), 168-177. Doi: 10.1108/00346650710749062.
- Satoh, H., Amagase, K., & Takeuchi, K. (2012). Exacerbation of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Small Intestinal Lesions by Antisecretory Drugs in Rats: The Role of Intestinal Motility. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 343(2), 270-277. Doi: 10.1124/jpet.112.197475.
- Sawant, K. V., Poluri, K. M., Dutta, A. K., Sepuru, K. M., Troshkina, A., Garofalo, R. P., & Rajarathnam, K. (2016). Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Scientific Reports*, 6(1). Doi: 10.1038/srep33123
- Sawin, E. A., De Wolfe, T. J., Aktas, B., Stroup, B. M., Murali, S. G., Steele, J. L., & Ney, D. M. (2015). Glycomacropptide is a Prebiotic that Reduces *Desulfovibrio* Bacteria, Increases Cecal Short-Chain Fatty Acids, and is Anti-Inflammatory in Mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309(7), G590-G601.
- Scarpignato, C. (2008). NSAID-Induced Intestinal Damage: Are Luminal Bacteria the Therapeutic Target? *Gut*, 57(2), 145–148. doi:10.1136/gut.2007.134502
- Scarpignato, C., & Hunt, R. H. (2010). Nonsteroidal Antiinflammatory Drug-Related Injury to the Gastrointestinal Tract: Clinical Picture, Pathogenesis, and Prevention. *Gastroenterology Clinics of North America*, 39(3), 433-464.
- Scheiman, J. M. (2009). Balancing Risks and Benefits of Cyclooxygenase 2 Selective NSAIDs. *Gastroenterol Clin N Am*, 38: 305-314.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative C(T) Method. *Nat Protoc*, 3: 1101-1108.
- Schubert, M. L., & Peura, D. A. (2008). Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. *Gastroenterology*, 134(7), 1842-1860. Doi: 10.1053/j.gastro.2008.05.021.

- Scott, A., Khan, K.M., Cook, J.L., & Duronio, V. (2004). What is "Inflammation"? Are we Ready to Move Beyond Celsus? Different Definitions of Inflammation are a Cause for Concern. *British Journal of Sports Medicine*, 38(3), 248.
- Segers, M. E., & Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S7.
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., ... Isakson, P. (1994). Pharmacological and Biochemical Demonstration of the Role of Cyclooxygenase 2 in Inflammation and Pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(25), 12013-12017. Doi: 10.1073/pnas.91.25.12013.
- Serhan, C. N. & Savill, J. (2005). Resolution of Inflammation: The Beginning Programs the End. *Nature Immunol*, 6: 1191-1197.
- Serhan, C. N., Chiang, N., & Van Dyke, T. E. (2008). Resolving Inflammation: Dual Anti-Inflammatory and Pro-Resolution Lipid Mediators. *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 349-361. Doi: 10.1038/nri2294.
- Servin, A.L. (2004). Antagonistic Activities of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* Against Microbial Pathogens. *FEMS Microbiol Rev*, 28: 405-440.
- Séverin, S., & Wenshui, X. (2005). Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(7-8), 645-656.
- Sha, S., Vong, L. B., Chonpathompikunlert, P., Yoshitomi, T., Matsui, H., & Nagasaki, Y. (2013). Suppression of NSAID-induced small intestinal inflammation by orally administered redox nanoparticles. *Biomaterials*, 34(33): 8393-400.
- Shack, M.E. (1966). Drug Induced Ulceration and Perforation of the Small Intestine. *Ariz Med.*, 23(7), 517-523.
- Sherman, P.M., Johnson-Henry, K.C., Yeung, H.P., Ngo, P.S., Goulet, J., & Tompkins, T.A. (2005). Probiotics Reduce Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and Enteropathogenic *E. coli* O127:H6-Induced Changes in Polarized T84 Epithelial Cell Monolayers by Reducing Bacterial Adhesion and Cytoskeletal Rearrangements. *Infect Immun*, 73: 5183-5188.
- Sherwood, E. R., & Toliver-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the Inflammatory Response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 18(3), 385-405.
- Shigeta, J., Takahashi, S., Ishikawa, M., & Okabe, S. (1998). Role of cyclooxygenase-2 (Cox-2) in the healing of gastric ulcers in rats. *Gastroenterology*, 114: A285.

- Shyu, P. T., Oyong, G. G., & Cabrera, E. C. (2014). Cytotoxicity of Probiotics from Philippine Commercial Dairy Products on Cancer Cells and the Effect on Expression of cfos and cjun Early Apoptotic-Promoting Genes and Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α Proinflammatory Cytokine Genes. *Biomed Res Int*: 1-9.
- Siddiqui, W. A., Ahad, A., & Ahsan, H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of Toxicology*, 89(3), 289-317.
- Silen, W., Schiessel, R., & Kivilaakso, E. (1980). The gastric mucosal barrier and ulceration. *Brain Research Bulletin*, 5; 3-6. Doi: 10.1016/0361-9230(80)90296-8
- Singh, D. P., Borse, S. P., & Nivsarkar, M. (2016). A Novel Model for NSAID Induced Gastroenteropathy in Rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 78: 66-75. Doi: 10.1016/j.vascn.2015.11.008.
- Singh, D. P., Borse, S. P., & Nivsarkar, M. (2017). Co-Administration of Quercetin with Pantoprazole Sodium Prevents NSAID-Induced Severe Gastroenteropathic Damage Efficiently: Evidence from a Preclinical Study in Rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 69(1), 17-26. Doi: 10.1016/j.etp.2016.10.004.
- Singh, P. K., Deol, P. K., & Kaur, I. P. (2012). Entrapment of Lactobacillus acidophilus into Alginate Beads for the Effective Treatment of Cold Restraint Stress Induced Gastric Ulcer. *Food Funct*, 3: 83-90.
- Sinha, M., Gautam, L., Shukla, P. K., Kaur, P., Sharma, S., & Singh, T. P. (2013). Current Perspectives in NSAID-Induced Gastropathy. *Mediators of Inflammation*: 1–11.
- Sivalingam, N., Hanumantharaya, R., Faith, M., Basivireddy, J., Balasubramanian, K. A., & Jacob, M. (2007). Curcumin Reduces Indomethacin-Induced Damage in the Rat Small Intestine. *Journal of Applied Toxicology*, 27(6), 551-560. Doi: 10.1002/jat.1235
- Smith, C. J., Zhang, Y., Koboldt, C. M., Muhammad, J., Zweifel, B. S., Shaffer, A., Isakson, P. C. (1998). Pharmacological Analysis of Cyclooxygenase-1 in Inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 13313-13318.
- Smith, C. L., Arvedson, T. L., Cooke, K. S., Dickmann, L. J., Forte, C., Li, H., ... Maxwell, J. R. (2013). IL-22 Regulates Iron Availability In Vivo through the Induction of Heparin. *The Journal of Immunology*, 191(4), 1845-1855. Doi: 10.4049/jimmunol.1202716.

- Smith, W. L., DeWitt, D. L., & Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 145-182.
- Smits, H. H., Engering, A., van der Kleij, D., de Jong, E. C., Schipper, K., van Capel, T. M. M., ... van Kooyk, Y. (2005). Selective Probiotic Bacteria Induce IL-10–Producing Regulatory T Cells In Vitro by Modulating Dendritic Cell Function Through Dendritic Cell–Specific Intercellular Adhesion Molecule 3–Grabbing Nonintegrin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(6), 1260-1267.
- Soehnlein, O., & Lindbon, L. (2010). Phagocyte Partnership During the Onset and Resolution of Inflammation. *Nat. Rev. Immunol*, 10:427-39.
- Somasundaram, S., Hayllar, H., Rafi, S., Wrigglesworth, J. M., Macpherson, A. J. S., & Bjarnason, I. (1995). Review: The Biochemical Basis of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Damage to the Gastrointestinal Tract: A Review and a Hypothesis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 30(4), 289-299.
- Somasundaram, S., Rafi, S., Hayllar, J., Sigthorsson, G., Jacob, M., Price, A. B., ... Bjarnason, I. (1997). Mitochondrial Damage: A Possible Mechanism of the “Topical” Phase of NSAID Induced Injury to the Rat Intestine. *Gut*, 41(3), 344-353.
- Soybel, D. I. (2005). Anatomy and Physiology of the Stomach. *Surgical Clinics of North America*, 85(5), 875-894. Doi: 10.1016/j.suc.2005.05.009.
- Stadnyk, A. W. (2002). Neutrophil Migration into Indomethacin Induced Rat Small Intestinal Injury is CD11a/CD18 and CD11b/CD18 Co-Dependent. *Gut*, 50(5), 629-635.
- Sternini, C., Anselmi, L., & Rozengurt, E. (2008). Enteroendocrine Cells: A Site of “Taste” in Gastrointestinal Chemosensing. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 15(1), 73-78. Doi: 10.1097/MED.0b013e3282f43a73.
- Suleyman, H., Albayrak, A., Bilici, M., Cadirci, E., & Halici, Z. (2010). Different Mechanisms in Formation and Prevention of Indomethacin-induced Gastric Ulcers. *Inflammation*, 33(4), 224-234. Doi: 10.1007/s10753-009-9176-5.
- Sun, S. C. (2010). Non-Canonical NF- κ B Signaling Pathway. *Cell research*, 21(1), 71-85.
- Sun, S. C. (2017). The Non-Canonical NF- κ B Pathway in Immunity and Inflammation. *Nature reviews Immunology*, 17(9), 545-558.
- Sylvester, F. A. (2011). Protein-Losing Enteropathy. *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease*, 360--365. e4. Doi: 10.1016/b978-1-4377-0774-8.10034-x.

- Takeuchi, K., & Amagase, K. (2017). Roles of prostaglandin E and EP receptors in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract. *Arch Dig Disord*, 1(2): 8-16.
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140(6), 805-820. Doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- Tamura, K., Sakurai, T., & Kogo, H. (2006). Relationship Between Prostaglandin E2 and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Angiogenesis in Human Vascular Endothelial Cells. *Vascular Pharmacology*, 44(6), 411-416.
- Tan, P., Luscinskas, F. ., & Homer-Vanniasinkam, S. (1999). Cellular and Molecular Mechanisms of Inflammation and Thrombosis. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 17(5), 373-389. Doi: 10.1053/ejvs.1998.0759.
- Tarnawski, A. S. (2005). Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing. *Digestive Diseases and Sciences*, 50(S1), S24-S33.
- Thomä-Worringer, C., Sørensen, J., & López-Fandiño, R. (2006). Health Effects and Technological Features of Caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, 16(11), 1324–1333. Doi: 10.1016/j.idairyj.2006.06.012.
- Timmons, J., Chang, E. T., Wang, J. Y., & Rao, J. N. (2012). Polyamines and Gut Mucosal Homeostasis. *Journal of gastrointestinal & digestive system*, 2(7).
- Tlaskalová-Hogenová, H., Tučková, L., Lodinová-Žádníková, R., Štěpánková, R., Cukrowska, B., Funda, D. P., ... Sánchez, D. (2002). Mucosal Immunity: Its Role in Defense and Allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 128(2), 77-89. Doi: 10.1159/000059397.
- Toh, B.-H. (2016). Pathophysiology and Laboratory Diagnosis of Pernicious Anemia. *Immunologic Research*, 65(1), 326-330. Doi: 10.1007/s12026-016-8841-7.
- Tomczak, L., Noemberg, E., & Bileski, L. M. (2007). Review: Isolation and Purification of Milk Whey Glycomacropeptide. *B. CEPPA, Curitiba*, 25(1), 121-132.
- Tomisato, W., Tsutsumi, S., Rokutan, K., Tsuchiya, T., & Mizushima, T. (2001). NSAIDs Induce Both Necrosis and Apoptosis in Guinea Pig Gastric Mucosal Cells in Primary Culture. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(4), G1092-G1100. Doi: 10.1152/ajpgi.2001.281.4.g1092.
- Torrens, P. (2015). Interpretación clínica del hemograma. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(6), 713-725. Doi: 10.1016/j.rmclc.2015.11.001

- Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C., & Salminen, S. J. (1999). The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 26(2), 137–142.
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and Chemokines: At the Crossroads of Cell Signalling and Inflammatory Disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(11), 2563-2582.
- Uchida, M., & Kurakazu, K. (2004). Yogurt Containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716 Exerts Gastroprotective Action Against Acute Gastric Lesion and Antral Ulcer in Rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96(1), 84-90. Doi: 10.1254/jphs.fpj04027x.
- Uchida, M., Shimizu, K., Kurakazu, K. (2010). Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21 yogurt) accelerated the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74: 1891-1894. Doi: 10.1271/bbb.100287.
- Uejima, M., Kinouchi, T., Kataoka, K., Hiraoka, I., & Ohnishi, Y. (1996). Role of Intestinal Bacteria in Ileal Ulcer Formation in Rats Treated with a Nonsteroidal Antiinflammatory Drug. *Microbiology and Immunology*, 40(8), 553-560.
- Vanderpool, C., Yan, F., & Polk, D. B. (2008). Mechanisms of Probiotic Action: Implications for Therapeutic Applications in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 14: 1585-1596.
- Vélez, M. P., Petrova, M. I., Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Claes, I., Lambrichts, I., ... De Keersmaecker, S. C. J. (2010). Characterization of MabA, a modulator of *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion and biofilm formation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), 386–398. Doi: 10.1111/j.1574-695x.2010.00680.x
- Verna, E., & Lucak, S. (2010). Use of Probiotics in Gastrointestinal Disorders: What to Recommend? *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 3(5), 307-319.
- Vonkeman, H. E., Brouwers, J. R. B. J., & Van de Laar, M. A. F. J. (2006). Understanding the NSAID Related Risk of Vascular Events. *BMJ*, 332(7546), 895-898.
- Wallace, J. L. (2001). Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. *The American Journal of Medicine*, 110(1), S19-S23.
- Wallace, J. L. (2011). NSAID Gastropathy and Enteropathy: Distinct Pathogenesis Likely Necessitates Distinct Prevention Strategies. *British Journal of Pharmacology*, 165(1), 67-74. Doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01509.x.

- Wallace, J. L. (2015). *Prevention of NSAID-Enteropathy: A Soluble Problem? Digestive Diseases and Sciences*, 61(1), 1-3. Doi: 10.1007/s10620-015-3963-7.
- Wallace, J. L., & Granger, D. N. (1996). The Cellular and Molecular Basis of Gastric Mucosal Defense. *The FASEB Journal*, 10(7), 731-740. Doi: 10.1096/fasebj.10.7.8635690.
- Wallace, J. L., & Miller, M. J. S. (2000). Nitric Oxide in Mucosal Defense: A Little Goes a Long Way. *Gastroenterology*, 119(2), 512-520. Doi: 10.1053/gast.2000.9304.
- Wallace, J. L., Syer, S., Denou, E., de Palma, G., Vong, L., McKnight, W., ... Ongini, E. (2011). Proton Pump Inhibitors Exacerbate NSAID-Induced Small Intestinal Injury by Inducing Dysbiosis. *Gastroenterology*, 141(4), 1314-1322.
- Walsh, C. J., Guinane, C. M., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2014). Beneficial Modulation of the Gut Microbiota. *FEBS Letters*, 588(22), 4120-4130.
- Watanabe, T., Higuchi, K., Kobata, A., Nishio, H., Tanigawa, T., Shiba, M., ... Arakawa, T. (2007). Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Small Intestinal Damage is Toll-like Receptor 4 Dependent. *Gut*, 57(2), 181-187.
- Weiss, G., & Goodnough, L. T. (2005). Anemia of Chronic Disease. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 1011-1023. Doi: 10.1056/nejmra041809.
- Wershil, B., & Furuta, G. (2008). 4. Gastrointestinal Mucosal Immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(2), s380-s383. Doi: 10.1016/j.jaci.2007.10.023.
- Weruaga, E., Balkan, B., Koylu, E. O., Pogun, S., & Alonso, J. R. (2002). Effects of Chronic Nicotine Administration on Nitric Oxide Synthase Expression and Activity in Rat Brain. *Journal of Neuroscience Research*, 67(5), 689-697. Doi: 10.1002/jnr.10158.
- White, M. (1999). Mediators of Inflammatory and Inflammatory Process. *J Allergy Clin Immunol*, 103(3 Pt 2), S378-S381.
- Whittle, B. J. R. (2004). Mechanisms Underlying Intestinal Injury Induced by Anti-Inflammatory COX Inhibitors. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3), 427-439. Doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.042.
- Wiig, H. (2011). Pathophysiology of Tissue Fluid Accumulation in Inflammation. *The Journal of physiology*, 589(Pt 12), 2945-53.
- Wilgus, T. A., Roy, S., & McDaniel, J. C. (2013). Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Advances in Wound Care*, 2(7), 379-388.

- Wit, A., & Wang, S. (1968). Temperature-Sensitive Neurons in Preoptic-Anterior Hypothalamic Region: Actions of Pyrogen and Acetylsalicylate. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 215(5), 1160-1169.
- Xiao, X., Nakatsu, G., Jin, Y., Wong, S., Yu, J., & Lau, J. Y. W. (2017). Gut Microbiota Mediates Protection Against Enteropathy Induced by Indomethacin. *Scientific Reports*, 7(1). Doi: 10.1038/srep40317.
- Xu, S.-P., Mao, X.-Y., Cheng, X., & Chen, B. (2013). Ameliorating Effects of Casein Glycomacropeptide on Obesity Induced by High-Fat Diet in Male Sprague-Dawley Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 56: 1–7. Doi: 10.1016/j.fct.2013.01.027.
- Yan, F., Cao, H., Cover, T. L., Whitehead, R., Washington, M. K., & Polk, D. B. (2007). Soluble Proteins Produced by Probiotic Bacteria Regulate Intestinal Epithelial Cell Survival and Growth. *Gastroenterology*, 132(2), 562-575.
- Yang, D. (2013). Anaphylatoxins. *Handbook of Biologically Active Peptides*: 625-630.
- Ye, W., Zhang, H., Hillas, E., Kohan, D. E., Miller, R. L., Nelson, R. D., ... Yang, T. (2006). Expression and Function of COX Isoforms in Renal Medulla: Evidence for Regulation of Salt Sensitivity and Blood Pressure. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 290(2), F542–F549. Doi: 10.1152/ajprenal.00232.2005.
- Ye, Y. N., Liu, E. S. L., Shin, V. Y., Koo, M. W. L., Li, Y., Wei, E. Q., ... Cho, C. H. (2001). A Mechanistic Study of Proliferation Induced by *Angelica sinensis* in a Normal Gastric Epithelial Cell Line 11 Abbreviations: ASCE, *Angelica sinensis* crudeextract; AS-ODNs, antisense oligodeoxynucleotides; DFMO, dl- α -difluoromethyl-ornithine; FBS, fetal bovine serum; MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; and ODC, ornithine decarboxylase. *Biochemical Pharmacology*, 61(11), 1439-1448.
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944-5972. Doi: 10.1021/cr200084z.
- Yoda, Y., Amagase, K., Kato, S., Tokioka, S., Murano, M., Kakimoto, K.,..., Higuchi, K. (2010). Prevention by Lansoprazole, a Proton Pump Inhibitor, of Indomethacin-Induced Small Intestinal Ulceration in Rats Through Induction of Heme Oxygenase-1. *J Physiol Pharmacol*, 61(3): 287-94.
- Yoshie, O., & Matsushima, K. (2018). Chemokines and Chemotaxis. En J-M. Cavillon & M. Singer (Ed). *Inflammation: From Molecular and Cellular Mechanisms to the Clinic*. (pp. 619-649). Weinheim, Alemania: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

- Yu, J. E., & Lin, R. Y. (2014). Protein-Losing Conditions. *Stiehm's Immune Deficiencies*, 863–873. Doi: 10.1016/b978-0-12-405546-9.00047-9.
- Zeissig, S., Burgel, N., Gunzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., ... Schulzke, J.-D. (2007). Changes in Expression and Distribution of Claudin 2, 5 and 8 Lead to Discontinuous Tight Junctions and Barrier Dysfunction in Active Crohn's Disease. *Gut*, 56(1), 61–72.
- Zelena, D., & Filaretova, L. (2010). Age-Dependent Role of Vasopressin in Susceptibility of Gastric Mucosa to Indomethacin-Induced Injury. *Regulatory Peptides*, 161(1-3), 15-21. Doi: 10.1016/j.regpep.2009.12.015.
- Zha, S., Yegnasubramanian, V., Nelson, W. G., Isaacs, W. B., & De Marzo, A. M. (2004). Cyclooxygenases in Cancer: Progress and Perspective. *Cancer Letters*, 215(1), 1-20. Doi: 10.1016/j.canlet.2004.06.014.
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation, and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27–37. Doi: 10.1097/aia.0b013e318034194e.
- Zhao, K., Huang, Z., Lu, H., Zhou, J., & Wei, T. (2010). Induction of inducible nitric oxide synthase increases the production of reactive oxygen species in RAW264.7 macrophages. *Bioscience Reports*, 30(4), 233-241. Doi: 10.1042/bsr20090048
- Zimmermann, K. C., Sarbia, M., Schor, K., & Weber, A. A (1998). Constitutive Cyclooxygenase-2 Expression in Healthy Human and Rabbit Gastric Mucosa. *Mol Pharmacol*, 54: 536-540.