

Comparación In Vivo de los efectos antiinflamatorios del Óxido Nítrico obtenido a partir de L-arginina frente a Ibuprofeno y Aspirina en ratones *Mus Musculus*

In Vivo Comparison of the antiinflammatory effects of nitric oxide derived from L-arginine versus ibuprofen and aspirin in *Mus musculus* mice

Julio Rabines-Gastulo^{1,a}, Miguel Enrique Achaña-Espinoza^{1,a}, Cristian Jesús Díaz-Koo^{1,a}, Lizzie Becerra-Gutiérrez^{1,b}

RESUMEN

Objetivo: comparar la eficacia del NO como antiinflamatorio obtenido a partir de L-Arginina y se compara con las propiedades del ibuprofeno y la aspirina. **Material y métodos:** Se usaron 30 ratones a los cuales se les dividió en 6 grupos diferentes. Se estimuló la inflamación usando el modelo de bolsa de aire-carragenina. Se usaron dos grupos controles positivos (1 y 5), administrándosele un pro-inflamatorio (Carragenina: 1%) sin ningún fármaco anti-inflamatorio y en el grupo 5 se le administro adicionalmente suero fisiológico por vía oral. Un grupo control negativo (6) al cual no se le administro el pro-inflamatorio y solo una dosis de L-Arginina por vía oral. Los grupos 2, 3 y 4 recibieron una dosis de Carragenina, además de Aspirina, Ibuprofeno y L-Arginina (vía oral: 500mg/3dl) respectivamente. Se extrajo el exudado de la bolsa de aire y se realizó un conteo de polimorfonucleares usando cámara de Neubauer. Se usó la prueba de Mann Whitney para comparar los grupos. **Resultados:** el efecto antiinflamatorio es similar entre el ibuprofeno y la aspirina ($p > 0,05$), como lo es también entre el ibuprofeno y la L-arginina ($p > 0,05$); pero la diferencia entre L-arginina y aspirina es suficiente como para decir que la L-arginina tiene mejor eficacia que la aspirina ($p < 0,05$). **Conclusión:** la comparación de la L-arginina con el ibuprofeno es mejor efecto que la aspirina, por lo que la L-arginina es una alternativa viable a los AINEs para evitar sus efectos adversos.

Palabras clave: Antiinflamatorio, AINEs, L-arginina, Óxido Nítrico (Fuente: DeCS-BIREME).

ABSTRACT

Objective: To compare the efficacy of anti-inflammatory NO produced from L-Arginine and compared with the properties of ibuprofen and aspirin. **Material and methods:** 30 mice which were divided into 6 different groups were used. Inflammation was stimulated using the model of airbag-carrageenan. Two positive controls (1 to 5) groups were used, a pro-inflammatory administrándosele (Carrageenan: 1%) with no anti-inflammatory drug and the group administered 5 additional saline orally. A negative control group (6) which will not administer the pro-inflammatory and only one dose of L-arginine orally. Groups 2, 3 and 4 received a dose of carrageenan, plus aspirin, ibuprofen and L-Arginine (oral: 500mg / 3dl) respectively. Exudate air bag was removed and a polymorphonuclear count was performed using a Neubauer chamber. Mann Whitney test was used to compare groups. **Results:** The anti-inflammatory effect is similar between ibuprofen and aspirin ($p > 0.05$), as is also between ibuprofen and L-arginine ($p > 0.05$); but the difference between L-arginine and aspirin is enough to say that L-arginine has better efficacy than aspirin ($p < 0.05$). **Conclusion:** Comparison of L-

arginine to ibuprofen is better effect than the aspirin, so that L-arginine is a viable alternative to NSAIDs to prevent adverse effects.

Key words: Antiinflammatory, NSAIDs, L-arginine, Nitric oxide (Source: MeSH-NLM).

INTRODUCCIÓN

Actualmente la aspirina es el medicamento más usado en el mundo, debido a sus efectos antiinflamatorio, analgésico y antipirético; no obstante el ibuprofeno es el medicamento más recetado por los médicos en los hospitales peruanos. Pero su uso indiscriminado a largo plazo en las enfermedades como fiebre reumática, y en algunas enfermedades cardiovasculares, trae como consecuencia una serie de efectos adversos, un meta-análisis reporta que el los Antiinflamatorios No Esteroides (AINEs) aumenta el riesgo de dispepsia en un 36% ($p < 0,05$)⁽¹⁾.

Estudios transversales endoscópicos han demostrado que la prevalencia combinada de las úlceras gástricas y duodenales es de 10 a 25 por ciento en los pacientes con artritis crónica tratados con AINE, que es 5 a 15 veces la prevalencia esperada en la población sana de la misma edad⁽²⁾.

1. Universidad San Martín de Porres – Filial Norte. Chiclayo-Perú.
a. Estudiante de Medicina.
b. Licenciada en Biología, Doctora en Microbiología.

Por eso es importante buscar nuevos tratamientos antiinflamatorios que tengan la mínima cantidad de efectos adversos para el paciente. El siguiente trabajo de investigación es importante porque puede ser la base de estudios en medicina complementaria enfocados en el uso de plantas ricas en L-Arginina para el tratamiento pacientes con algún tipo de inflamación crónica como la artritis, ofreciendo menores efectos adversos que los AINES tales como gastritis crónica y diarrea.

Los AINES convencionales actúan como inhibidores no específicos de la enzima ciclooxigenasa (COX), que es parte de la ruta del ácido araquidónico que conduce a la formación de diversas moléculas mensajeras eicosanoides. Por lo tanto, además de la reducción de la síntesis de prostaglandinas (PGH₂, PGE₂, PGF_{2a}), la producción de los leucotrienos, también se reducen las prostaciclina y tromboxanos⁽⁹⁾.

La enzima COX tiene dos isoformas distintas denominadas COX-1 y COX-2. La enzima COX-2 se describe como "inducible", de tal manera que normalmente no está presente en cantidad apreciable en los tejidos y su producción es inducida en los sitios de inflamación y lesión de los tejidos por las citoquinas (por ejemplo, interleucina-1) y el factor de necrosis tumoral factor alfa. Los AINES convencionales inhiben ambas enzimas; y el efecto antiinflamatorio de los AINES es consecuencia de la inhibición de la COX-2, mientras que los efectos adversos, son causados por la inhibición de la enzima constitutiva COX-1^(3,4).

El óxido nítrico (NO) es un gas que es liberado como producto de la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina. La enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) es la que cataliza la reacción. El NO pasa hacia las células endoteliales o musculares, e induce la activación de la enzima guanidilciclasa (Gc), que aumenta el nivel intracelular del segundo mensajero que provoca los cambios fisiológicos, como la inhibición de la migración y adherencia leucocitaria^(5,6). Los inhibidores de la COX aumentan significativamente la producción de NO y este puede ser uno de los mecanismos por los cuales ejercen sus efectos antiinflamatorios^(6,7).

Anteriormente, Hyum E. y col (2004), compararon la eficacia de la hidrocortisona combinada con un liberador de NO, contra hidrocortisona aplicada directamente como antiinflamatorio, se estimuló una dermatitis de contacto tóxico agudo en ratones aplicando Cloruro de Benzalconio al 5% y se aplicó tópicamente el antiinflamatorio hidrocortisona. Usando análisis histológico concluyeron una mayor eficacia del compuesto liberador de NO para el control del reclutamiento leucocitario y la formación del edema⁽⁸⁾.

Del mismo modo, Wallace J. y col. (2004) compararon la eficacia de flunisolida con su homólogo liberador de NO. Usaron el modelo de la bolsa de aire - carragenina para estimular la inflamación en tejido celular subcutáneo de los ratones, después se administró los antiinflamatorios (flunisolida) en la bolsa de aire y se midió el efecto mediante conteo leucocitario del exudado mediante un contador Coulter de partículas y la medición de Prostaglandina E₂ por inmunoensayo. También se evaluó la toxicidad sistémica mediante el control de peso corporal y de la glándula adrenal. Se concluyó mayor efectividad antiinflamatoria con el compuesto liberador de NO y menor toxicidad sistémica⁽⁹⁾.

Palmer y Col. (1988) identificaron la sustancia previamente conocida como Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF) como óxido nítrico, el cual mediaba indirectamente la acción

vaso relajante de la acetilcolina. Además se demostró en un cultivo de células endoteliales, que al ser estimuladas con bradicinina la cantidad de NO liberado era suficiente para inhibir la adhesión plaquetaria. Además demostraron que el NO se sintetizaba a partir de L-arginina⁽¹⁰⁾.

En este trabajo se tiene por objetivo comparar la eficacia del NO como antiinflamatorio obtenido a partir de L-Arginina y se compara con las propiedades del ibuprofeno y la aspirina; con el objetivo de demostrar que el NO tiene un mejor efecto antiinflamatorio que los AINES.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo tuvo un diseño experimental pre-clínico.

Materiales:

Materiales Biológicos:

Se utilizaron 30 ratones hembras de especie *Mus musculus* cepa Balb/c /CNPB con Certificado Sanitario N 114-2013 emitido por el Instituto Nacional de Salud del Perú (INS). Cada ratón pesaba entre 25 a 35 gramos y medían entre 10 a 15 cm desde el hocico hasta la cola.

Fueron alimentados diariamente con la comida proporcionada y recomendada por el INS, el contenido de esta es de proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda y ceniza. Se les dio de beber agua filtrada, con flujo continuo proporcionado por bebederos especiales para roedores.

El bioterio fue ubicado en las instalaciones de la Universidad San Martín de Porres - Filial Norte y fueron almacenados en jaulas individuales de metal y poliestireno.

Materiales Químicos: se usaron 2 fármacos del tipo AINE, aspirina e ibuprofeno genéricos de tipo comercial, disponibles en venta ambos en dosis de 500mg, además capsulas recubiertas, de L- Arginina de 500mg de marca GNC® y Carragenina al 1%.

Materiales de laboratorio: se usaron 120 jeringas y agujas, algodón, alcohol al 96%, Suero fisiológico (NaCl al 0,9%), un microscopio proporcionado por la misma universidad, una cámara de Neubauer, un colorante a base de Acido Acético y Cristal Violeta, dos micro pipetas, cubreobjetos, tubos de ensayo de vidrio, y una gradilla.

Métodos: el modelo escogido para evaluar la inflamación fue "Bolsa de aire - Carragenina", que consiste en inyectar 6 ml de aire estéril en el tejido subcutáneo del lomo del roedor, en dos sesiones diferentes, 3 ml en cada una, donde se inyectó la Carragenina al 1%.

Se dividieron los ratones en 6 grupos diferentes y fueron enumerados del 1 al 6. Se usaron dos grupos controles positivos (1 y 5), administrándosele un pro-inflamatorio (0.1 ml de Carragenina al 1%) sin ningún fármaco anti-inflamatorio y en el grupo 5 se le administro adicionalmente suero fisiológico (2ml) por vía oral. Un grupo control negativo⁽⁶⁾ al cual no se le administro el pro-inflamatorio y solo una dosis de L-Arginina (500mg/kg de peso diluido en 1 ml de suero fisiológico) en la burbuja de aire. Los grupos 2, 3 y 4 recibieron una dosis de Carragenina, además de Aspirina, Ibuprofeno y L-Arginina (vía oral, cada uno con una dosis de 500mg/kg de peso) respectivamente.

Descripción del procedimiento:

En el día 0 se formó la bolsa de aire, con 3 ml de aire estéril en los 30 ratones y al siguiente día (día 1) se aumento la permeabilidad de esta, con 3 ml más.

En el día 2 se le administró Carragenina a los grupos del 1 al 5, 3 horas después se administró el medicamento respectivo por grupos. Después de pasadas 6 horas desde el término de administración de medicamentos se pasó a la extracción de infiltrado de la bolsa de aire, preparando una jeringa con 0,5 ml de suero fisiológico para captar las células de infiltrado y facilitar su observación, luego se posiciono en tubos de vidrio y se aplico el acido acético (para lisar eritrocitos) y cristal violeta para diferencial mono y polimorfo nucleares, indicadores de respuesta inflamatoria. La variable usada para medir el nivel de inflamación fue el de polimorfonucleares ya que se estimuló una inflamación aguda. La observación se hizo en un microscopio facilitado por la universidad, agregando 0,1ml de muestra por campo, se observaron 2 muestras por vez (La cámara de Neubauer tiene dos espacios con 4 sectores cada uno).

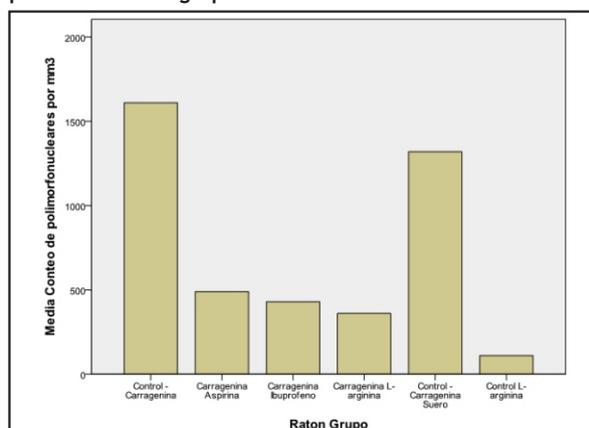
Aspectos éticos: se cumplió con la Ley N° 27265 “Ley de Protección a los Animales Domésticos y a los Silvestres Mantenidos en cautiverio”, la cual hace referencia al experimento e investigación con animales vivos que puedan ocasionarles sufrimiento innecesario, lesión o muerte, salvo que resulte imprescindibles para el estudio y avance de la ciencia, y que los procedimientos no puedan sustituirse por proyectos, cultivos de células o tejidos u otros procedimientos”; dado que los animales sólo sufrieron una lesión inflamatoria.

RESULTADOS

Tabla N°01: Mediana del conteo de polimorfonucleares por mm³ en cada grupo.

Grupos	Conteo de polimorfonucleares por mm ³ (Mediana)
Control - Carragenina	1610
Carragenina Aspirina	490
Carragenina Ibuprofeno	430
Carragenina L-arginina	360
Control - Carragenina Suero	1320
Control L-arginina	110

Gráfico N°01: Mediana del conteo de polimorfonucleares por mm³ en cada grupo.



En la tabla y el gráfico se puede observar que los valores mas altos de conteo de polimorfonucleares corresponden a los controles positivos y el más bajo al control negativo, como se esperaba. Además los valores entre los grupos a los que se les administro los antiinflamatorios son similares.

Con el test de Mann-Whitney se puede concluir con un nivel de confianza del 95% que existe una diferencia estadísticamente relevante ($p < 0,05$) entre el grupo control positivo y el grupo control negativo. Demostrando la acción pro-inflamatoria de la Carragenina. Además la reacción inflamatoria es equiparable ($p = 0,94$) entre los dos grupos control positivos. Demostrando que no hay remisión espontanea de la inflamación.

Con el test de Kruskal-Wallis se puede concluir con un nivel de confianza del 95% que existe una diferencia estadísticamente relevante ($p < 0,05$) entre el grupo control positivo y los grupos a los que se les dio un fármaco anti-inflamatorio. Demostrando que todos estos tienen acción antiinflamatoria, incluida la L-arginina, además existe una diferencia estadísticamente relevante ($p = 0,32$) entre los grupos a los que se les ha administrado un fármaco anti-inflamatorio. Lo que nos indica de que al menos uno de los fármacos tiene un mejor efecto.

El grupo control positivo y al que se le administro el AINE aspirina, confirmando su actividad antiinflamatoria existe una diferencia estadísticamente relevante ($p < 0,05$), y entre el grupo control positivo y al que se le administro el AINE ibuprofeno, confirmando su actividad antiinflamatoria ($p < 0,05$) y el grupo control positivo y al que se le administro L-arginina ($p < 0,05$), confirmando su actividad antiinflamatoria ambos realizados con el test de Mann-Whitney.

Tabla N°02: Comparación entre grupos 2 y 3 según conteo de polimorfonucleares por mm³.

Ratón Grupo	Mediana	P
Carragenina Aspirina	490	0,135
Carragenina Ibuprofeno	430	

Según el test de Mann Whitney se puede concluir con un nivel de confianza del 95% que no existe una diferencia estadísticamente relevante ($p > 0,05$) entre el grupo al que se le administro ibuprofeno y el grupo al que se le administro aspirina. Concluimos que tuvieron efectos similares.

Tabla N°03: Comparación entre grupos 2 y 4 según conteo de polimorfonucleares por mm³.

Ratón Grupo	Mediana	P
Carragenina Aspirina	490	0,014
Carragenina L-arginina	360	

Según el test de Mann Whitney se puede concluir con un nivel de confianza del 95% que existe una diferencia estadísticamente relevante ($p < 0,05$) entre el grupo al que se le administro aspirina y el grupo al que se le administro L-arginina. Concluimos que la L-arginina tuvo un mejor efecto antiinflamatorio que este.

Tabla N°04: Comparación entre grupos 3 y 4 según conteo de polimorfonucleares por mm³.

Ratón Grupo	Media	P
Carragenina Ibuprofeno	430	0,165
Carragenina L-arginina	360	

Según el test de Mann Whitney se puede concluir con un nivel de confianza del 95% que no existe una diferencia estadísticamente relevante ($p > 0,05$) entre el grupo al que se le administró ibuprofeno y el grupo al que se le administró L-arginina. Concluimos que la L-arginina tuvo similar efecto antiinflamatorio que este.

DISCUSIÓN

Los estudios de Wallace J. y col.⁽⁸⁾ al comparar flunisolida contra su homólogo liberador de NO obtienen unos resultados de millones de leucocitos en todos sus grupos, sin embargo ellos usaron un modelo de bolsa de aire-carragenina de mucha mayor duración; e hicieron un conteo total de leucocitos, mientras que en nuestro estudio solo tuvimos disponible un conteo de leucocitos que mide la cantidad de leucocitos por cada milímetro cúbico. Sin embargo, la proporción de mejora del efecto con el compuesto liberador de NO es similar a la que obtuvimos en nuestro estudio con el uso de L-arginina, en comparación con el AINE tradicional.

Nuestros resultados son consistentes con un estudio en conejos realizado por Saleh Al. y col.⁽¹⁰⁾ reporta mejor efecto de L-arginina sobre la aspirina para proteger contra los cambios bioquímicos predisponentes a Infarto de Miocardio, los cuales también son propios de inflamación local. Este estudio se muestra consistente con varios estudios que documentan la capacidad de los compuestos liberadores de NO para reducir la migración y adherencia plaquetaria⁽²⁻⁴⁾.

La limitación más importante del estudio fue la poca disponibilidad de métodos de medición más exactos, tales como el inmunoensayo para evaluar la cantidad de prostaglandina E2. Debido a la falta de tiempo y recursos tampoco se hizo el estudio complementario de la gastrotoxicidad y hepatotoxicidad en los ratones, por lo que se recomienda complementar con un estudio histológico de la mucosa gástrica y tejido hepático de los ratones para evaluar gastrotoxicidad y hepatotoxicidad.

Concluimos entonces que el efecto antiinflamatorio es similar entre el ibuprofeno y la aspirina, como lo es también entre el ibuprofeno y la L-arginina; pero la diferencia entre L-arginina y aspirina es suficiente como para decir que la L-arginina tiene mejor eficacia que la aspirina.

Agradecimientos: se le agradece al Dr. Cristian Díaz Vélez por la revisión crítica del manuscrito y al estudiante de medicina y tecnólogo médico Luis Huamán Sotero por prestar su pericia para realizar los procedimientos de medición necesarios para la realización de este trabajo.

Conflictos de interés: Los autores niegan conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Straus WL, Ofman JJ, MacLean C, Morton S, Berger ML, Roth EA, et al. [Do NSAIDs cause dyspepsia? a meta-analysis evaluating alternative dyspepsia definitions.](#) *Am J Gastroenterol.* 2002;97(8):1951-8.
2. Wolfe MM, Lichtenstein DR, Singh G. [Gastrointestinal Toxicity of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs.](#) *New England Journal of Medicine.* 1999;340(24):1888-99.
3. Konturek SJ, Obtulowicz W, Sito E, Oleksy J, Wilkon S, Kiec-Dembinska A. [Distribution of prostaglandins in gastric and duodenal mucosa of healthy subjects and duodenal ulcer patients: effects of aspirin and paracetamol.](#) *Gut.* 1981; 1;22(4):283.
4. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. [Role of nitric oxide in inflammatory diseases.](#) *Inflammopharmacology.* 2007; 15(6):252-9.
5. Kopff M, Kowalczyk E, Smigielski J. [\[The effect of COX-1 and COX-3 inhibitors on blood nitric oxide concentration\].](#) *Pol. Merkur. Lekarski.* 2009;26(151):49-51.
6. Mahmood M, Zuberi HS, Ashfaq MK. [Nitric oxide mediated effect of cyclo-oxygenase inhibitors.](#) *J Pak Med Assoc.* 2001;51(1):28-31.
7. Hyun E, Bolla M, Steinhoff M, Wallace JL, Soldato PD, Vergnolle N. [Anti-inflammatory effects of nitric oxide-releasing hydrocortisone NCX 1022, in a murine model of contact dermatitis.](#) *Br. J. Pharmacol.* 2004;143(5):618-25.
8. Wallace JL, Rizzo G, Cirino G, Del Soldato P, Fiorucci S. [Enhanced anti-inflammatory potency of a nitric oxide-releasing derivative of flunisolide: role of nuclear factor-kappaB.](#) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004;310(3):1096-102.
9. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. [Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.](#) *Nature.* 1988; 16;333(6174):664-6.
10. Saleh Al, Abdel Maksoud SM, El-Maraghy SA, Gad MZ. [Protective Effect of L-Arginine in Experimentally Induced Myocardial Ischemia: Comparison With Aspirin.](#) *J Cardiovasc Pharmacol Ther* March 2011 (16): 1: 53-62.

Correspondencia

Julio Enrique Rabines Gastulo

Dirección: Calle Serpiente de Oro # 165-Diego Ferré Chiclayo.

Teléfono: 976968119 RPM: #0105993

Correo: jerabinesga18@hotmail.com

Revisión de pares

Recibido: 03/07/2014

Aceptado: 07/10/2014