



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Cyrtocarpa procera***

**SOBRE MODELOS DE ULCERACIÓN GÁSTRICA EN RATÓN**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**KARINA GARCÍA MARTÍNEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Manuel Jiménez Estrada

**VOCAL:** Profesora: Martha Lydia Macías Rubalcava

**SECRETARIO:** Profesora: Irma Romero Álvarez

**1er.SUPLENTE:** Profesora: Isabel del Carmen Rivero Cruz

**2° SUPLENTE:** Profesora: Mabel Clara Fragoso Serrano

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Laboratorio 2, Departamento de Bioquímica,  
Facultad de Medicina, UNAM

**ASESOR DEL TEMA:** Dra. Irma Romero Álvarez

**SUPERVISOR TÉCNICO:** c. a Dra. Wendy Itzel Escobedo Hinojosa

**SUSTENTANTE:** Karina García Martínez

## Índice

I.	Resumen.....	iv
II.	Siglas y abreviaturas.....	vi
III.	Lista de Tablas .....	vii
IV.	Lista de Figuras.....	viii
1.	Introducción.....	- 1 -
1.1.	Anatomía y fisiología del estómago .....	- 1 -
1.2.	Secreciones gástricas .....	- 5 -
1.3.	Mecanismos de defensa de la mucosa gástrica .....	- 5 -
1.4.	Patologías del tracto gastrointestinal .....	- 7 -
1.4.1.	Gastritis .....	- 7 -
1.4.2.	Úlcera péptica .....	- 7 -
1.4.2.1.	Úlceras inducidas por <i>H. pylori</i> .....	- 9 -
1.4.2.2.	Úlceras inducidas por AINES .....	- 10 -
1.4.2.3.	Resolución de las úlceras gástricas.....	- 11 -
1.4.2.4.	Modelos de inducción de úlceras.....	- 12 -
1.4.2.4.1.	Modelo de úlcera gástrica inducida por ácido acético ....	- 13 -
1.4.2.4.2.	Modelo de inducción de úlceras por etanol.....	- 13 -
1.4.2.5.	Tratamientos para las úlceras pépticas .....	- 14 -
1.4.2.5.1.	Inhibidores del ácido gástrico .....	- 14 -
1.4.2.5.2.	Agentes protectores de la mucosa gástrica .....	- 15 -
1.4.2.5.3.	Erradicación de la infección por <i>H. pylori</i> .....	- 16 -
1.5.	Uso de productos naturales.....	- 17 -
1.5.1.	Uso de <i>Cyrtocarpa procera</i> .....	- 18 -
1.5.1.1.	Estudios sobre <i>C. procera</i> . Fitoquímica y actividades microbiológicas y farmacológicas .....	- 19 -
1.5.1.2.	Antecedentes directos.....	- 20 -

2.	Hipótesis .....	- 22 -
3.	Objetivos .....	- 23 -
3.1.	Objetivo general.....	- 23 -
3.2.	Objetivos particulares .....	- 23 -
4.	Metodología .....	- 24 -
4.1.	Obtención del material vegetal.....	- 24 -
4.2.	Obtención, cuidado y manejo de los animales.....	- 24 -
4.3.	Tratamientos.....	- 25 -
4.4.	Preparación del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 25 -
4.5.	Inducción de la formación de úlceras gástricas. Determinación del efecto gastroprotector del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 25 -
4.6.	Evaluación del mecanismo gastroprotector del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 28 -
4.7.	Evaluación de la toxicidad subaguda del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 28 -
4.8.	Modelo de resolución de úlcera gástrica.....	- 30 -
4.8.1.	Determinación de manifestaciones tóxicas dentro del ensayo de resolución de úlcera gástrica del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 30 -
4.8.2.	Análisis histológico.....	- 31 -
4.9.	Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 31 -
4.9.1.	Determinación de la actividad anti- <i>H. pylori</i> .....	- 32 -
4.10.	Análisis estadístico .....	- 33 -
5.	Resultados y discusión .....	- 34 -
5.1.	Preparación del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 35 -
5.2.	Determinación del efecto gastroprotector del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 36 -
5.3.	Evaluación del mecanismo gastroprotector del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 42 -

5.3.1. Participación de las prostaglandinas dentro del mecanismo de gastroprotección del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 43 -
5.3.2. Participación del óxido nítrico dentro del mecanismo de gastroprotección del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 45 -
5.3.3. Participación de los grupos sulfhidrilos dentro del mecanismo de gastroprotección del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 48 -
5.3.4. Participación de los canales de potasio dependientes de ATP dentro del mecanismo de gastroprotección del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 50 -
5.4. Resolución de úlcera gástrica .....	- 54 -
5.4.1. Evaluación de la toxicidad subaguda del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 54 -
5.4.2. Modelo de resolución de úlcera gástrica .....	- 62 -
5.4.2.1. Determinación de manifestaciones tóxicas dentro del ensayo de resolución de úlcera gástrica del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 67 -
5.4.2.2. Análisis histológico de los estómagos del modelo de resolución de úlcera gástrica .....	- 68 -
5.5. Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 73 -
5.5.1. Actividad gastroprotectora de las fracciones del extracto metanólico.....	- 76 -
5.5.2. Determinación de la actividad anti- <i>H. pylori</i> de las fracciones primarias del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	- 81 -
6. Conclusiones.....	- 85 -
7. Perspectivas.....	- 87 -
8. Referencias .....	- 88 -

## I. Resumen

La corteza de *Cyrtocarpa procera* se utiliza en varias partes del país y tiene diversos usos dentro de la medicina tradicional mexicana, entre ellos, se emplea en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, como gastritis y úlcera péptica.

Se ha reportado que el extracto metanólico de esta corteza posee una muy buena actividad gastroprotectora (Escobedo-Hinojosa, *et al.*, 2012; Rosas-Acevedo, *et al.*, 2011), por lo que el presente estudio se realizó para determinar el posible mecanismo de gastroprotección del extracto metanólico de *C. procera* y su posible participación en el proceso de resolución de úlceras gástricas.

Con este propósito, en primer lugar se realizó una extracción metanólica exhaustiva de los metabolitos secundarios presentes en la corteza y se comparó la actividad gastroprotectora del extracto metanólico con la reportada previamente.

Para tratar de establecer el mecanismo de la acción gastroprotectora del extracto, se investigó el papel de las prostaglandinas, el óxido nítrico, los grupos sulfhidrilos y los canales de potasio dependientes de ATP, utilizando un modelo de úlcera gástrica inducida por etanol absoluto en ratón.

Los resultados sugieren que los cuatro mecanismos estudiados están involucrados en el efecto gastroprotector del extracto metanólico, sin embargo, tienen mayor participación las prostaglandinas y el óxido nítrico.

Por otra parte, para evaluar el efecto del extracto en un modelo subagudo de resolución de úlcera gástrica, se determinó, en primera instancia, su toxicidad subaguda en ratón, administrando por 20 días el extracto a las dosis de 10 100 y 1000 mg/kg. Una vez determinada su seguridad se procedió a realizar el modelo de resolución de úlcera gástrica inducida por etanol en el mismo tipo de roedor, administrando por el mismo período de tiempo el

extracto a una concentración de 100 mg/kg. Los resultados mostraron que la administración subaguda (20 días) de este extracto acelera el proceso de resolución de las úlceras gástricas al disminuir el número y la amplitud de las lesiones inducidas con etanol absoluto y mejorando la organización celular de la mucosa gástrica.

Finalmente, se trató de disminuir la complejidad del extracto metanólico realizando un fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de sílica gel, obteniendo 13 fracciones. Al determinar la actividad gastroprotectora de estas fracciones se encontró que hay más de un compuesto dentro del extracto que proporciona esta actividad. Por lo que se pretende continuar con el fraccionamiento para poder aislar y determinar cuáles son estos compuestos. Adicionalmente, se determinó la actividad anti-*Helicobacter pylori* de estas fracciones, algunas de las cuales presentaron una buena actividad contra esta bacteria, sin embargo, el rendimiento de estas fracciones resultó ser muy bajo.

Los resultados obtenidos en este trabajo aumentan el conocimiento acerca de las propiedades que posee *C. provera* para el tratamiento y prevención de las úlceras gástricas de etiología no bacteriana.

## II. Siglas y abreviaturas

A	Absorbencia
<i>A. adstringens</i>	<i>Amphipterygium adstringens</i>
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
<i>C. procera</i>	<i>Cyrtocarpa procera</i>
CAR	Carbenoxolona
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva media
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media
DM	Extracto de diclorometano
DM-MET	Extracto de diclorometano-metanol (1:1)
DMSO	Dimetil sulfóxido
EROS	Especies reactivas de oxígeno
EEM	Error estándar de la media
Glib	Glibenclamida
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HEX	Extracto hexánico
IBP	Inhibidores de la bomba de protones
Indo	Indometacina
IC	Intervalo de confianza
IG	Vía de administración intragástrica
IP	Vía de administración intraperitoneal
IU	Índice de úlcera
L-NAME	Éster metílico de la nitro-L-arginina
MET	Extracto metanólico
NEM	N-etilmaleimida
NO	Óxido nítrico
PAS	Ácido periódico de Shiff
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
SC	Vía de administración subcutanea



### III. Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Información taxonómica de <i>C. procera</i> .....	18
<b>Tabla 2.</b> Efecto gastroprotector del extracto metanólico a diferentes dosis .....	37
<b>Tabla 3.</b> Efecto gastroprotector de carbenoxolona a diferentes dosis.....	38
<b>Tabla 4.</b> Peso de diferentes órganos de los ratones después de ser tratados con el extracto metanólico durante 20 días y después de 15 días de observación posteriores al tratamiento .....	59
<b>Tabla 5.</b> Peso relativo de diferentes órganos de los ratones después de ser tratados con el extracto metanólico durante 20 días y después de 15 días de observación posteriores al tratamiento .....	60
<b>Tabla 6.</b> Valores hematológicos de los ratones después de ser tratados con el extracto metanólico durante 20 días y después de 15 días de observación posteriores al tratamiento.....	61
<b>Tabla 7.</b> Peso y rendimiento de las fracciones obtenidas en el Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	74
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de gastroprotección de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento primario del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	76
<b>Tabla 9.</b> Actividad anti- <i>H. pylori</i> del extracto metanólico íntegro y sus fracciones primarias .....	83

#### IV. Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Regiones del estómago. ....	1
<b>Figura 2.</b> Capas de la pared gástrica. ....	2
<b>Figura 3.</b> Estructura de la glándula gástrica del fondo y cuerpo del estómago. ....	4
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de la resolución de úlceras. ....	12
<b>Figura 5.</b> Regiones del estómago de ratón. ....	26
<b>Figura 6.</b> Procedimiento para la extirpación del estómago de ratón. ....	27
<b>Figura 7.</b> Preparación del extracto metanólico de <i>C. procera</i> . ....	35
<b>Figura 8.</b> Efecto antiulcerogénico del extracto metanólico en un modelo de úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto en ratón. ....	38
<b>Figura 9.</b> Efecto gastroprotector de la carbenoxolona a diferentes dosis en un modelo de úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto en ratón. ....	39
<b>Figura 10.</b> Fotos representativas del daño inducido por etanol absoluto en la mucosa gástrica de ratón y de la actividad gastroprotectora del extracto metanólico y de la carbenoxolona. ....	41
<b>Figura 11.</b> Efecto del pretratamiento con Indometacina sobre la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico. ....	44
<b>Figura 12.</b> Fotos representativas del efecto que tiene la administración del extracto metanólico y carbenoxolona en la aparición de lesiones hemorrágicas gástricas inducidas por etanol absoluto en ratones pretratados con indometacina. ....	45
<b>Figura 13.</b> Efecto del pretratamiento con L-NAME sobre la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico. ....	46
<b>Figura 14.</b> Fotos representativas del efecto que tiene la administración del extracto metanólico y carbenoxolona en la aparición de lesiones hemorrágicas gástricas inducidas por etanol absoluto en ratones pretratados con L-NAME. ....	47
<b>Figura 15.</b> Efecto del pretratamiento con NEM sobre la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico. ....	49

<b>Figura 16.</b> Fotos representativas del efecto que tiene la administración del extracto metanólico y carbenoxolona en la aparición de lesiones hemorrágicas gástricas inducidas por etanol absoluto en ratones pretratados con NEM. ....	50
<b>Figura 17.</b> Efecto del pretratamiento con glibenclamida sobre la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico. ....	51
<b>Figura 18.</b> Fotos representativas del efecto que tiene la administración del extracto metanólico y carbenoxolona en la aparición de lesiones hemorrágicas gástricas inducidas por etanol absoluto en ratones pretratados con glibenclamida. ....	52
<b>Figura 19.</b> Resumen del efecto de los cuatro pretratamientos sobre la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico. ....	53
<b>Figura 20.</b> Peso corporal de los ratones durante el ensayo de toxicidad subaguda del extracto metanólico de <i>C. procera</i> . ....	56
<b>Figura 21.</b> Evolución de la resolución de úlcera gástrica con el tratamiento de extracto metanólico durante 20 días consecutivos. ....	63
<b>Figura 22.</b> Efecto de resolución de úlcera gástrica al día 20 tras el tratamiento consecutivo con el extracto metanólico a 100 mg/kg/día, carbenoxolona a 50 m/kg/día y solución salina como control comparado con el daño inducido por la administración de etanol absoluto (t= 0 días). ....	64
<b>Figura 23.</b> Imágenes representativas de apariencia de la mucosa gástrica normal y la mucosa gástrica con un daño inducido por la administración aguda de etanol absoluta una dosis de 7mL/kg. ....	65
<b>Figura 24.</b> Fotos representativas de la evolución en la resolución de úlceras gástricas al administrar el extracto metanólico, durante 20 días consecutivos. ....	66
<b>Figura 25.</b> Peso corporal de los ratones durante la realización del modelo de resolución de úlcera gástrica inducida por etanol absoluto en ratón. ....	68
<b>Figura 26.</b> Análisis histológico de la mucosa gástrica de un ratón normal, del daño causado por la administración de etanol absoluto y de ratones tratados con carbenoxolona y el extracto metanólico durante 20 días después de la inducción de úlceras gástricas con etanol absoluto. ....	71

<b>Figura 27.</b> Análisis histoquímico de la mucosa gástrica de un ratón normal, del daño causado por la administración de etanol absoluto y de ratones tratados con carbenoxolona y el extracto metanólico durante 20 días después de la inducción de úlceras con etanol absoluto .....	72
<b>Figura 28.</b> Análisis por cromatografía en capa fina del fraccionamiento primario del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	75
<b>Figura 29.</b> Efecto gastroprotector de algunas de las fracciones del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	77
<b>Figura 30.</b> Fotos representativas de la actividad gastroprotectora de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento primario del extracto metanólico de <i>C. procera</i> .....	78
<b>Figura 31.</b> Análisis por cromatografía en capa fina del extracto metanólico y las fracciones F1 a F5 comparados con una referencia de $\beta$ -sitosterol.....	81

## 1. Introducción

### 1.1. Anatomía y fisiología del estómago

El estómago se define como la parte expandida del tubo digestivo que se encuentra entre el esófago y el intestino delgado. En él se almacenan transitoriamente los alimentos ingeridos y su función principal es la digestión enzimática. De manera general, el estómago puede dividirse en cuatro regiones, el cardias, fondo, cuerpo y antro (Moore, *et al.*, 2010), tal y como se aprecia en la Figura 1.

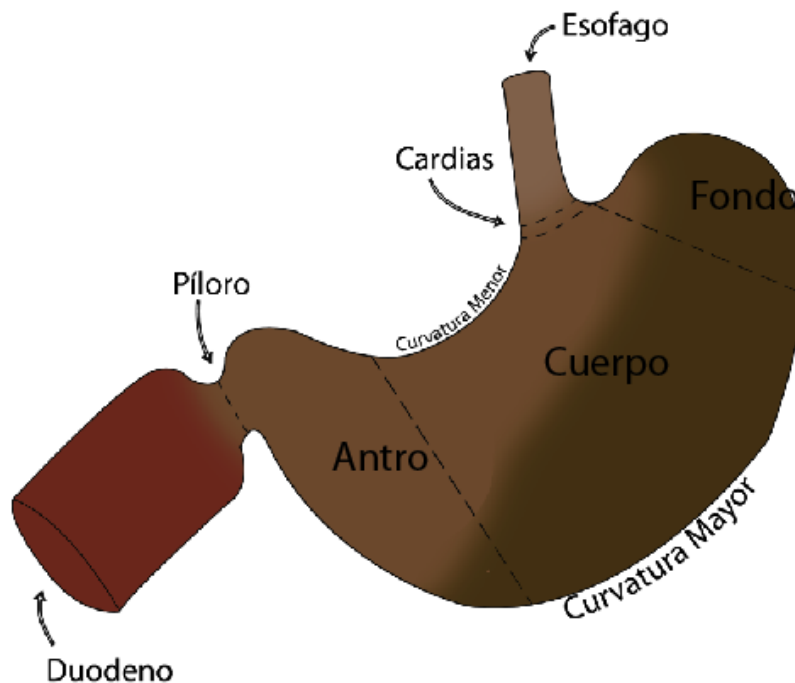
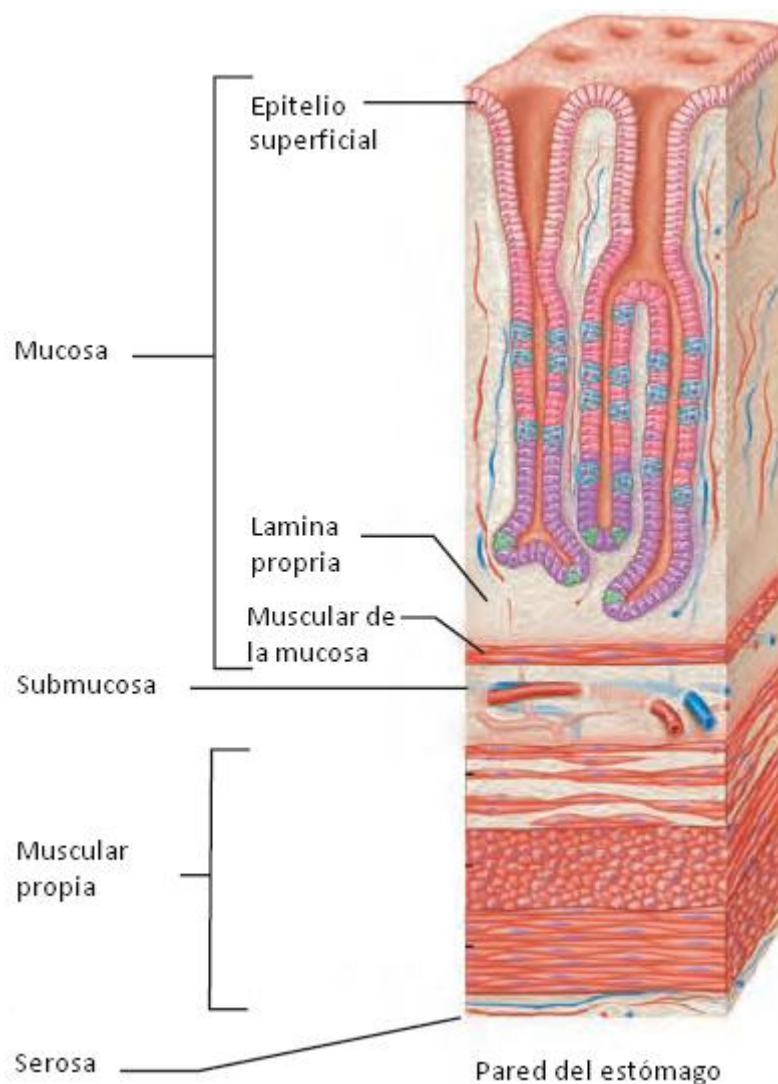


Figura 1. Regiones del estómago

- **Cardias:** se refiere a la porción que rodea la abertura superior del estómago, por donde los alimentos entran al mismo provenientes del esófago.
- **Fondo:** es la parte superior del estómago. Al encontrarse en posición erguida, por lo general se encuentra una burbuja de aire.
- **Cuerpo:** se trata de la porción más grande del estómago.

- **Antro:** es la última parte del estómago que se encuentra entre el cuerpo de éste y el píloro. El píloro por su parte, es un esfínter que se encuentra en el límite entre el estómago y el duodeno, que controla la salida del contenido gástrico.

A lo largo de todo el estómago se pueden encontrar cuatro capas (Figura 2) que componen la pared gástrica (García, *et al.*, 2010):



**Figura 2.** Capas de la pared gástrica (Tomado y modificado de Marieb y Hoehn, 2010)

- **Serosa:** es la capa más superficial, se compone de tejido conectivo laxo y rodea a todo el estómago.

- **Muscular propia:** genera las contracciones que favorecen el tránsito de los alimentos.
- **Submucosa:** se compone de tejido conectivo denso y contiene los vasos sanguíneos, linfáticos y terminaciones nerviosas.
- **Mucosa:** es la capa que está rodeando la luz gástrica y se divide a su vez en tres subcapas: el epitelio superficial, que tiene la función de proteger contra agentes agresivos; la lámina propia, que contiene glándulas secretoras; capa muscular de la mucosa.

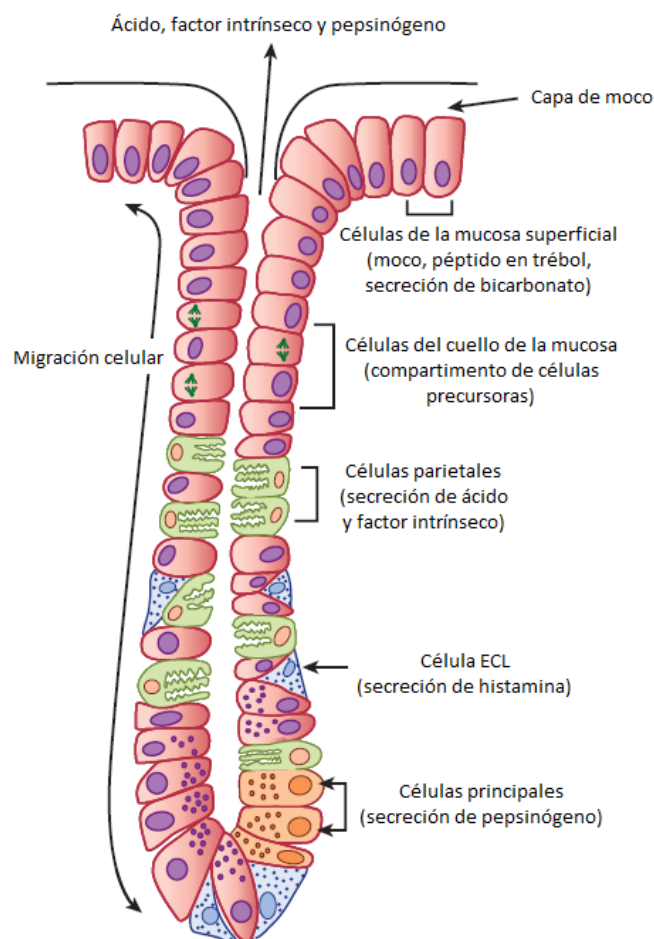
El epitelio superficial en el interior del estómago se compone solamente de células mucosas. Estas células producen una densa capa de moco que protege toda la superficie de la mucosa gástrica. Este epitelio se encuentra plegado, de tal manera que se forman pliegues en la luz del estómago que se denominan fosas gástricas. Dentro de las fosas gástricas se encuentran varias células que secretan diversos productos hacia la luz del estómago, estas células forman las glándulas gástricas (Barrett, *et al.*, 2010; Marieb y Hoehn, 2010).

Las células que componen las glándulas gástricas van a variar de acuerdo a la zona del estómago en la que se encuentren. De manera general, las células que componen las glándulas del cardias y el píloro son principalmente productoras de moco. En las glándulas que se encuentran en el antro se encuentran células productoras de moco y gastrina, principalmente. En la zona del cuerpo y el fondo del estómago se produce la mayor cantidad de secreciones gástricas, entre ellas una gran cantidad de ácido clorhídrico (Marieb y Hoehn, 2010).

La composición celular de las glándulas gástricas (Figura 3) se describe a continuación (Fox, 2011; Marieb y Hoehn, 2010):

- **Células mucosas del cuello:** como lo indica su nombre, estas células se encuentran en el cuello de las glándulas y que, a diferencia de la células mucosas superficiales que generan moco insoluble, secretan moco soluble.

- **Células parietales:** secretan ácido clorhídrico y factor intrínseco.
- **Células principales:** secretan pepsinógeno, el cual es una forma inactiva de la pepsina, y que se activa en presencia de ácido clorhídrico.
- **Células tipo enterocromafines:** liberan mensajeros químicos hacia el fluido intersticial de la lámina propia, como son la histamina, que activa la secreción de ácido clorhídrico por las células parietales, y la serotonina, que provoca contracciones en la musculatura del estómago.
- **Células G:** secretan gastrina, que es una hormona que estimula la secreción del ácido gástrico, y que llega hacia el torrente sanguíneo.
- **Células D:** secretan somatostatina, hormona que inhibe la liberación de histamina y gastrina, que, como consecuencia, inhibe la secreción de ácido gástrico.



**Figura 3.** Estructura de la glándula gástrica del fondo y cuerpo del estómago (Tomado y modificado de Barrett, *et al.*, 2010)



## **1.2. Secreciones gástricas**

Dentro del estómago se genera una gran cantidad de secreciones gástricas que preparan al organismo para la digestión y una buena asimilación de los nutrientes. Estas secreciones gástricas son producidas y liberadas por las glándulas de la mucosa gástrica, generándose principalmente moco y bicarbonato con el propósito de proteger al estómago tanto de las secreciones propias, como de agentes agresivos externos, tales como los alimentos, fármacos y microorganismos. Entre las secreciones glandulares más características en la fisiología normal del estómago se encuentran el ácido clorhídrico, factor intrínseco, pepsinógeno y la lipasa gástrica, todas ellas asociadas a la digestión. La ingesta de alimentos activa la secreción del ácido hacia la luz del estómago y comienza la hidrólisis de macromoléculas de los alimentos, además el factor intrínseco ayuda en la absorción de la vitamina B12; el pepsinógeno, precursor de la pepsina, comienza con la digestión de proteínas y la lipasa con la de los lípidos (Barrett, *et al.*, 2010; Waldman y Terzic, 2010).

## **1.3. Mecanismos de defensa de la mucosa gástrica**

Para que la mucosa gástrica pueda resistir los agentes nocivos con los que está en contacto, como son los alimentos y sustancias que se ingieren, así como las secreciones endógenas del estómago, existen una serie de factores que la protegen de una variada y frecuente exposición a estos agentes, que pueden ser de diferente pH, osmolaridad y temperatura, así como propiedades detergentes y productos bacterianos. Además, si estos factores de protección no son suficientes y la mucosa llega a sufrir algún daño, existen también mecanismos para poder repararla (Wallace y Granger, 1996).

Entre los factores que protegen la mucosa gástrica de los agentes injuriantes y la autodigestión se encuentran principalmente la secreción de moco gástrico y de bicarbonato, la barrera epitelial, la estimulación de fibras nerviosas, la síntesis de prostaglandinas, citosinas y un adecuado flujo sanguíneo de la mucosa (Ham y Kauntz, 2007; Kumar, *et al.*, 2005).

Se considera que la síntesis de prostaglandinas, en particular la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), es uno de los mecanismos de gastroprotección más importantes, debido a que su efecto se basa en intensificar los factores de defensa propios de la mucosa gástrica. Estos factores incluyen la secreción de moco gástrico y bicarbonato, así como la regulación del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica (Miller, 1983).

Existen reportes de que las prostaglandinas también juegan un papel importante dentro de la resolución de las úlceras (Konturek, 2005). PGE<sub>2</sub> promueve la curación de las úlceras al incrementar la angiogénesis y se cree que también podría promover la proliferación y la migración de las células epiteliales, con lo que contribuye a la reconstrucción de las zonas ulceradas en la mucosa (Hatazawa, 2007).

El óxido nítrico (NO) endógeno también tiene un papel importante dentro del mantenimiento de la integridad del epitelio gástrico (Whittle, *et al.*, 1990). El NO induce un efecto gastroprotector debido a que regula el flujo sanguíneo, estimula la síntesis de prostaglandinas (Matsuda, 1999), reduce la secreción ácida (Kitamura, *et al.*, 1999), modula la liberación de moco gástrico (Brown, *et al.*, 1992), y juega un papel importante en el mantenimiento del flujo sanguíneo y la angiogénesis del tejido de granulación cuando se presenta un daño en la mucosa gástrica, por lo que es un factor indispensable en la resolución de las úlceras gástricas (Konturek, *et al.*, 1993).

La acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROS) daña la mucosa gástrica y duodenal debido a que su mecanismo de acción incluye la lipoperoxidación (que destruye las membranas celulares), la alteración del metabolismo celular y el daño al ADN, por lo que están implicadas en el desarrollo y la recurrencia de úlceras pépticas. El secuestro de EROS estimula la curación de las úlceras y reduce la recurrencia de ulceración (Demir, *et al.*, 2003; Salim, 1994).

## **1.4. Patologías del tracto gastrointestinal**

Cuando se genera una secreción excesiva del ácido clorhídrico gástrico o un decremento de los agentes de defensa de la mucosa gástrica pueden presentarse diversos trastornos que pueden afectar el estómago, el esófago o el duodeno, como son el reflujo gastroesofágico, la gastritis y las úlceras pépticas (Waldman y Terzic, 2010). Debido al interés del presente trabajo, se tratarán con más detalle las dos últimas patologías.

### **1.4.1. Gastritis**

La gastritis se refiere a una inflamación en la mucosa gástrica. Puede dividirse en gastritis aguda o crónica dependiendo de las características propias de la inflamación. La gastritis aguda se refiere a una inflamación en la mucosa que se resuelve en corto tiempo, caracterizada por una infiltración de neutrófilos que puede o no estar acompañada por hemorragia en la mucosa y que puede ser causada por antiinflamatorios no esteroideos (AINES), consumo excesivo de alcohol, fumar, el estrés, etc. En la gastritis crónica se presenta una inflamación que puede persistir por largo tiempo, con una infiltración predominante de linfocitos, que está asociada a la atrofia de la mucosa y metaplasia intestinal, pero sin provocar erosiones. Este tipo de gastritis puede ser provocada por infección crónica de *Helicobacter pylori*, consumo de alcohol, el fumar, etc. (Kumar, *et al.*, 2005).

### **1.4.2. Úlcera péptica**

Dentro de las patologías del tracto gastrointestinal, la úlcera péptica es una de las más relevantes debido a su incidencia a nivel mundial, se estima que cerca del 20% de la población mundial sufren de úlcera péptica en alguna etapa de su vida, lo que se ve reflejado en un impacto económico debido a su morbilidad y el costo de su tratamiento. Los factores que pueden predisponer la aparición de una úlcera péptica son muy variados y van desde el estrés, la dieta, consumo del tabaco y alcohol, así como la administración de algunos fármacos (Bucciarelli y Skliar, 2007). Sin embargo, cerca del 80% de los casos

de úlcera péptica son causados por *H. pylori*. La infección por esta bacteria está relacionada además con el adenocarcinoma y linfoma gástrico, y coloniza a más de la mitad de la población mundial. El 20% restante de los casos de úlcera péptica está relacionado en su mayor parte con el consumo de AINES (Atherton, 2006).

El término de úlcera péptica se refiere a una lesión benigna de la mucosa gástrica o duodenal que ocurre en algún sitio en donde el epitelio de la mucosa se encuentra expuesto a algún agente dañino, como el ácido gástrico o la pepsina (Andrade, *et al.*, 2007). Por lo que puede decirse que las úlceras pépticas se producen por un desequilibrio entre los factores de defensa de la mucosa gastroduodenal y los factores que pueden dañarla. Este daño en la mucosa se extiende desde la muscular de la mucosa y hasta la submucosa o zonas más profundas y puede aparecer prácticamente en cualquier parte del tracto gastrointestinal, sin embargo, lo más común es que se encuentre en el estómago o en el duodeno, en donde la mucosa está más expuesta a factores agresivos (Kumar, *et al.*, 2005).

Las úlceras se originan cuando se provoca algún daño vascular, lo que origina isquemia de la mucosa, disminución en el aporte de nutrientes y la formación de radicales libres, que como consecuencia, producen necrosis en el tejido. La aparición del tejido necrosado desata una respuesta inflamatoria y todo un proceso complejo para la resolución de la úlcera (Tarnawski, 2005).

La mayoría de los casos de úlceras duodenales se presenta entre los 20 y los 50 años de edad, mientras que las úlceras gástricas se presentan en personas mayores de 40 años. Por otro lado, se estima que cerca del 90% de las úlceras duodenales y entre el 70 y el 90% de las úlceras gástricas son generadas por una infección por *H. pylori* (Waldman y Terzic, 2010).

No existen estudios epidemiológicos en donde se reporte la frecuencia de este padecimiento en México. Sin embargo, existen varios estudios que nos dan una idea de lo trascendental que es ésta enfermedad en nuestro país. Para el 2007 las úlceras, gastritis y duodenitis se encontraban dentro de los 5

primeros lugares de morbilidad, con un total de 1483232 casos reportados a nivel nacional (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/SS) y para el 2008, se encontraban entre las 20 principales causas de mortalidad general en el Distrito Federal (secretaría de Salud del Distrito Federal/INEGI).

#### **1.4.2.1. Úlceras inducidas por *H. pylori***

*H. pylori* juega un papel muy importante dentro de las patologías gástricas y duodenales, como son la gastritis crónica, la úlcera péptica, carcinoma gástrico y linfoma gástrico MALT. La infección se adquiere comúnmente durante edades tempranas, pero puede persistir por décadas (Kumar, *et al.*, 2005).

*H. pylori* es un bacilo gram negativo que se puede encontrar en forma espiral o curvada. Esta bacteria cuenta con varias características especiales y factores de virulencia que le permiten colonizar el estómago humano. Entre ellos se encuentran sus flagelos (2-6) que le proporcionan la motilidad necesaria para penetrar la capa de moco gástrico y alojarse en el estómago, especialmente en el antro. La enzima ureasa, que le permite incrementar el pH de su microambiente para poder sobrevivir al medio ácido del estómago. Produce además una serie de factores de virulencia como la citosina vacuolizante (*vacA*) que provoca daño en el epitelio gástrico y adhesinas que le permiten anclarse al epitelio de la mucosa gástrica, entre otras (Atherton, 2006; Brown, 2000).

La infección por *H. pylori* puede incrementar la secreción de ácido gástrico. La fijación de las bacterias a las células epiteliales desencadena una respuesta inflamatoria que se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos y linfocitos y la generación de ciertos mediadores como la IL-8, los factores de necrosis tumoral alfa, IL-1 e IL-6 que conducen al daño en la mucosa gástrica. Como resultado se presenta una inflamación crónica que incrementa el recambio de las células epiteliales y la apoptosis (Waldman y Terzic, 2010).

Las vías de transmisión de esta bacteria aún no se conocen con certeza, sin embargo existen estudios que demuestran que hay una relación entre la infección por *H. pylori* y las deficientes prácticas de higiene, especialmente durante la niñez. Entre las posibles rutas de transmisión se encuentran la oral-oral, que son más frecuentes entre familias y poblaciones institucionalizadas y que incluyen la transmisión por saliva, placa dental y reflujo gástrico o vómito; la fecal-oral y la difusión ambiental, que puede incluir la difusión de la bacteria por el agua (Brown, 2000).

Factores como la edad y el estatus socioeconómico tienen influencia sobre la prevalencia de la infección por *H. pylori*. También se ha observado que la adquisición de la bacteria se da a edades más tempranas en países en vías de desarrollo (Brown, 2000).

En un estudio epidemiológico realizado en México para determinar la prevalencia de la infección por *H. pylori* en todo el país, se determinó que cerca del 66% de la población es seropositiva. Además, se encontró que dentro de los factores de riesgo de mayor impacto en esta población se encuentra la edad de las personas, estimando que alrededor del 20% de la población se encuentra infectada con solo 1 año de edad, mientras que para los 10 años es el 50 %. Otros factores de riesgo importantes son el bajo nivel de educación y el bajo nivel socioeconómico (Torres, *et al.*, 1998).

#### **1.4.2.2. Úlceras inducidas por AINES**

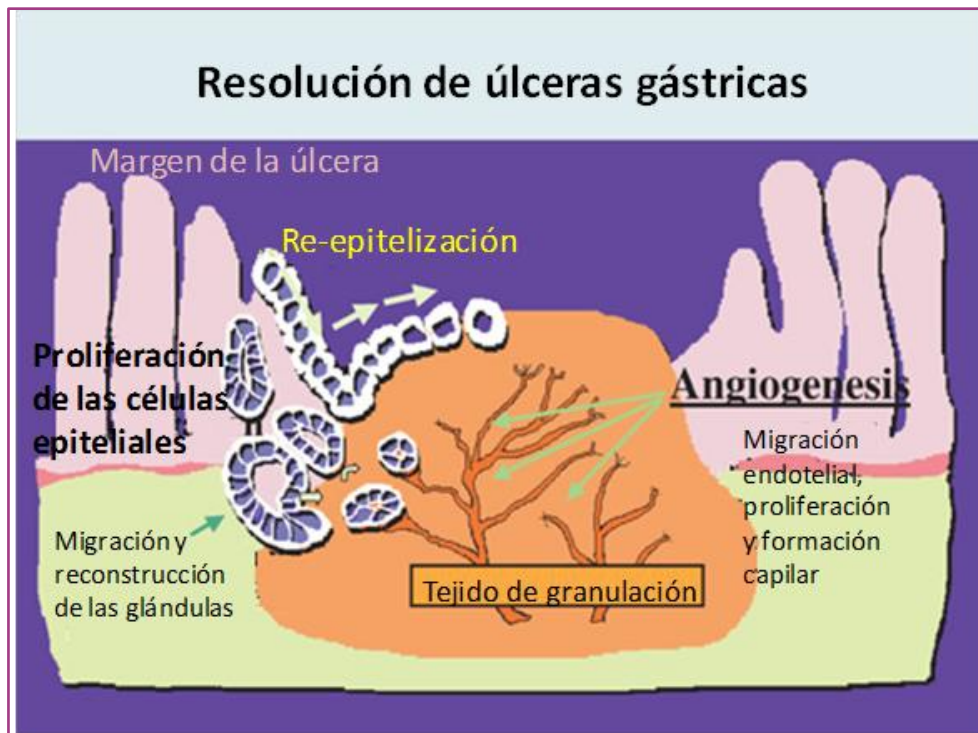
La administración de AINES, como son la aspirina o la indometacina, pueden inducir la formación de úlceras al inhibir la síntesis de prostaglandinas, interrumpiendo la vía de las ciclooxygenasas. Dentro de los mecanismos de protección del tracto gastrointestinal, las prostaglandinas juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la microvasculatura de la mucosa, la regulación de la división celular y la secreción de moco y bicarbonato (Hayllar y Bjarnason, 1995). Por lo que al inhibir la síntesis de prostaglandinas mediante la administración de AINES se disminuyen los factores protectores y se incrementa la susceptibilidad de la mucosa gástrica

para sufrir alguna lesión y llegar a la formación de úlceras (Waldman y Terzic, 2010).

La administración de AINES además de inducir la formación de úlceras también retarda la resolución de éstas al disminuir la síntesis de prostaglandinas, además de disminuir la proliferación celular, la angiogénesis y la maduración del tejido de granulación (Schmassmann, *et al.*, 1995).

#### **1.4.2.3. Resolución de las úlceras gástricas**

El proceso de resolución de úlceras es controlado por la expresión de factores de crecimiento, que es inducida por respuestas inflamatorias al producirse una lesión en la mucosa gástrica. Dentro de este proceso se lleva a cabo la re-epitelización de la mucosa en el área en donde se encuentra la lesión. Esto se lleva a cabo gracias a que las células de las glándulas cercanas a la úlcera comienzan a proliferar y migran hacia el tejido de granulación para la re-epitelización de la superficie de la mucosa y la reconstrucción de las glándulas gástricas. El proceso de re-epitelización es de gran importancia para poder proteger al tejido de granulación de los agentes externos que puedan seguir dañando el tejido y de esta manera mejorar el proceso de resolución de la úlcera. El tejido de granulación se conforma de células de tejido conectivo proliferante y se genera desde la base de la úlcera. En este tejido se forman nuevos vasos sanguíneos debido a que hay una inducción de la angiogénesis, la cual es esencial para la resolución de las úlceras, ya que con ella se restaura la microcirculación de la mucosa y con ello un correcto aporte de oxígeno y nutrientes. Posteriormente, el tejido de granulación es reemplazado por tejido conectivo para la formación de una cicatriz (Tarnawski, 2005). Parte del proceso de resolución de úlceras representa gráficamente en la Figura 4.



**Figura 4.** Representación esquemática de la resolución de úlceras (Tomado y modificado de Tarnawski, 2005)

Después del proceso de resolución de la úlcera el tejido puede cicatrizar con ciertas anomalías debidas a factores de predisposición a la recurrencia de la úlcera. Algunas de estas anomalías pueden ser un incremento en tejido conectivo, una desorganización en la microvasculatura y un incremento en la permeabilidad vascular, factores que pueden disminuir la capacidad de defensa de la mucosa. La administración de algunos fármacos como los antiácidos pueden mejorar la calidad de la resolución de las úlceras (Tarnawski, 2005).

#### 1.4.2.4. Modelos de inducción de úlceras

Es de gran importancia contar con modelos experimentales en los que se pueda estudiar una respuesta farmacológica que se asemeje a la que se da en los humanos, ya que este es el primer paso en la búsqueda de nuevos agentes que formen parte de una tratamiento para diversos padecimientos, en este caso, para el tratamiento de úlceras. Existen varios modelos



experimentales de inducción de la formación de úlceras gástricas en animales. Algunos de los modelos comúnmente utilizados se describen a continuación:

#### **1.4.2.4.1. Modelo de úlcera gástrica inducida por ácido acético**

Se trata de uno de los modelos de inducción de úlcera más utilizados por la comunidad científica. En este modelo se realiza una laparotomía y se inyecta ácido acético directamente en la submucosa en la porción glandular del estómago. Con este procedimiento se asegura la formación de úlceras consistentes en tamaño y severidad, además de que, debido a sus características patológicas y el proceso de curación, se asemejan mucho a las úlceras de la mucosa gástrica humana (Okabe y Amagase, 2005).

#### **1.4.2.4.2. Modelo de inducción de úlceras por etanol**

El etanol es ampliamente utilizado para inducir la formación de úlceras en modelos experimentales con animales. Las lesiones inducidas por etanol están relacionadas con cambios en el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica. Altas concentraciones de etanol provocan una disminución en el flujo sanguíneo al inducir la contracción venosa en la mucosa y una subsecuente dilatación arteriolar (Masuda, 1995). La administración de etanol actúa aumentando la síntesis de LTC<sub>4</sub>, lo que provoca cambios en la microcirculación de la mucosa como son la estasis y la fuga plasmática (Peskar, 1986).

El daño inducido por el etanol está mediado en gran parte por la producción de radicales libres, creando así un considerable estrés oxidativo, siendo el radical hidroxilo uno de los agentes más importantes y el responsable de la patogénesis del daño generado en la mucosa gástrica (Mutoh, *et al.*, 1990). La administración de etanol también está relacionada con una reducción en la concentración de grupos sulfhidrilos, con lo que se aumenta la susceptibilidad de la mucosa gástrica a ser lesionada (Loguercio, *et al.*, 1993).

#### **1.4.2.5. Tratamientos para las úlceras pépticas**

De acuerdo a la gravedad de las úlceras en los pacientes, como parte del tratamiento se puede llegar a requerir una cirugía (Feldman, *et al.*, 2002). Sin embargo, los tratamientos para este tipo de padecimientos, básicamente consiste en controlar la secreción excesiva de ácido gástrico, la protección de la mucosa gástrica y la erradicación de *H. pylori*, en caso de existir la infección. Durante el tratamiento se busca el alivio del dolor, lograr la cicatrización de la lesión y evitar las recaídas y complicaciones (Sweetman, 2006).

##### **1.4.2.5.1. Inhibidores del ácido gástrico**

- **Antiácidos**

Los antiácidos actúan aumentando el pH del estómago, al neutralizar el ácido clorhídrico gástrico e inhibiendo la actividad de la pepsina. Este tipo de tratamientos tiene una baja eficiencia en la curación de las úlceras pépticas, además de una falta de apego del tratamiento por parte de los pacientes, ya que deben ser administrados por varios días. Algunos agentes que se usan comúnmente son el hidróxido de aluminio y el hidróxido de magnesio (Waldman y Terzic, 2010).

- **Antagonistas de los receptores H<sub>2</sub>**

Este tipo de agentes actúan disminuyendo tanto la producción basal de ácido gástrico como la producción de ácido estimulada por histamina, pentagastrina y por la ingesta de alimentos. Los antagonistas receptores de H<sub>2</sub> son análogos estructurales reversibles de la histamina, la cual es el principal agente regulador de la secreción de ácido gástrico. Por lo que al impedir la interacción de la histamina con su receptor en las células de la mucosa gástrica se inhibe la secreción de ácido. Algunos ejemplos de fármacos antagonistas de receptores H<sub>2</sub> son la cimetidina y la ranitidina (Villalobos, *et al.*, 2006; Waldman y Terzic, 2010).

- **Inhibidores de la bomba de protones (IBP)**

Estos fármacos también reducen la secreción de ácido gástrico, pero en este caso se debe a una inhibición irreversible de las bombas de H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa en la membrana de las células parietales, que son enzimas responsables de la liberación de iones hidrógeno para la secreción del ácido gástrico. Además, al disminuir la acidez del estómago, los inhibidores de la bomba de protones también disminuyen la secreción de pepsina, con lo que disminuye aún más los agentes agresivos para la mucosa gástrica. Los fármacos más representativos de este grupo son el omeprazol, lansoprazol y pantoprazol (Waldman y Terzic, 2010).

#### **1.4.2.5.2. Agentes protectores de la mucosa gástrica**

- **Sucralfato**

Se trata de un medicamento a base de sacarosa sulfatada con ocho moléculas de sulfato de aluminio que se adhiere a la superficie de la mucosa gástrica y la protege de agentes irritantes. Este agente estimula la secreción de moco y bicarbonato (agentes que contribuyen a la protección de la mucosa) y se cree que puede unirse a las proteínas de las células en donde se haya formado una úlcera estimulando la formación de tejido de granulación y la angiogénesis (Villalobos, *et al.*, 2006; Waldman y Terzic, 2010).

- **Sales de bismuto**

El salicilato de bismuto tiene varios efectos que ayudan en el tratamiento de las úlceras pépticas, entre ellas tiene cierto efecto antiinflamatorio y antiácido, inhibición de la actividad de la pepsina, aumento en la producción de prostaglandinas y aumento en la secreción de moco y bicarbonato. Se forman complejos con el moco que recubre las zonas de la mucosa dañada, lo cual probablemente provee protección frente a la agresión acidopéptica. También se ha reportado que tiene un efecto bactericida en contra de *H. pylori*, debido a la formación de complejos de bismuto con la pared bacteriana de este microorganismo, lo que provoca la inhibición de ciertas enzimas de la bacteria necesarias para la colonización del estómago (Feldman, *et al.*, 2002; Waldman y Terzic, 2010).

- **Análogos de prostaglandinas**

Este tipo de fármacos actúan inhibiendo la producción de pepsina y la secreción de ácido gástrico basal y la estimulada por la ingesta de alimento. Por otro lado, actúa aumentando los mecanismos de defensa de la mucosa gástrica, por ejemplo, aumenta la producción de moco y bicarbonato y estimula un correcto flujo sanguíneo. El misoprostol es un ejemplo de este grupo de fármacos, el cual es un análogo de PGE<sub>2</sub> (Villalobos, *et al.*, 2006; Waldman y Terzic, 2010).

- **Carbenoxolona**

Carbenoxolona es un derivado sintético del ácido glicirrízico, del cual se ha reportado actividad antiulcerogénica, tanto en modelos animales como en seres humanos, sin inhibir la secreción ácida gástrica (Baron, 1977), además de que actúa facilitando la curación de las úlceras gástricas (Doll, *et al.*, 1965).

Existen diversos estudios en donde se prueba la actividad de la carbenoxolona, entre ellos, se ha reportado que su administración reduce la actividad péptica (Henman, 1970), incrementa la secreción de moco gástrico (Goodier, *et al.*, 1967), incrementa el tiempo de vida de las células del epitelio gástrico (Lipkin, 1971), incrementa la producción de prostaglandinas (Takeuchi, *et al.*, 1998) y aumenta el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica (Guslandi, 1994).

Por lo anterior, se puede pensar que la carbenoxolona actúa protegiendo y facilitando la curación de las úlceras al disminuir la capacidad digestiva del jugo gástrico e incrementando la resistencia de la mucosa gástrica (Perkins y Vars, 1973).

#### **1.4.2.5.3. Erradicación de la infección por *H. pylori***

El tratamiento de primera línea (terapia triple): consiste en la administración de un inhibidor de la bomba de protones (IBP) y dos antibióticos, que pueden ser metronidazol, tetraciclina, amoxicilina o claritromicina, por un periodo de 7 a 14 días. La eficacia en la erradicación de *H. pylori* con este

tratamiento es de un 80%, para el 20% restante se recurre a la terapia cuádruple.

Tratamiento de segunda línea (terapia cuádruple): se administra un inhibidor de la bomba de protones, dos antibióticos diferentes a los de la terapia triple y sales de bismuto (Gisbert, 2011).

Para la elección de los antibióticos en este tipo de terapias debe considerarse el índice de resistencia bacteriana para cada antibiótico en cada población. Los IBP además de proteger la mucosa gástrica debido a la disminución de la secreción ácida también optimizan la actividad de los antibióticos al generar un ambiente con un pH más adecuado (Waldman y Terzic, 2010).

Los tratamientos tanto para la erradicación de *H. pylori* como para la curación de las úlceras son muy largos y pueden durar desde una a ocho semanas. Esto se traduce en la administración de una gran cantidad de medicamentos, de dinero invertido y en ocasiones la aparición de efectos secundarios e incluso acciones contrarias a las deseadas. El interés por mejorar la eficacia y la disminución de los efectos secundarios y el costo de estos tratamientos ha aumentado el interés por la búsqueda de nuevos agentes que puedan ayudar o incluso reemplazar los tratamientos ya existentes. La búsqueda de estos agentes dentro de los productos naturales, especialmente en las plantas ha tomado gran importancia (Bucciarelli y Skliar, 2007).

### **1.5. Uso de productos naturales**

El uso de plantas para el tratamiento de problemas de la salud es una práctica que se ha dado en todo el mundo. En México, el uso de plantas medicinales es una actividad ampliamente difundida, entre las especies utilizadas para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales se encuentra *Cyrtocarpa procera* (Argueta, *et al.*, 1994).

### 1.5.1. Uso de *Cyrtocarpa procera*

*Cyrtocarpa procera* Kunth, pertenece a la familia Anacardiaceae (Tabla 1) comúnmente llamada chupandilla o copalcojote, se trata de un árbol originario de México de aproximadamente 6 m de altura, se encuentra distribuido principalmente en los estados de Nayarit, Jalisco, Michoacán, México, Puebla, Morelos, Guerrero y Oaxaca (Argueta, *et al.*, 1994).

**Tabla 1.** Información taxonómica de *C. procera*

Reino	<i>Plantae</i>
Phylum	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Sapindales</i>
Familia	<i>Anacardiaceae</i>
Género	<i>Cyrtocarpa</i>
Especie	<i>Cyrtocarpa procera</i>

La corteza de *C. procera* es utilizada como parte de la medicina tradicional mexicana, tiene una gran variedad de usos, que van desde el tratamiento de padecimientos del aparato digestivo, como son la diarrea y disentería, hasta para lograr una mejor cicatrización en heridas y llagas. Estos usos varían de acuerdo a la región.

No solo se administra vía oral, sino que se recomienda masticarla para tratar el dolor de muelas y para curar la tos (Argueta, *et al.*, 1994).

Para el tratamiento de las enfermedades del riñón se prepara un té con la corteza de chupandilla, combinada con biznaga (*Ferocactus latispinus*) y cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) y se toma frío como agua de tiempo (Canales, *et al.*, 2005).

También es utilizada con fines alimenticios, ya que esta especie genera un fruto llamado “chupandía” (Pérez-Negrón y Casas, 2007; Blanckaert, *et al.*, 2004).

### 1.5.1.1. Estudios sobre *C. procera*. Fitoquímica y actividades microbiológicas y farmacológicas

Existen varios estudios realizados a partir de extractos de diversa polaridad de la corteza de *C. procera*.

Rodríguez-López y colaboradores (2003) reportaron que el extracto CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1) posee una baja actividad espasmolítica sobre las contracciones espontáneas en íleon de rata con una concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) de 262.7±15.0 µg/mL.

Canales y colaboradores (2005) analizaron la actividad antibacterial del extracto metanólico de la parte aérea de *C. procera*, reportando los siguientes valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) contra: *Staphylococcus aureus* (CMI = 1.5 mg/mL), *Staphylococcus epidermidis* (CMI = 1.0 mg/mL), *Bacillus subtilis* (CMI = 1.5 mg/mL), *Vibrio cholerae* (CMI = 1.5 mg/mL), *Vibrio cholerae* aislada a partir de agua (CMI = 1.5 mg/mL) y *Shigella boydii* (CMI = 0.125 mg/mL).

Rodríguez-López y colaboradores (2006) trabajaron con los extractos de hexano, diclorometano y acetona, reportando que los tres extractos tienen una toxicidad significativa en un modelo con *Artemia salina*, con una concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de 0.21, 2.31 y 22.75 µg/mL, respectivamente. En el mismo trabajo también identificaron diversos compuestos a partir de los extractos de hexano y diclorometano. Estos compuestos fueron β-sitosterol, 1,3-propil-dipentadecanoato, 3-hidroxi-propil-9-octadecenoato, pentadecil benceno, eicosil benceno, docosano, heptacosano, dotriacontano y 2,6,10-trimetil tetradecano.

Castillo-Juárez y colaboradores (2009) probaron la actividad anti-*H. pylori* del extracto acuoso y metanólico de la corteza de *C. procera*, dando como resultado una CMI de 250 µg/mL y >500 µg/mL, respectivamente.

Rosas-Acevedo y colaboradores (2011) determinaron la actividad antiulcerogénica de extractos obtenidos de la corteza normal y regenerada

(tomada de árboles cuya corteza había sido cortada anteriormente) de *C. procera*. Demostraron que los tres extractos que utilizaron (hexano, acetato de etilo y metanol) tienen actividad antiulcerogénica en un modelo de daño gástrico inducido por etanol en ratas, siendo el de mejor actividad el extracto metanólico, con un DE<sub>50</sub> de 45.54 mg/kg y 36.68 mg/kg para los extractos obtenidos de corteza normal y regenerada, respectivamente. Además, a partir del extracto hexánico aislaron β-amirina, β-sitosterol y una mezcla de ácidos grasos no identificados.

### 1.5.1.2. Antecedentes directos

Dentro del laboratorio en donde se realizó esta investigación se ha estudiado a *C. procera* desde un punto de vista integral, evaluando varios parámetros farmacológicos que pudieran dar indicio de que esta especie pudiera ser considerada como candidata para el desarrollo de una terapia integral para el tratamiento de enfermedades como la gastritis y la úlcera gástrica, sin importar que la etiología de estos padecimientos fuera bacteriana o no.

Estos estudios han incluido los efectos anti-*H. pylori*, anti-ulcerogénico y anti-edematogénico de cinco extractos de diferente polaridad, Hexano (HX), diclorometano (DM), diclorometano-metanol [1:1] (DM-MET), metanol (MET) y acuoso (AQ) de la corteza de *C. procera*, determinándose además su toxicidad aguda (Escobedo-Hinojosa, *et al.*, 2012).

Los resultados de estas evaluaciones han mostrado que ninguno de los extractos resultó ser tóxico (DL<sub>50</sub>>5000 mg/kg) de acuerdo al protocolo utilizado (método de Lorke).

Los cinco extractos presentaron actividad anti-*H. pylori*, en un modelo de dilución en medio líquido. El extracto con mejor actividad fue HX con una CMI de 7.8 µg/mL, seguido del extracto DM con CMI de 15.6 µg/mL y los extractos de DM-MET y MET, ambos con CMI de 62.5 µg/mL. El extracto con menor actividad fue AQ (CMI = 125 µg/mL).



La actividad anti-edematogénica se determinó utilizando el modelo de edema inducido por TPA en oreja de ratón, en el que nuevamente el extracto hexánico resultó ser el más activo con una  $DE_{50} = 1.75$  mg/oreja; el resto de los extractos no presentaron actividad considerable ( $DE_{50} > 1$  g/mL para los extractos DM-MET, MET y AQ y  $DE_{50} > 3$  g/mL para el extracto DM).

Para la determinación de la actividad antiulcerogénica se utilizó el modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto en ratón. Los extractos HX, MET y AQ presentaron actividad de manera dosis dependiente. Esta vez el extracto MET fue el que presentó la mejor actividad gastroprotectora ( $DE_{50} = 0.53$  mg/kg), seguido por el extracto HX ( $DE_{50} = 1.06$  mg/kg), sin embargo, el extracto acuoso solo presentó una mediana actividad ( $DE_{50} = 11.30$  mg/kg) y los extractos DM y DM-MET no presentaron actividad ( $DE_{50} > 300$  mg/kg).

Complementando los resultados de la actividad antiulcerogénica, el análisis histopatológico demostró que la integridad de la mucosa gástrica se preserva casi por completo al ser tratada con el extracto MET, que fue el extracto que mostró la mejor actividad antiulcerogénica. Se sugiere además que la administración del extracto MET y AQ producen un aumento en la producción de moco neutro en la mucosa, originado probablemente por un aumento en la producción de prostaglandinas (Escobedo-Hinojosa, *et al.*, 2012).

Debido a que el extracto metanólico de *C. procera* presentó una muy buena actividad antiulcerogénica y que tiene un rendimiento de extracción aceptable, se decidió continuar con su estudio y ahondar sobre el efecto que ejerce sobre la mucosa gástrica, al tratar de encontrar su posible mecanismo de gastroprotección, así como su actividad en la resolución de las úlceras gástricas.

## 2. Hipótesis

Tomando en cuenta todos los ensayos realizados de la corteza de *C. procera*, especialmente los resultados reportados sobre la actividad gastroprotectora del extracto metanólico se plantearon las siguientes hipótesis:

- Considerando que la síntesis de prostaglandinas endógenas, óxido nítrico, grupos sulfhidrilos y la apertura de canales de potasio dependientes de ATP son factores que tienen un gran impacto dentro del mecanismo de protección de la mucosa gástrica, es probable que alguno o varios de estos factores estén relacionados con la actividad gastroprotectora del extracto metanólico.
- Si el extracto metanólico activa o favorece la actividad de los mecanismos de protección de la mucosa gástrica, es probable que también acelere el proceso de resolución de úlceras gástricas.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo general**

Estudiar el mecanismo de gastroprotección y el efecto en la resolución de úlcera gástrica del extracto metanólico de la corteza de *C. procera*.

#### **3.2. Objetivos particulares**

Para poder cumplir con el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Evaluar el papel que tienen las prostaglandinas, el óxido nítrico, los grupos sulfhidrilos y los canales de potasio dependientes de ATP en el mecanismo de gastroprotección, utilizando un modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto en ratón.
- Determinar la toxicidad subaguda del extracto, en un modelo de ratón.
- Evaluar el efecto del extracto en un modelo subagudo de resolución de úlcera gástrica inducida por etanol absoluto en ratón.
- Realizar un fraccionamiento primario del extracto metanólico y evaluar la actividad gastroprotectora y anti-*H. pylori* de las fracciones obtenidas en búsqueda de efectos que favorezcan el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica.

## **4. Metodología**

### **4.1. Obtención del material vegetal**

La corteza de *C. procera* fue recolectada en marzo del 2010, en el municipio de Jojutla, Morelos, en la localidad del Higuierón. La corteza fue identificada por la Maestra Rosa María Fonseca Juárez de la Facultad de Ciencias, UNAM y se depositaron dos especímenes en el Herbario de la Facultad de Ciencias a los cuales se les asignaron los números de Boucher 125630 y 125636.

### **4.2. Obtención, cuidado y manejo de los animales**

Se utilizaron ratones CD-1 machos, de entre 20 a 25 g para los experimentos de toxicidad y de 30 y 45 g para los experimentos de gastroprotección y resolución de úlcera, provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los ratones se adecuaron al ambiente y alimento por 5 días antes de la realización de cada ensayo, en los que permanecieron con disponibilidad de alimento (dieta estándar para roedores) y agua *ad libitum*, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas.

Todos los procedimientos en los que fueron utilizados animales dentro de este trabajo fueron realizados en conformidad a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) con las especificaciones técnicas para el cuidado y manejo de animales de laboratorio y aprobados por el comité de ética animal local.

Además, los ensayos fueron planeados de tal manera que en cada uno se utilizara el menor número de animales posible y reducir al mínimo su sufrimiento.

El número de animales utilizados fue diferente dependiendo del tipo de ensayo realizado, variando desde 8 a 20 ratones por grupo (n=8-20).

### **4.3. Tratamientos**

Todos los fármacos utilizados, es decir, carbenoxolona, indometacina, éster metílico de la nitro-L-arginina (L-NAME), N-etilmaleimida (NEM) y glibenclamida fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

Los tratamientos para todos los ensayos fueron preparados justo antes de su administración, en un volumen de 10mL/kg-r.

### **4.4. Preparación del extracto metanólico de *C. procera***

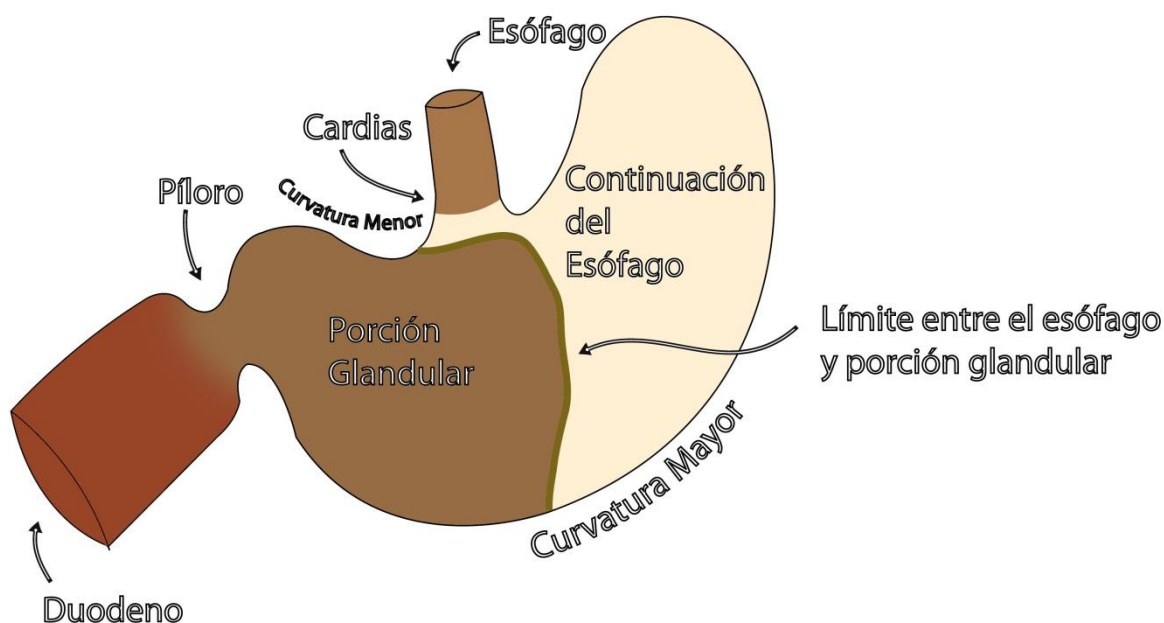
La corteza se cortó en trozos pequeños y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, fue molida utilizando un molino manual. Se tomaron 1.5 kg de corteza de *C. procera* seca y finamente molida y se realizó una extracción con 9 L de metanol mediante maceración a temperatura ambiente por dos días. El procedimiento de maceración se realizó 5 veces con el mismo material vegetal. El extracto fue filtrado para eliminar los restos de la corteza y se redujo su volumen con un evaporador rotatorio a presión reducida y una temperatura aproximada de 40° C, para después continuar con la eliminación del disolvente a presión y temperatura ambiente hasta quedar completamente seco y se obtuvo su rendimiento.

### **4.5. Inducción de la formación de úlceras gástricas. Determinación del efecto gastroprotector del extracto metanólico de *C. procera***

Para la inducción de la formación de úlceras se utilizó el método descrito por Robert en 1979, con algunas modificaciones. Los ratones fueron sometidos a un ayuno de 24 horas en jaulas separadas, con libre acceso a agua y piso de malla elevado, para evitar coprofagia.

Se dividieron en varios grupos a los cuales se les administró solución salina como control negativo, carbenoxolona (50 mg/kg) como control positivo y el extracto metanólico a diferentes dosis (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 y 100 mg/kg).

Una hora después se les administró etanol absoluto (7 mL/kg) para inducir la formación de las úlceras gástricas. Trascorridas una hora y media después de la inducción de las úlceras, los ratones fueron sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub>, su estómago (Figura 5) fue insuflado con solución salina (Figura 6A y 6B) y posteriormente extirpado (Figura 6C y 6D).

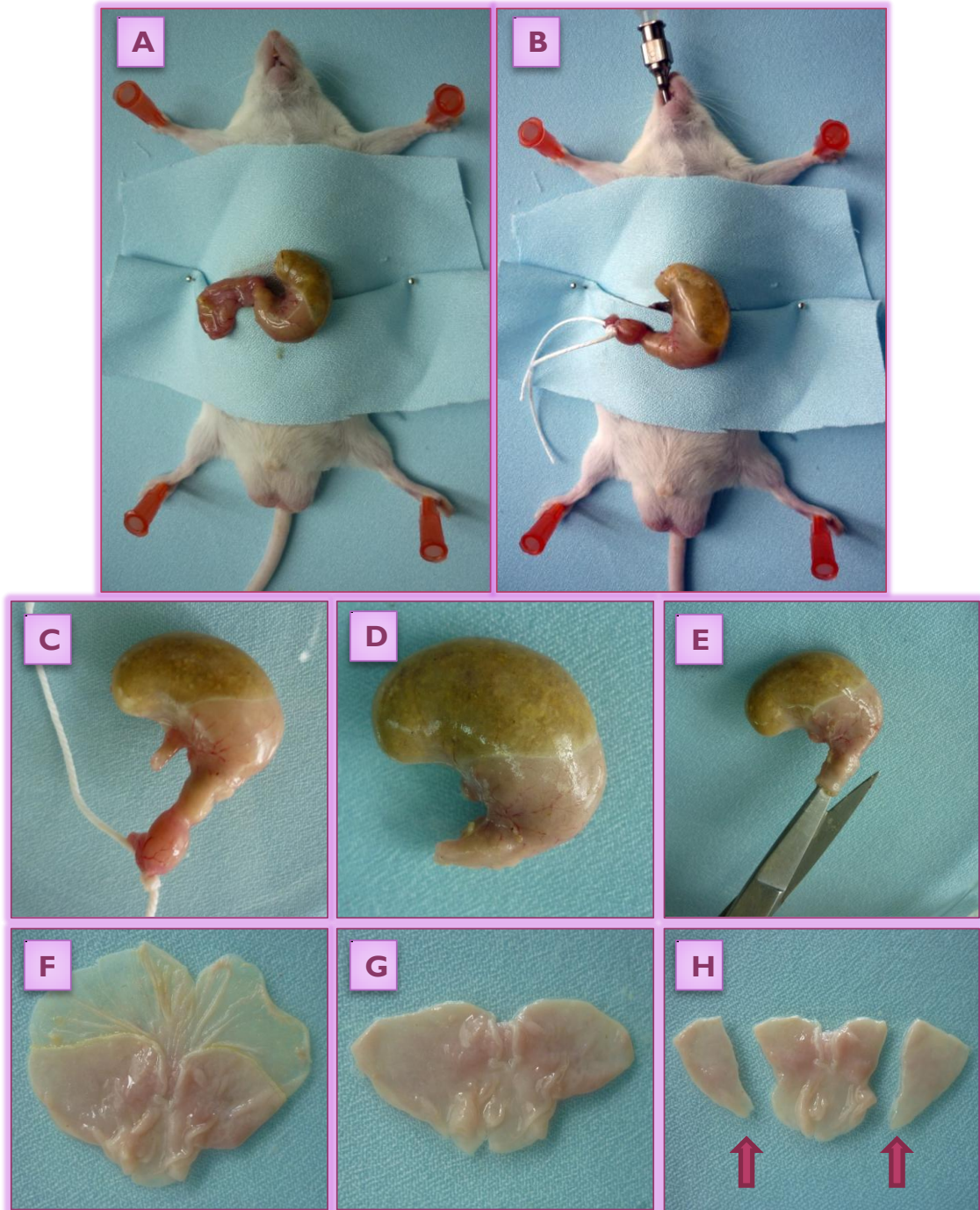


**Figura 5.** Regiones del estómago de ratón

Los estómagos fueron fijados con formol al 10% durante 15 minutos, se abrieron por la curvatura mayor (Figura 6E) y fueron colocados entre dos placas de vidrio para examinar el daño en la mucosa gástrica (Figura 6F). Se midió el área de las lesiones visibles macroscópicamente en milímetros cuadrados utilizando el software ImageJ<sup>®</sup> y se determinó el índice de úlcera como la sumatoria de todas ellas, para cada individuo de experimentación. Con el índice de úlcera promedio de cada grupo experimental se calculó el porcentaje de gastroprotección con la siguiente fórmula:

$$\%Gp = [(IU \text{ grupo control}) - (IU \text{ grupo experimental})] / (IU \text{ grupo control}) \times 100$$

Siendo %Gp el porcentaje de gastroprotección e IU el índice de úlcera.



**Figura 6.** Procedimiento para la extirpación del estómago de ratón para la evaluación del mecanismo gastroprotector, el modelo de resolución de úlcera gástrica y el análisis histológico. (A) Se hace una incisión en la cavidad abdominal para localizar el estómago. (B) Se hace una atadura por el duodeno y con una cánula se insufla el estómago con formol al 10%. (C) El estómago se extrae cortando por el esófago. (D) Se corta el tejido proveniente del esófago y duodeno sobrantes. (E) El estómago se corta por la curvatura mayor y se lava con solución salina. (F) El estómago se extiende para exponer la mucosa gástrica y poder determinar el índice de úlcera para la evaluación del mecanismo gastroprotector y el modelo de resolución de úlcera gástrica. (G) Se corta la parte glandular del estómago, de la cual (H) se separan secciones para hacer el análisis histológico.

#### **4.6. Evaluación del mecanismo gastroprotector del extracto metanólico de *C. procera***

Los ratones se sometieron a un ayuno de 24 horas. Después del ayuno recibieron un pretratamiento para evaluar la participación de ciertos mecanismos de defensa de la mucosa gástrica en el efecto gastroprotector del extracto metanólico. Se administró el vehículo de los pretratamientos como control negativo; Indometacina (10 mg/kg, en 5 mM NaHCO<sub>3</sub> en solución salina, SC) para evaluar el papel de las prostaglandinas endógenas; L-NAME (10 mg/kg, en solución salina, IP) para evaluar el papel del óxido nítrico endógeno; NEM (1 mg/kg, en solución salina, SC) para evaluar el papel de los grupos sulfhidrilos; o Glibenclamida (5 mg/kg, en solución salina, IG) para evaluar el papel de los canales de potasio dependientes de ATP.

Media hora después del pretratamiento se administró solución salina (control negativo), carbenoxolona (50 mg/kg) o el extracto metanólico (100 mg/kg) por vía intragástrica.

Después de una hora se indujeron las lesiones en la mucosa gástrica administrando etanol absoluto (7 mL/kg) y una hora y media después los ratones se sacrificaron en cámara de CO<sub>2</sub>. Se extirparon los estómagos y se determinó el índice de úlcera tal y como se describió anteriormente.

#### **4.7. Evaluación de la toxicidad subaguda del extracto metanólico de *C. procera***

Durante todo el ensayo los ratones se conservaron a temperatura ambiente con ciclos de luz de 12 horas y alimento y agua *ad libitum*.

Los ratones fueron divididos en 4 grupos, tres de los cuales fueron administrados con el extracto y un grupo control. Los tratamientos fueron administrados una vez al día por un periodo de 20 días, por vía intragástrica. Se administraron 3 dosis distintas del extracto metanólico, 10, 100 y 1000 mg/kg y al grupo control le fue administrado el vehículo (solución salina).



Durante los 20 días del ensayo se obtuvo el peso de los ratones diariamente y se observó su apariencia física y su comportamiento en busca de evidencias de toxicidad, como son cambios en la apariencia del pelaje, estimulación, apatía o muerte.

La mitad de los ratones de cada grupo fue sacrificada después de los 20 días de administración de los tratamientos, la otra mitad se siguió observando durante los 15 días posteriores al término de la administración de tratamientos, en busca de signos de toxicidad.

Después de transcurrido el tiempo de observación de cada grupo, los ratones se sometieron a un ayuno de 24 horas y fueron sedados con Pentobarbital sódico, a una dosis de 63 mg/kg, para realizar una punción cardiaca. La mitad de la sangre, obtenida con heparina, se utilizó para la determinación de parámetros hematológicos. Las muestras de sangre se mandaron los Laboratorios de Diagnóstico Veterinario Alhambra para su análisis. Con la sangre restante (sin heparina) se obtuvo el suero para la realización de un análisis bioquímico. Estos análisis fueron llevados a cabo por la Dra. Rebeca Milán Chávez del Laboratorio de Metabolismo y Fisiología del Embarazo de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Posteriormente, algunos de los órganos internos de los ratones (cerebro, corazón, pulmones, timo, hígado, estómago, riñones, glándulas adrenales, vaso, intestino, testículos) fueron extirpados para ser pesados como otro parámetro toxicológico y se determinó el peso relativo de los órganos, que se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Peso relativo} = \left( \frac{\text{Peso del órgano}}{\text{Peso corporal}} \right) \times 100$$

El hígado, vaso, riñones, intestino y estómago fueron sometidos a un análisis histológico.

#### **4.8. Modelo de resolución de úlcera gástrica**

Los ratones fueron sometidos a ayuno de 24 horas. Se les administró etanol absoluto (7 mL/kg) para inducir la formación de úlceras gástricas y después de dos horas se les permitió ingerir comida y agua *ad libitum*.

Los individuos de experimentación se dividieron en grupos a los que se les administró solución salina como control negativo, carbenoxolona (50 mg/kg) como control positivo y el extracto metanólico (100 mg/kg) y se administraron una vez al día en periodos de 5, 10, 15 y 20 días.

Después del tiempo transcurrido en cada periodo, los ratones de cada grupo fueron sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub> y se extirparon los estómagos para determinar el índice de úlcera.

##### **4.8.1. Determinación de manifestaciones tóxicas dentro del ensayo de resolución de úlcera gástrica del extracto metanólico de *C. procera***

Durante la realización del modelo de resolución de úlcera gástrica se buscaron signos de toxicidad en los individuos de experimentación, para poder detectar si la administración consecutiva de extracto metanólico estaba provocando algún efecto en los ratones que pudiera afectar el resultado del ensayo.

Durante los 20 días de la realización de este modelo el peso corporal, cambios en la apariencia física y cambios en la conducta fueron monitoreados diariamente. Después de haber concluido con el modelo de resolución de úlcera gástrica se extirparon varios órganos de cada individuo experimental (hígado, riñones, vaso, intestino delgado e intestino grueso) y fueron analizados por técnicas histológicas para hacer una comparación entre los grupos administrados con carbenoxolona y el extracto metanólico contra el grupo control.

#### **4.8.2. Análisis histológico**

Los órganos que fueron sometidos a la técnica histológica fueron los estómagos del modelo de resolución de úlcera gástrica y varios órganos del ensayo para la determinación de toxicidad sudaguda (hígado, vaso, riñones, intestino), todos ellos provenientes de ratones tratados con el extracto metanólico, así como los controles positivos, negativos y sin tratamientos de cada ensayo.

Inmediatamente después de la obtención de cada órgano, se fijaron en formol al 10% amortiguado. La técnica histológica se solicitó en el Laboratorio de Histología del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM, en donde se realizó el tren de deshidratación, infiltración, inclusión en parafina, los cortes al micrótopo y las tinciones del tejido.

Para el análisis de los cortes histológicos de los estómagos de cada ensayo se realizaron dos tinciones distintas (hematoxilina y eosina y ácido periódico de Shiff o PAS por sus siglas en inglés), mientras que para los órganos del ensayo de toxicidad subaguda (hígado, vaso, riñones, intestino delgado e intestino grueso) solamente se realizó una tinción por hematoxilina y eosina. Posteriormente, el análisis de los cortes fue realizado por microscopia de luz.

#### **4.9. Fraccionamiento del extracto metanólico de *C. procera***

Se realizó un fraccionamiento por cromatografía en columna abierta utilizando 260 g de sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) a partir de 28 g del extracto. Se utilizaron diversos sistemas de elución de polaridad creciente, empezando por hexano y siguiendo con acetato de etilo, acetato de etilo-metanol (1:1), etanol y hasta etanol al 70%. Las fracciones se recolectaron dependiendo del cambio de polaridad y apariencia física de las mismas, obteniendo un total de 13 fracciones. El volumen de las fracciones fue reducido con un evaporador rotatorio a una temperatura aproximada de 40° C y posteriormente, se dejaron secar completamente a temperatura ambiente.

Se realizó un análisis por cromatografía en capa fina para comprobar las diferencias en la composición metabólica de las fracciones obtenidas. Se probó, además, su actividad gastroprotectora, todas ellas a una dosis de 100 mg/kg, tal y como se describió anteriormente y se probó su actividad anti-*H. pylori*.

#### **4.9.1. Determinación de la actividad anti-*H. pylori***

Para evaluar la actividad del extracto metanólico íntegro y de las fracciones primarias se empleó el método de dilución en medio líquido para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) que se define como la concentración más baja de un agente específico que es capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo. Para validar los resultados se utilizaron como antibióticos de referencia metronidazol, claritromicina y amoxicilina (Castillo-Juárez, *et al*, 2009; Sensakovic y Smith, 2001).

Se preparó un cultivo de la cepa de referencia ATCC 43504 de *H. pylori* en medio Muller-Hinton broth con  $\beta$ -ciclodextrina al 2%, vancomicina (10 mg/L), trimetoprima (5 mg/L), anfotericina B (2 mg/L) y polimixina B (2.5 mg/L), el cual se incubó a 37° C, con agitación a 150 rpm y bajo condiciones microaerófilas (10% de CO<sub>2</sub>) hasta que la bacteria alcanzó su fase exponencial de crecimiento (~ 10<sup>8</sup> UFC/mL). El extracto metanólico íntegro, las 13 fracciones o los antibióticos de referencia, disueltos en 10  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO), se añadieron a 1.5 mL del cultivo de *H. pylori* en placas de cultivo de 24 pozos. Justo después de la administración de los tratamientos se determinó la absorbencia del cultivo (a 660 nm). Posteriormente, se incubaron por un periodo de 24 horas bajo las condiciones antes descritas y se determinó nuevamente la absorbencia para determinar el crecimiento de la bacteria con cada uno de los tratamientos.

El porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano se determinó comparando el efecto que ejercieron cada uno de los tratamientos contra el control negativo (crecimiento solo con DMSO) utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ IC} = 100 - \{ [ (AT_f - AT_i) / (AC_f - AC_i) ] \times 100 \}$$

Donde % IC se refiere al porcentaje de Inhibición de crecimiento, AT<sub>f</sub> y AT<sub>i</sub> es la absorbencia del cultivo con el tratamiento en el tiempo inicial y final, respectivamente y AC la absorbencia del control negativo.

#### **4.10. Análisis estadístico**

Los resultados que se reportan se refieren al promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM) de grupos desde 6 a 24 individuos de experimentación por grupo, dependiendo del ensayo realizado. El análisis estadístico fue realizado mediante un análisis de varianza y una comparación múltiple de medias de Dunn para detectar los grupos con diferencias estadísticamente significativas (valores de  $p \leq 0.05$ ) utilizando el programa estadístico Prisma 5.0<sup>®</sup>.

## 5. Resultados y discusión

*C. procera* (Anacardiaceae) es utilizada dentro de la medicina tradicional mexicana como tratamiento para diversos padecimientos, entre ellos, los gastrointestinales (Argueta, *et al.*, 1994). A la fecha, existen algunos estudios que han explorado diferentes propiedades de extractos obtenidos de la corteza de esta planta, como la actividad espasmolítica (Rodríguez-López, *et al.*, 2003), la antiedematogénica (Escobedo-Hinojosa, *et al.*, 2012), la antiulcerogénica (Escobedo-Hinojosa, *et al.*, 2012; Rosas-Acevedo, *et al.*, 2011) y la antibacteriana (Canales, *et al.*, 2005), dentro de las que se puede destacar la actividad anti-*H. pylori* (Castillo-Juárez *et al.*, 2009, Escobedo-Hinojosa, *et al.*, 2012), al tratarse del principal agente causal de las úlceras pépticas.

En particular, se ha reportado una muy buena actividad antiulcerogénica del extracto metanólico de *C. procera* (Escobedo-Hinojosa, *et al.*, 2012; Rosas-Acevedo, *et al.*, 2011), similar a la de los compuestos puros de referencia.

Por otra parte, la corteza de *Amphipterygium adstringens*, conocida comúnmente como cuachalalate, que pertenece a la misma familia (Anacardiaceae), es reconocida por poseer propiedades gastroprotectoras, y de la cual se han aislado algunos compuestos con propiedad antiulcerogénica (Arrieta, *et al.*, 2003; Navarrete, *et al.*, 1990; Navarrete, *et al.*, 1998), razón por la que, considerando el criterio quimiotaxonómico podría ser posible que *C. procera* y *A. adstringens* compartan compuestos activos o bien, posean compuestos de estructura o actividad semejantes.

Tomando en cuenta estos antecedentes, el propósito de este estudio fue tratar de elucidar el mecanismo del ya conocido efecto gastroprotector del extracto metanólico de *C. procera*. Por otro lado, se pretendía determinar si su efecto va más allá de proteger la mucosa gástrica de un daño agudo, favoreciendo la resolución de un proceso ulceroso preexistente y acelerando el proceso de curación de las úlceras gástricas. Además, se trató de reducir la complejidad del extracto mediante un fraccionamiento primario como el inicio

de la búsqueda y aislamiento de el o los compuestos responsables de la actividad gastroprotectora del extracto metanólico.

### 5.1. Preparación del extracto metanólico de *C. procera*

A partir de 1520 g de corteza seca y finamente molida de *C. procera*, se obtuvieron 431 g de extracto metanólico, su apariencia física, es la de un polvo rojizo (Figura 7). El rendimiento de esta extracción resultó ser del 28.3% y el material obtenido fue suficiente para la realización de los experimentos con los modelos animales, ya que, generalmente, se utiliza una gran cantidad de extracto para la realización de este tipo de ensayos.



**Figura 7.** Preparación del extracto metanólico de *C. procera*. (A) Apariencia del árbol después de ser descortezado. (B) Corteza de *C. procera* en trozos pequeños. (C) Corteza molida (D) Proceso de maceración de la corteza con metanol. (E) Extracto metanólico aún con disolvente. (F) Extracto metanólico seco.

Rosas-Acevedo y colaboradores en 2011 realizó un trabajo con *C. procera*, dentro del cual obtuvo un extracto metanólico mediante maceración a temperatura ambiente y en el que reporta un rendimiento de la extracción de 13.72%. Por otro lado, Escobedo-Hinojosa y colaboradores en 2012 reportó un rendimiento similar (13.22%). Al comparar estos resultados con el obtenido en este trabajo (28.3%) se puede notar que es menos de la mitad del rendimiento. Esta diferencia se puede deber a varios factores, entre ellos se debe tomar en cuenta que tan exhaustiva es la extracción, la época de recolecta de la corteza, el tiempo de maceración, la calidad del material vegetal y la proporción de disolvente-material vegetal utilizados.

## **5.2. Determinación del efecto gastroprotector del extracto metanólico de *C. procera***

Inicialmente, se evaluó la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico obtenido, con la finalidad de comparar el efecto gastroprotector del mismo con el previamente reportado en la literatura (Escobedo-Hinojosa, *et al.*, 2012; Rosas-Acevedo, *et al.*, 2011). Para lo cual, se determinó su dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>) en el modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto en ratón. De manera paralela, también se determinó éste valor para el fármaco de referencia carbenoxolona, debido a que, a pesar de ser un compuesto frecuentemente usado como control positivo en esta clase de experimentos, no se encontró en la literatura el valor de DE<sub>50</sub> para el modelo que utilizaríamos.

El modelo de inducción de úlceras gástricas con etanol absoluto es un procedimiento ampliamente empleado para la evaluación de diversos agentes antiulcerogénicos, incluyendo los provenientes de productos naturales.

Para la administración intragástrica del extracto metanólico se empleó solución salina como vehículo. Dicho disolvente se eligió por ser el más adecuado para la administración de un agente por vía intragástrica, sin embargo, este extracto no se solubiliza por completo en este disolvente, sino



que queda en forma de suspensión, la cual no generó ningún problema para su administración.

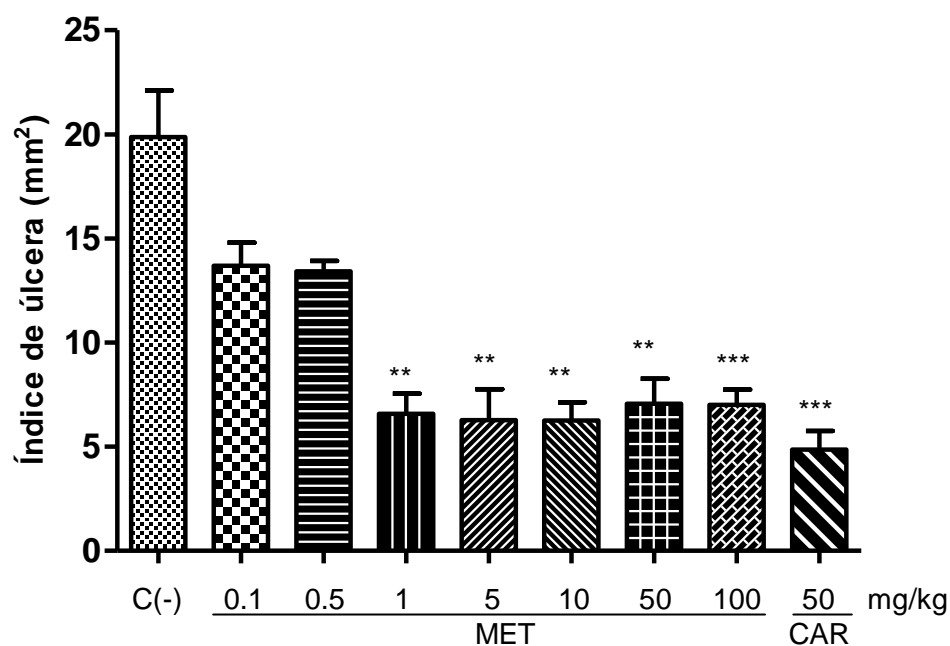
Los individuos de experimentación pertenecientes al grupo control (administrado con solución salina), después de la administración de etanol absoluto, desarrollaron una gran cantidad de lesiones necrosantes en la mucosa gástrica. La administración del extracto metanólico disminuyó el daño provocado por el etanol absoluto en la mucosa gástrica de manera dosis dependiente (Tabla 2 y Figura 8), con una  $DE_{50}$  de 0.71 mg/kg (Intervalo de confianza [IC] = 0.35 – 1.07).

Por otro lado, el control positivo de referencia carbenoxolona también produce una respuesta dosis dependiente y desde dosis muy bajas se puede observar su efecto gastroprotector (Tabla 3 y Figura 9), la  $DE_{50}$  calculada para la misma resultó ser de 0.30 mg/kg (IC = 0.07 - 1.17).

**Tabla 2.** Efecto gastroprotector del extracto metanólico a diferentes dosis

<b>Extracto metanólico (mg/kg)</b>	<b>Índice de úlcera (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>% Gastroprotección</b>
0.1	13.70 ± 1.10	31.08 ± 5.55
0.5	13.43 ± 0.50	32.41 ± 2.53
1.0	6.59 ± 0.96	66.85 ± 4.83
5.0	6.27 ± 1.50	68.44 ± 7.54
10.0	6.26 ± 0.88	68.48 ± 4.42
50.0	7.06 ± 1.20	64.46 ± 6.07
100.0	7.01 ± 0.73	64.71 ± 3.69

Los resultados se presentan como el promedio ± EEM, con n ≥ 8.

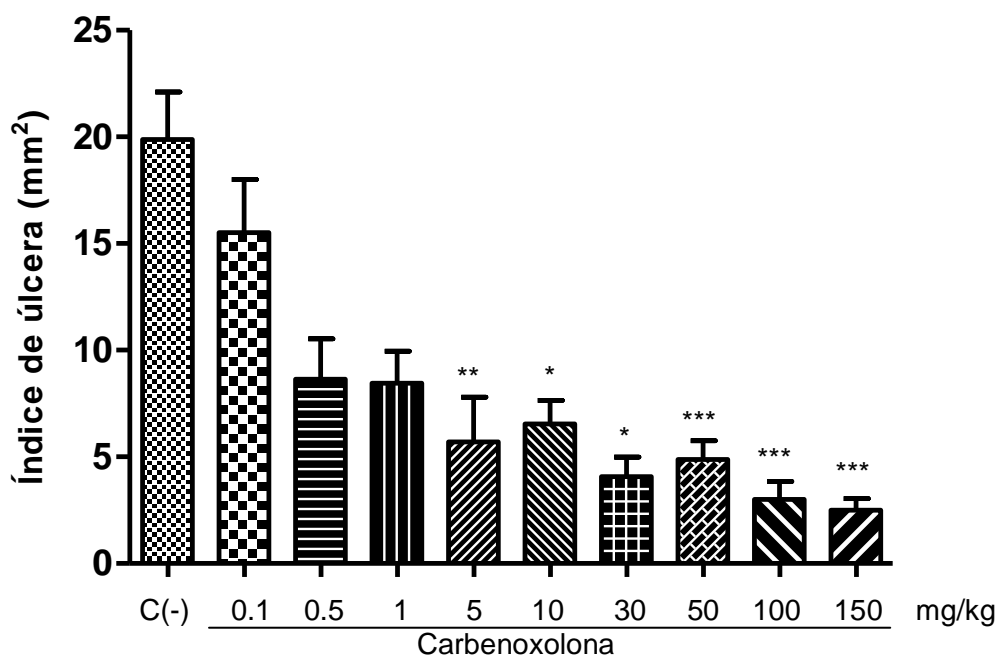


**Figura 8.** Efecto antiulcerogénico del extracto metanólico en un modelo de úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto en ratón. Se probó la actividad del extracto metanólico (MET) a diferentes dosis y carbenoxolona (CAR) a una dosis de 50 mg/kg como fármaco de referencia y se compararon contra el control negativo [C(-)] administrado, solución salina. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  EEM, con  $n \geq 8$ . \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; el análisis estadístico realizado consistió en un análisis de varianza seguido de una comparación múltiple de medias de Dunn.

**Tabla 3.** Efecto gastroprotector de carbenoxolona a diferentes dosis

Carbenoxolona (mg/kg)	Índice de úlcera (mm <sup>2</sup> )	% Gastroprotección
0.1	15.51 $\pm$ 2.50	21.97 $\pm$ 12.59
0.5	8.64 $\pm$ 1.90	56.53 $\pm$ 9.56
1.0	8.46 $\pm$ 1.49	57.43 $\pm$ 7.48
5.0	5.70 $\pm$ 2.10	71.32 $\pm$ 10.58
10.0	6.54 $\pm$ 1.11	67.10 $\pm$ 5.59
30.0	4.07 $\pm$ 0.92	79.53 $\pm$ 4.64
50.0	4.87 $\pm$ 0.89	75.49 $\pm$ 4.47
100.0	3.00 $\pm$ 0.85	84.90 $\pm$ 4.25
150.0	2.50 $\pm$ 0.53	87.42 $\pm$ 2.69

Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  EEM, con  $n \geq 8$ .



**Figura 9.** Efecto gastroprotector de la carbenoxolona a diferentes dosis en un modelo de úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto en ratón. Se probó la actividad de carbenoxolona a diferentes dosis. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  EEM, con  $n \geq 8$ . \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; el análisis estadístico realizado consistió en un análisis de varianza seguida de una comparación múltiple de medias de Dunn.

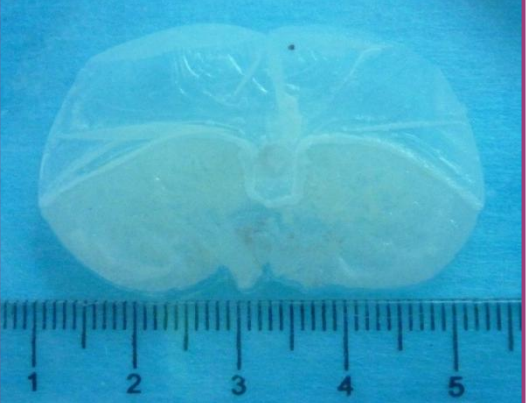

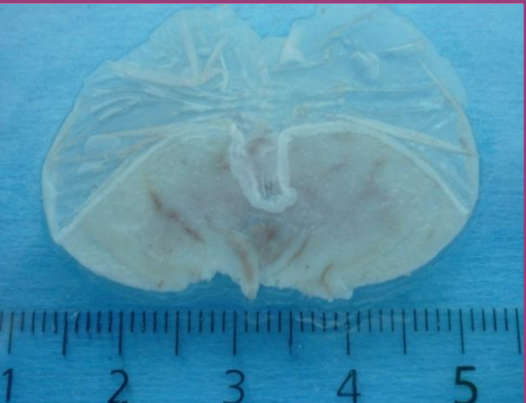

Los resultados obtenidos, después de probar la actividad gastroprotectora del extracto metanólico a diferentes concentraciones, corroboraron su comportamiento dosis dependiente, sin embargo, la actividad gastroprotectora del extracto se mantiene constante desde 1 mg/kg hasta la dosis más alta probada, es decir 100 mg/kg.

La  $DE_{50}$  obtenida para el extracto metanólico ( $DE_{50} = 0.71$  mg/kg) se asemeja bastante al reportado por Escobedo-Hinojosa y colaboradores en 2012 (0.53 mg/kg), en el que se utiliza el mismo modelo de estudio que se empleó en este trabajo. No obstante, al comparar este resultado con el reportado por Rosas-Acevedo y colaboradores en 2011, que obtuvo una  $DE_{50}$  de 45.54 mg/kg, se observa una diferencia considerable, debida probablemente a las diferencias dentro del procedimiento experimental utilizado, incluyendo la utilización de ratas como individuos experimentales.

Es interesante comparar la actividad gastroprotectora del extracto metanólico de *C. procera* con el correspondiente de la especie *A. adstringens*, conocida comúnmente como cuachalalate y cuya corteza es el producto natural más empleado para el tratamiento de úlceras dentro de la medicina tradicional mexicana (Navarrete, *et al*, 1990). En un estudio realizado por Navarrete y colaboradores en 1998, utilizando un modelo de inducción de úlcera gástrica con etanol en ratas, se determinó alrededor del 15% de gastroprotección del extracto metanólico de *A. adstringens* a una dosis de 100 mg/kg, que, comparado con el porcentaje de gastroprotección del extracto metanólico de *C. procera*, 64.7% a 100 mg/kg, se denota claramente su mejor actividad.

El efecto gastroprotector que tiene la administración tanto del extracto metanólico como de la carbenoxolona, puede observarse de manera macroscópica y a simple vista en los estómagos de los ratones (Figura 10). La ulceración inducida por etanol absoluto en este modelo se denota por la aparición de lesiones hemorrágicas que pueden aparecer por toda la mucosa gástrica.

La administración del extracto metanólico disminuye el número y la longitud de úlceras gástricas inducidas por etanol absoluto de manera significativa, comparado con el grupo control, al cual solo se le administró el vehículo de los tratamientos (solución salina). Algo muy similar sucede en el caso de la administración de Carbenoxolona en donde el daño inducido por etanol absoluto se ve claramente disminuido.

Tratamiento	Apariencia del estómago
<p><b>Sin tratamientos (estómago normal)</b></p>	
<p><b>Solución salina (control negativo)</b></p>	
<p><b>Carbenoxolona 50 mg/kg (control positivo)</b></p>	
<p><b>Extracto metanólico 100 mg/kg</b></p>	

**Figura 10.** Fotos representativas del daño inducido por etanol absoluto en la mucosa gástrica de ratón y de la actividad gastroprotectora del extracto metanólico y de la carbenoxolona.

### **5.3. Evaluación del mecanismo gastroprotector del extracto metanólico de *C. procera***

A pesar de que la mayoría de los casos de úlcera gástrica es de etiología bacteriana, es decir, que se desarrolla a consecuencia de la infección por *H. pylori*, existen varios factores que son reconocidos como factores de predisposición de este padecimiento, como son el estrés, el uso crónico de AINES, el excesivo consumo de alcohol, entre otros, y generalmente se cree que es el resultado de un desequilibrio entre factores agresivos y aquellos encargados de mantener la integridad de la mucosa gástrica (Bucciarelli y Skliar, 2007).

Por lo que para prevenir la formación de las úlceras gástricas básicamente se busca un agente que pueda actuar reduciendo los factores agresivos en la mucosa gástrica o incrementando su resistencia en contra de estos (Andrade, et al., 2007).

En este trabajo se estudió el posible mecanismo por el cual el extracto metanólico ejercía su efecto antiulcerogénico. Específicamente, se quería encontrar si es que este extracto incrementaba uno o varios de los factores de resistencia naturales de la mucosa gástrica, utilizando cuatro modelos distintos para determinar la participación de las prostaglandinas, el óxido nítrico, los grupos sulfhidrilos y los canales de potasio dependientes de ATP dentro del efecto gastroprotector del extracto metanólico.

Para ello, se determinó la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico, administrando previamente diferentes compuestos que interfieren con dichos mecanismos naturales de defensa de la mucosa (Indometacina, L-NAME, NEM o Glibenclamida), utilizando el mismo modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto en ratón. En todos los casos se empleó carbenoxolona como fármaco de referencia.

Como es de esperarse, la administración por separado de cada uno de los cuatro pretratamientos, provoca un aumento significativo ( $p \leq 0.05$ ) en el

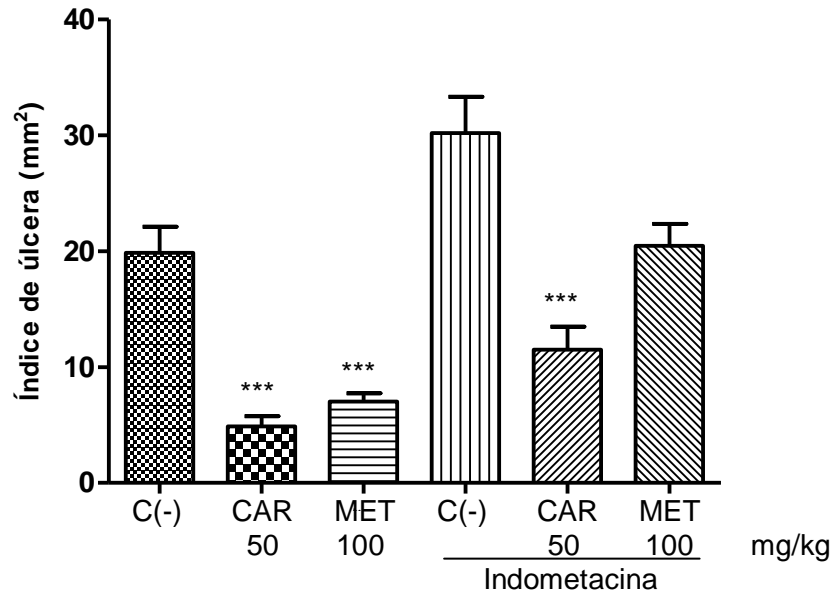
índice de úlcera inducido por la administración de etanol absoluto, en comparación con los controles sin pretratamientos (ver más adelante Figuras 11, 13, 15 y 17, C(-) de la parte derecha vs C(-) parte izquierda de la gráfica correspondiente).

### **5.3.1. Participación de las prostaglandinas dentro del mecanismo de gastroprotección del extracto metanólico de *C. procera***

Las prostaglandinas son consideradas como agentes protectores de la mucosa gástrica y se ha demostrado que poseen un efecto antiulcerogénico. Su actividad está dada principalmente por la estimulación de la producción de moco y bicarbonato, así como el aumento del flujo sanguíneo gástrico (Miller, 1983).

La administración de AINES, que son fármacos que inhiben la síntesis de prostaglandinas, aumenta la susceptibilidad al daño y la generación de úlceras dentro de la mucosa gástrica, debido a la supresión de la síntesis de prostaglandinas (*Andrade, et al., 2007*). Un ejemplo de este tipo de fármacos es la indometacina, la cual se utiliza en este modelo de estudio.

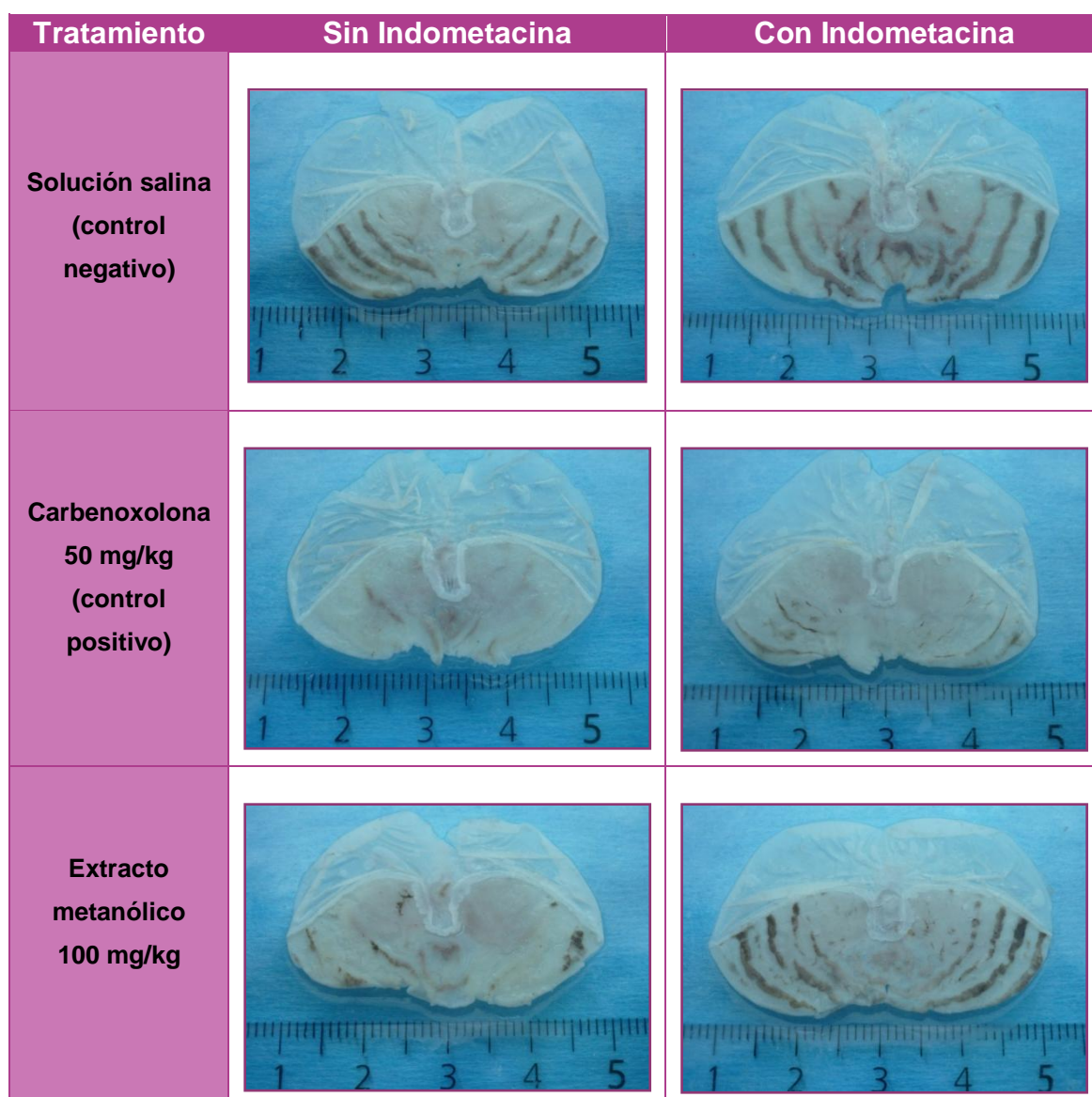
Con el propósito de investigar el papel que tienen las prostaglandinas endógenas dentro de la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico se administró el pretratamiento con indometacina, un inhibidor inespecífico de las ciclooxigenasas. En este caso se observa que la actividad gastroprotectora tanto del extracto metanólico como del fármaco de referencia, carbenoxolona, se ven disminuidas de manera parcial, lo cual se ve reflejado en el aumento del índice de úlcera (Figura 11). La actividad del extracto metanólico disminuye desde  $64.71 \pm 3.69\%$  de gastroprotección hasta un  $32.24 \pm 6.32\%$  con el pretratamiento con Indometacina. Mientras que, para el caso de la actividad de carbenoxolona, el porcentaje de gastroprotección pasa de un  $75.49 \pm 4.47\%$  a un  $61.93 \pm 6.56\%$ . En la Figura 12 se muestran estómagos representativos de las diferentes condiciones experimentales.



**Figura 11.** Efecto del pretratamiento con Indometacina sobre la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico. Las dosis empleadas se indican en la gráfica. CAR: carbenoxolona, MET: Extracto metanólico. Los resultados se reportan como el promedio  $\pm$  EEM, con  $n \geq 8$ . \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; el análisis estadístico realizado consistió en un análisis de varianza seguido de una comparación múltiple de medias de Dunn.

La disminución de la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico, como consecuencia del pretratamiento con indometacina, sugiere que el aumento en la concentración de prostaglandinas endógenas forma parte del mecanismo de gastroprotección del extracto metanólico y tomando en cuenta que el aumento en la síntesis de moco y bicarbonato son dos de los mecanismos más representativos de la actividad de las prostaglandinas, se sugiere que la acción del extracto pueda estar mediada por ellos, aunque se necesita realizar otros ensayos para corroborar esta hipótesis.





**Figura 12.** Fotos representativas del efecto que tiene la administración del extracto metanólico y carbenoxolona en la aparición de lesiones hemorrágicas gástricas inducidas por etanol absoluto en ratones pretratados con indometacina.

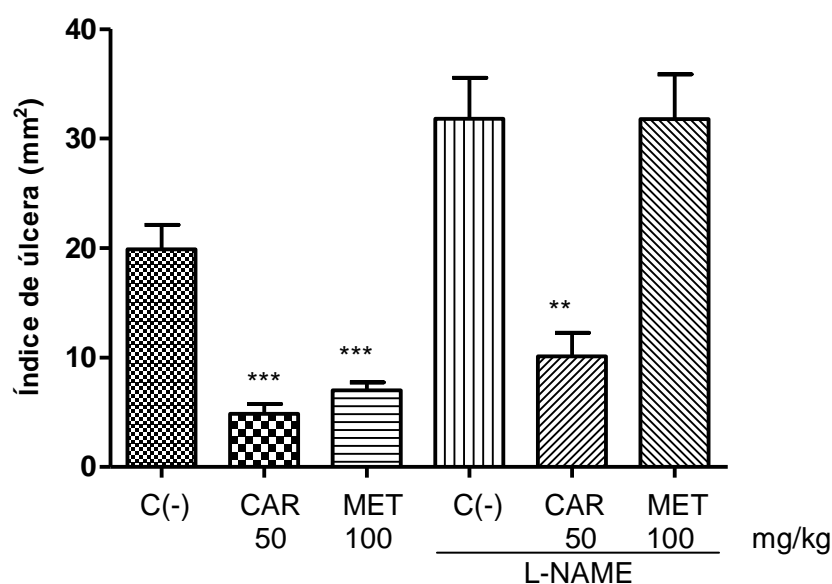
### 5.3.2. Participación del óxido nítrico dentro del mecanismo de gastroprotección del extracto metanólico de *C. procera*

Al parecer el mantenimiento de la vascularización y el correcto flujo sanguíneo en la mucosa gástrica son los mecanismos que tiene mayor impacto dentro de la citoprotección, ya que el daño inducido por etanol absoluto en gran medida es provocado por los cambios vasculares en la mucosa gástrica (Matsuda, *et al.*, 1999). El óxido nítrico tiene un papel importante dentro del

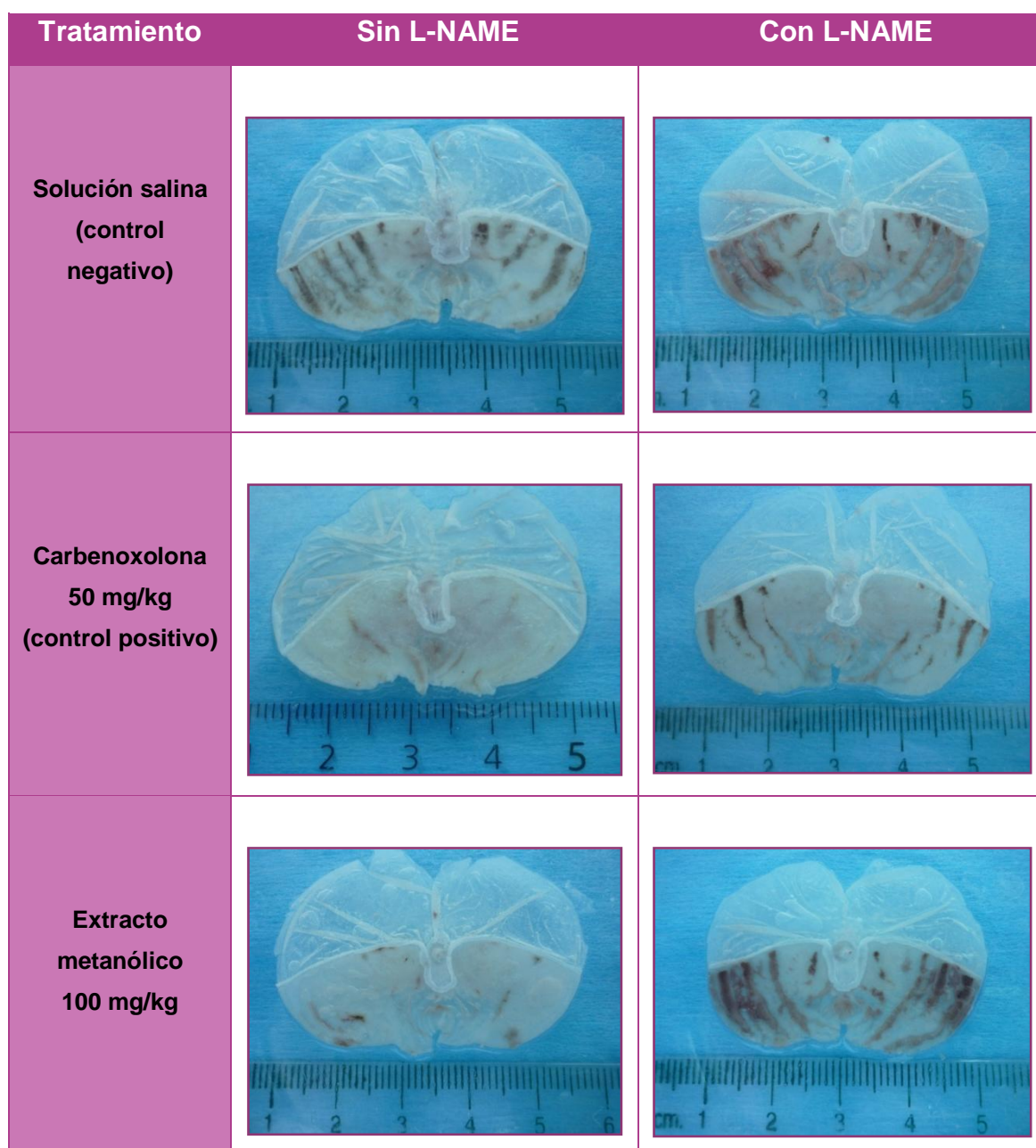
mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica, principalmente, aumentando el flujo sanguíneo (Guth, 1992).

Para poder observar el papel que tiene el óxido nítrico dentro de la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico se administró un pretratamiento con L-NAME, un inhibidor no específico de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa. La actividad gastroprotectora del extracto metanólico se abate prácticamente por completo al administrar el pretratamiento con L-NAME (Figura 13), presentando un porcentaje de gastroprotección de  $0.10 \pm 12.82\%$ , lo que sugiere que la actividad antiulcerogénica del extracto está conferida en gran medida por la inducción de la síntesis de óxido nítrico.

La Carbenoxolona también presentó una disminución de su actividad, dando solamente un porcentaje de de gastroprotección  $68.19 \pm 6.71\%$ , al administrar el pretratamiento con L-NAME. En la Figura 14 se pueden observar los efectos antes descritos en estómagos representativos de este tratamiento.



**Figura 13.** Efecto del pretratamiento con L-NAME sobre la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico. Las dosis empleadas se indican en la gráfica. CAR: carbenoxolona, MET: Extracto metanólico. Los resultados se reportan como el promedio  $\pm$  EEM, con  $n \geq 8$ . \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; el análisis estadístico realizado consistió en un análisis de varianza seguido de una comparación múltiple de medias de Dunn.



**Figura 14.** Fotos representativas del efecto que tiene la administración del extracto metanólico y carbenoxolona en la aparición de lesiones hemorrágicas gástricas inducidas por etanol absoluto en ratones pretratados con L-NAME.

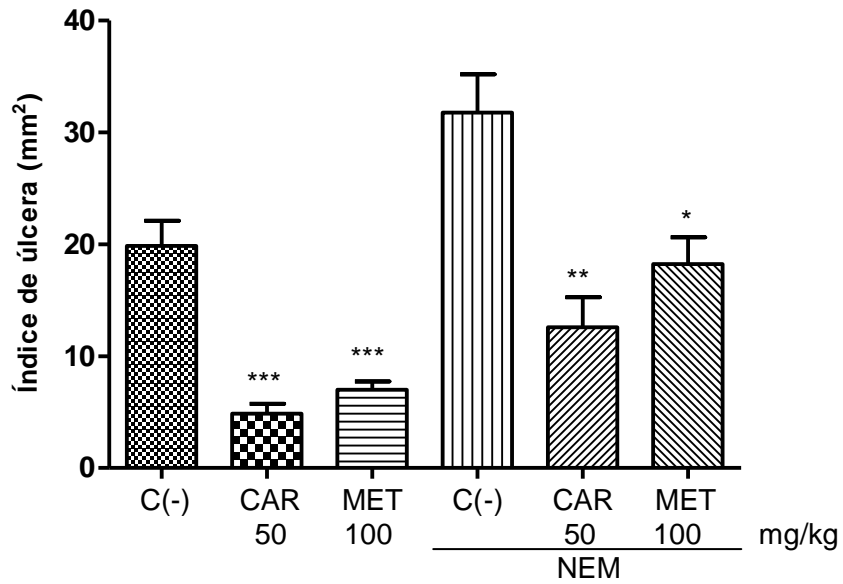
De acuerdo al resultado anterior se puede pensar que la actividad del extracto metanólico puede estar relacionada con la inducción de la síntesis de la enzima óxido nítrico sintasa o en el aumento en la actividad de la misma, dando como resultado un aumento en la concentración de NO en la mucosa gástrica, sin embargo, se necesitan más estudios para ahondar acerca de este mecanismo.

### **5.3.3. Participación de los grupos sulfhidrilos dentro del mecanismo de gastroprotección del extracto metanólico de *C. procera***

El estrés oxidativo también juega un papel importante dentro de la patología del desarrollo de úlceras gástricas (Demir, 2003). Las especies reactivas de oxígeno (EROS), como son el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^-$ ), se generan naturalmente dentro de la mucosa gástrica; sin embargo, el consumo de AINES, la ingesta de etanol (Mutoh, *et al.*, 1990) y probablemente la exposición prolongada al humo del cigarro (Wang, *et al.*, 2000), por mencionar algunos factores, pueden aumentar el estrés oxidativo al incrementar la peroxidación lipídica o al suprimir la actividad de las enzimas antioxidantes que protegen la mucosa gástrica, como son la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y la catalasa (Pohle, *et al.*, 2001).

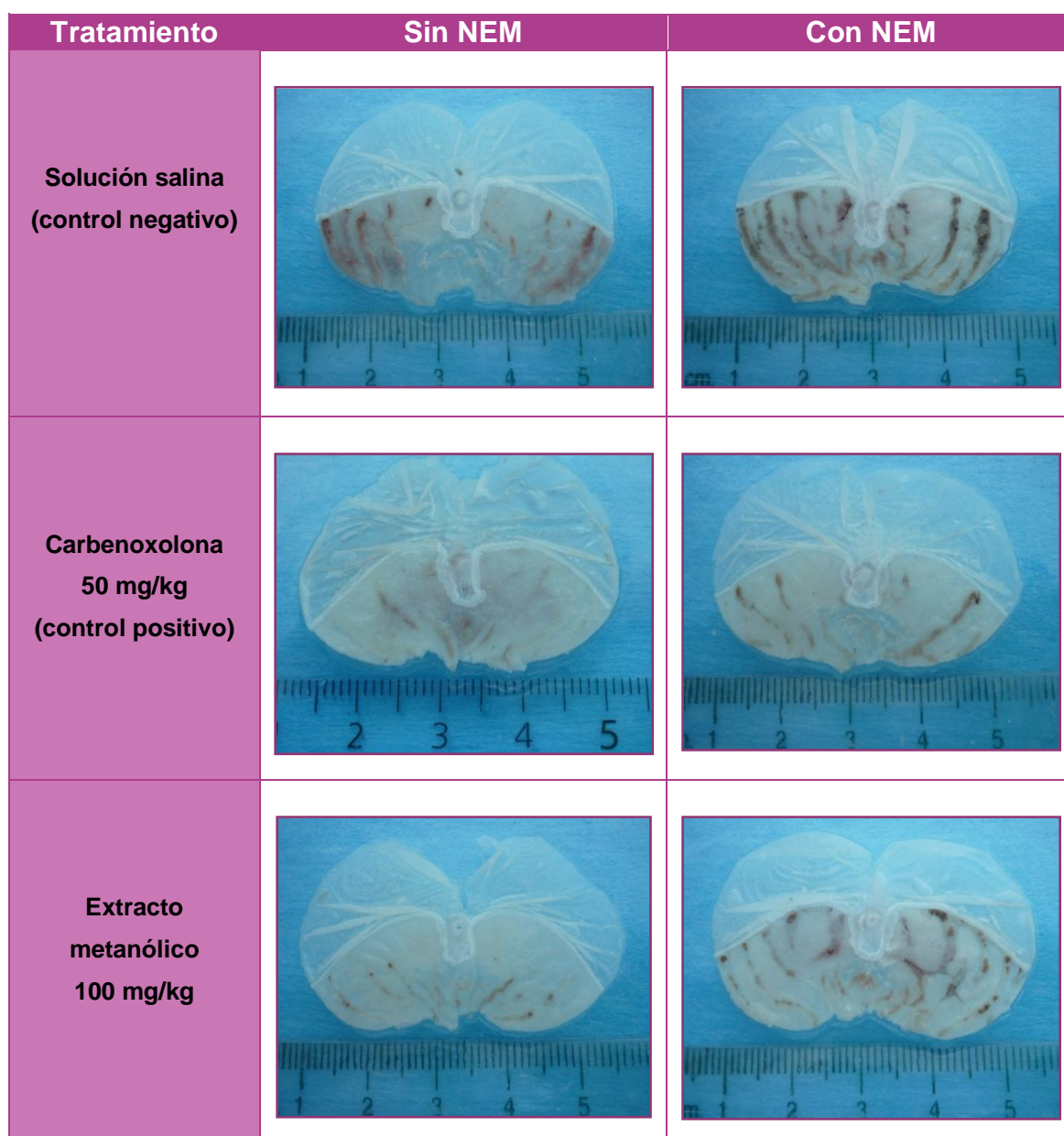
Los grupos sulfhidrilos son agentes protectores de la mucosa gástrica que se encuentran distribuidos tanto intracelular como extracelularmente y actúan como antioxidantes, secuestrando los radicales libres. Una de las especies más representativas de este grupo es el glutatión (Szabo, 1992).

Para estudiar el papel que tienen los grupos sulfhidrilos dentro del efecto gastroprotector del extracto metanólico se administró un pretratamiento con NEM, un bloqueador de los grupos sulfhidrilos. La administración de NEM provoca una disminución parcial de la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico (Figura 15), presentando un porcentaje de gastroprotección de  $42.58 \pm 7.54\%$ . Esto quiere decir que la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico es conferida en parte por la actividad de los grupos sulfhidrilos, sugiriendo que posee cierta actividad antioxidante, posiblemente relacionado con un aumento en los niveles de agentes antioxidantes en la mucosa gástrica.



**Figura 15.** Efecto del pretratamiento con NEM sobre la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico. Las dosis empeladas se indican en la gráfica. CAR: carbenoxolona, MET: Extracto metanólico. Los resultados se reportan como el promedio  $\pm$  EEM, con  $n \geq 8$ . \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; el análisis estadístico realizado consistió en; análisis de varianza seguido de una comparación múltiple de medias de Dunn.

En el caso de la carbenoxolona se volvió a presentar una disminución de su actividad, dando un porcentaje de gastroprotección de  $60.41 \pm 8.51\%$ . En la Figura 16 se muestran algunos estómagos representativos de la actividad gasroprotectora del extracto metanólico y carbenoxolona.

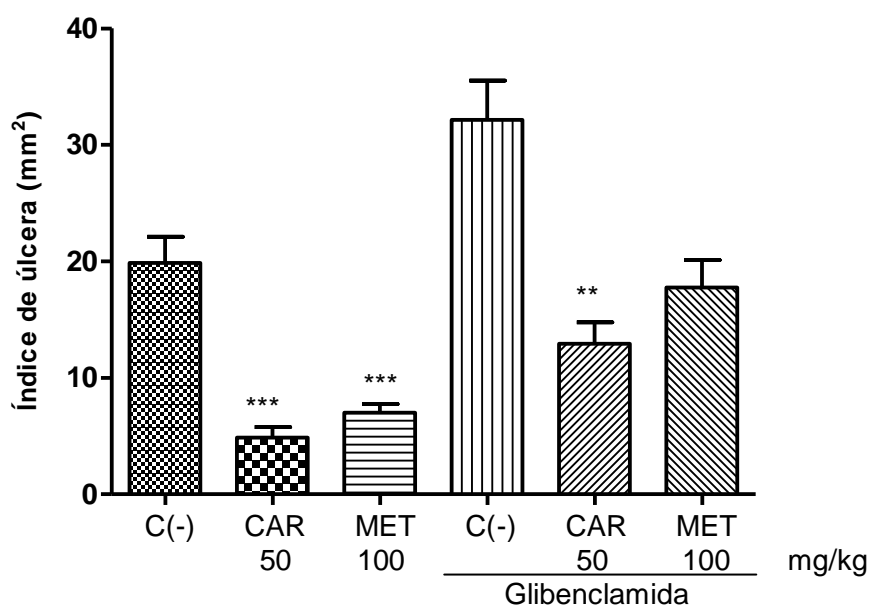


**Figura 16.** Fotos representativas del efecto que tiene la administración del extracto metanólico y carbenoxolona en la aparición de lesiones hemorrágicas gástricas inducidas por etanol absoluto en ratones pretratados con NEM.

#### **5.3.4. Participación de los canales de potasio dependientes de ATP dentro del mecanismo de gastroprotección del extracto metanólico de *C. procera***

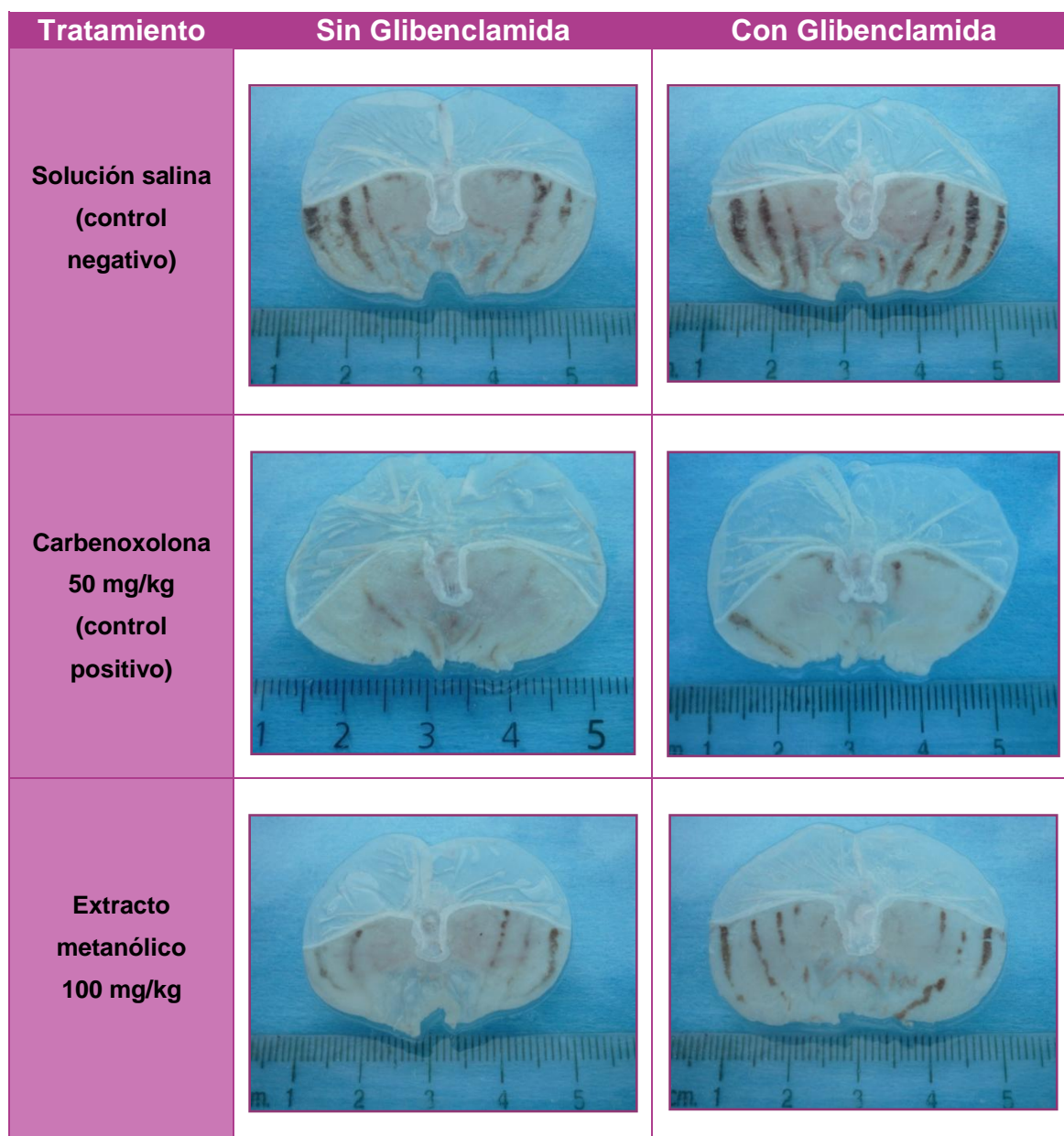
Para estudiar la participación de los canales de potasio dependientes de ATP dentro de la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico se administró un pretratamiento con glibenclamida, agente que tiene la propiedad

de bloquear estos canales, generando como consecuencia una vasoconstricción sobre el tejido gástrico. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con glibenclamida también disminuye de forma parcial la actividad del extracto, pero en una proporción significativamente menor ( $p \leq 0.05$ ) que con los tres pretratamientos anteriores (Figura 17), presentando un porcentaje de gastroprotección de  $44.80 \pm 7.36\%$ . Esto quiere decir que la activación de los canales de potasio dependientes de ATP es uno de los mecanismos que también participan en la actividad gastroprotectora del extracto, aunque existan otros factores que tengan más impacto sobre la actividad. Por el contrario, la carbenoxolona presentó una disminución de su actividad similar a la que presentó con los pretratamientos de indometacina, L-NAME y NEM, con  $59.81 \pm 5.72\%$  de gastroprotección con el pretratamiento de glibenclamida. En la Figura 18 se muestran los efectos antes descritos en estómagos representativos de estos tratamientos.



**Figura 17.** Efecto del pretratamiento con glibenclamida sobre la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico. Las dosis empleadas se indican en la gráfica. CAR: carbenoxolona, MET: Extracto metanólico. Los resultados se reportan como el promedio  $\pm$  EEM, con  $n \geq 8$ . \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; el análisis estadístico realizado consistió en; análisis de varianza seguida de una comparación múltiple de medias de Dunn.





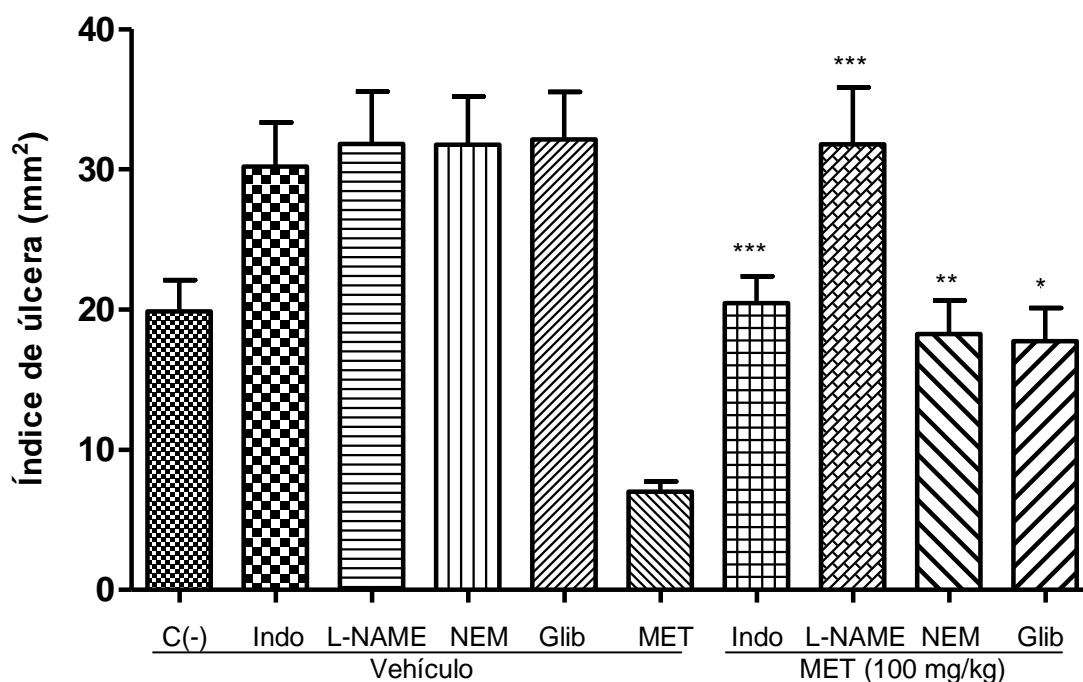
**Figura 18.** Fotos representativas del efecto que tiene la administración del extracto metanólico y carbenoxolona en la aparición de lesiones hemorrágicas gástricas inducidas por etanol absoluto en ratones pretratados con glibenclamida.

Peskar en el 2002 propuso que uno de los mecanismos por los cuales las prostaglandinas ejercen su efecto gastroprotector es la activación de los canales de potasio dependientes de ATP. Tomando en cuenta que los resultados preliminares de este trabajo evidencian que la administración del extracto metanólico provoca un aumento en la concentración de prostaglandinas dentro de la mucosa gástrica (Figura 11), se cree que la



apertura de este tipo de canales puede deberse al aumento en la concentración de estas prostaglandinas.

En la Figura 19 se muestra el efecto comparativo de los cuatro pretratamientos sobre la actividad del extracto metanólico, puede observarse que la participación del óxido nítrico es el mecanismo que tiene más impacto dentro de la actividad antiulcerogénica del extracto, seguido de la participación de las prostaglandinas endógenas. Tanto los grupos sulfhidrilos como los canales  $K^+_{ATP}$  están involucrados en el efecto protector de la mucosa gástrica que confiere la administración del extracto, pero en menor grado que los mecanismos anteriores.



**Figura 19.** Resumen del efecto de los cuatro pretratamientos sobre la actividad antiulcerogénica del extracto metanólico. Los resultados se reportan como el promedio  $\pm$  EEM, con  $n \geq 8$ . \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; el análisis estadístico realizado consistió en; análisis de varianza seguida de una comparación múltiple de medias de Dunn.

Aunque con estos ensayos se proporcionan información relevante acerca de cómo es que actúa el extracto metanólico para ejercer su efecto gastroprotector, su mecanismo de acción no está completamente elucidado, ya que no se sabe si además de estos, existan otros factores que también

podieran estar involucrados en su mecanismo de acción. Sin embargo, puede afirmarse que su efecto se debe a que estimula la activación de varios factores de defensa de la mucosa gástrica, como son el arresto de EROS, el aumento en el flujo sanguíneo y el aumento en la producción de moco y bicarbonato.

#### **5.4. Resolución de úlcera gástrica**

Para un tratamiento adecuado de las úlceras gástricas no solo es importante el prevenir la formación de nuevas úlceras, sino que también es primordial favorecer o acelerar el proceso de resolución de las mismas (Ishihara, *et al.*, 2011). Si bien, el presente trabajo demuestra que el extracto metanólico ejerce actividad gastroprotectora (Figura 8), corroborando lo reportado anteriormente por Escobedo-Hinojosa y colaboradores en 2012, esto no necesariamente significa que también posea la capacidad de promover la curación de las úlceras y la cicatrización en la mucosa gástrica. Por esta razón, se procedió a realizar un experimento de resolución de la úlcera a nivel subagudo. Previo a la realización de este protocolo, se evaluó la toxicidad subaguda.

##### **5.4.1. Evaluación de la toxicidad subaguda del extracto metanólico de *C. procera***

Esta especie es utilizada dentro de la medicina tradicional mexicana como tratamiento de enfermedades gastrointestinales y padecimientos del riñón y no se tiene reportado ningún tipo de efecto tóxico por su uso (Argueta, *et al.*, 1994). Sin embargo, dado que es un producto que está destinado al consumo humano, es importante que se realicen estudios de toxicidad (Pallara y Velikkakathu, 2012).

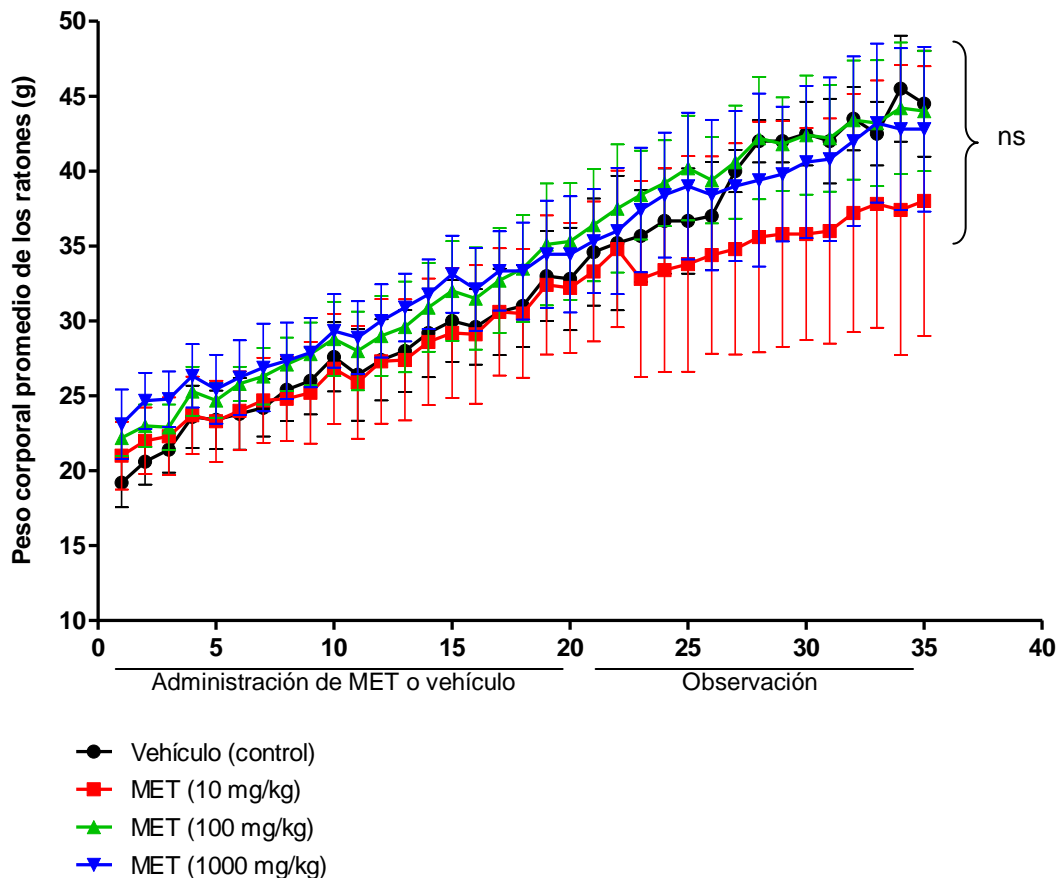
Ya se tenía conocimiento acerca de la seguridad del uso del extracto metanólico como tratamiento de administración aguda en ratón (Escobedo-Hinojosa, *et al.*, 2012), sin embargo, no se contaba con ningún tipo de información acerca de su administración subaguda o crónica. Tomando en

cuenta lo anterior, uno de los objetivos de este trabajo fue el determinar la toxicidad subaguda del extracto metanólico en un modelo de ratón.

Para este ensayo se administró el extracto metanólico a tres dosis distintas (10, 100 y 1000 mg/kg/día) y solución salina (vehículo de los tratamientos) como control negativo, durante 20 días. Los grupos experimentales consistieron en 6 individuos cada uno. La mitad de cada grupo fue sacrificada al día 20 de administración. Los individuos de experimentación restantes, se mantuvieron en observación durante 15 días más. Durante este tiempo, no se reportaron muertes ni se detectaron cambios en la actividad, comportamiento o la postura de los ratones, así como tampoco en la apariencia externa de los mismos, que pudieran estar relacionados con la administración consecutiva del extracto metanólico.

Los resultados de este ensayo mostraron que a ninguna dosis del extracto metanólico se provocó la muerte de alguno de los organismos de experimentación, de igual manera no se presentaron muertes en el grupo control.

Los ratones fueron pesados diariamente para poder determinar si había algún cambio en el peso corporal. Durante los 20 días de administración y del tiempo de observación posterior, no se detectaron cambios significativos en el peso corporal de los ratones en ninguno de los grupos que fueron administrados con el extracto metanólico, en comparación con el grupo administrado con el vehículo (Figura 20).



**Figura 20.** Peso corporal de los ratones durante el ensayo de toxicidad subaguda del extracto metanólico de *C. procerca*. Se muestra el cambio en el peso corporal de cada grupo durante la administración por 20 días consecutivos del extracto metanólico (MET) a 3 diferentes dosis (10, 100 y 1000 mg/kg/día) y de solución salina (control) y durante los 15 días de observación posteriores. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  EEM, con  $n \geq 8$ . \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; el análisis estadístico realizado consistió en un análisis de varianza seguida de una comparación múltiple de medias de Dunn, ns denota diferencias no significativas.

Después de cada tiempo de experimentación, es decir, después de los 20 días de administración del extracto metanólico a diferentes dosis y después de los 15 días de observación posteriores, a los ratones se les realizó una punción cardiaca para extraer la sangre. Posteriormente se realizó un hemograma con la sangre completa y una bioquímica sanguínea con el suero de cada ratón. Los ratones fueron sometidos a necropsia y se extirparon varios de sus órganos internos para obtener su peso. Para su análisis, se reporta el peso de los órganos (Tabla 4) y el peso relativo de los mismos (Tabla 5). No se encontraron diferencias notables en ninguno de los órganos para ambos

tiempos al comparar los grupos tratados con las tres dosis del extracto metanólico con el grupo control (tratado con el vehículo) y con el grupo de ratones sin tratamientos. Asimismo, no se detectaron cambios en la apariencia macroscópica de los órganos internos, tomando en cuenta el tamaño, color o la textura de estos, comparados con los del grupo control.

Para tener una mayor certeza de que la administración por 20 días consecutivos del extracto metanólico a dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg no provoca algún efecto tóxico en los individuos de experimentación, se realizó un análisis histológico de algunos órganos internos (hígado, riñones, bazo, intestino delgado e intestino grueso) con miras a la búsqueda de manifestaciones tóxicas dentro del tejido de los órganos. Los resultados preliminares indican que no hay diferencias entre los órganos de los ratones tratados con el extracto metanólico a cualquiera de las dosis probadas, y los órganos de los ratones del grupo control tratado con solución salina.

A partir de la sangre obtenida por la punción cardiaca se determinaron varios parámetros hematológicos en todos los grupos a ambos tiempos de muestreo. El análisis hematológico incluyó la determinación de hematocrito, concentración de hemoglobina, conteo de eritrocitos, volumen globular medio calculado, concentración globular media de hemoglobina calculada, concentración de proteínas totales y conteo de leucocitos, neutrófilos, bandas, metamielocitos, mielocitos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. Al comparar estos parámetros obtenidos de los ratones administrados con el extracto metanólico a las tres dosis probadas con los ratones pertenecientes al grupo control, no se pueden apreciar diferencias importantes (Tabla 6). Además, todos los parámetros determinados, tanto de los controles negativos como de los grupos tratados con el extracto metanólico a las tres dosis administradas, se encuentran dentro de los límites de referencia, a excepción del valor de hematocrito, es muy posible que estos valores se hayan visto alterados en la toma y manejo de la muestra.

Dentro del análisis de bioquímica sanguínea, se determinaron los niveles de colesterol, creatinina, glucosa, triglicéridos, urea, bilirrubina, fosfatasa

alcalina, alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) del suero de los ratones administrados con solución salina y tres dosis del extracto metanólico. En los resultados preliminares no se observan diferencias entre ninguno de los grupos de estudio para todos los parámetros antes mencionados.

Con estos resultados no se puede asegurar que el extracto metanólico sea inocuo, ya que no se puede descartar que tenga algún tipo de toxicidad a dosis más altas, o bien, a dosis más bajas que impliquen más de una administración por día. Lo que sí es evidente, es que las dosis utilizadas para la determinación de la toxicidad subaguda son mucho mayores a la  $DE_{50}$  para la actividad gastroprotectora calculada en este trabajo ( $DE_{50} = 0.71 \text{ mg/kg}$ ), se puede decir que al menos se tiene un alto índice terapéutico, el cual puede dar un indicio de la seguridad relativa del extracto, al tratarse de una relación entre la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) y la  $DE_{50}$ .

El conocimiento de que la administración aguda del extracto metanólico de *C. procera* no es tóxico en un modelo de ratón (Escobedo-Hinojosa, *et al.*, 2012), junto con los resultados obtenidos para la determinación de toxicidad subaguda nos proporciona información suficiente en cuanto a la seguridad del uso de este extracto para ser empleado en el modelo de resolución de úlcera gástrica que se describe más adelante.

No se puede dejar de tomar en cuenta que al tratarse de un modelo animal, los resultados no pueden extrapolarse a la administración en humanos. Este estudio solo deja ver la seguridad del extracto metanólico para ser usado en ensayos de administración subaguda en modelos en ratón, sin embargo, da la pauta para seguir realizando estudios, con miras a considerar su uso como parte de un tratamiento en humanos.

**Tabla 4.** Peso de diferentes órganos de los ratones después de ser tratados con el extracto metanólico durante 20 días y después de 15 días de observación posteriores al tratamiento

Órganos	Sin tratamiento	20 Días de administración				20 Días de administración + 15 días de reposo			
		Control Negativo (vehículo)	MET (10 mg/kg/día)	MET (100 mg/kg/día)	MET (1000 mg/kg/día)	Control Negativo (vehículo)	MET (10 mg/kg/día)	MET (100 mg/kg/día)	MET (1000 mg/kg/día)
<b>Cerebro</b>	444.3 ± 9.8	434.0 ± 5.9	444.0 ± 8.4	467.0 ± 10.8	449.3 ± 16.3	470.0 ± 5.2	462.8 ± 9.8	472.6 ± 21.4	460.6 ± 18.2
<b>Corazón</b>	161.0 ± 14.6	149.0 ± 8.0	182.4 ± 6.3	160.2 ± 17.2	155.3 ± 12.1	204.0 ± 2.3	151.2 ± 11.4	187.8 ± 6.3	195.0 ± 17.0
<b>Hígado</b>	2663.3 ± 202.7	1973.0 ± 250.7	2484.4 ± 135.3	2046.6 ± 266.8	2191.8 ± 293.3	2143.5 ± 121.5	1980.0 ± 127.2	2374.6 ± 292.8	2270.6 ± 345.5
<b>Timo</b>	14.0 ± 2.0	13.3 ± 1.8	11.2 ± 1.0	14.2 ± 1.3	10.5 ± 1.2	12.0 ± 0.0	9.8 ± 1.5	9.4 ± 1.4	9.2 ± 0.9
<b>Vaso</b>	317.3 ± 2.7	284.7 ± 33.2	241.0 ± 16.7	257.2 ± 29.8	213.0 ± 17.8	243.5 ± 2.6	270.0 ± 47.0	269.4 ± 29.5	199.6 ± 15.6
<b>Riñón derecho</b>	224.7 ± 8.1	226.3 ± 26.6	262.2 ± 11.4	262.2 ± 32.3	223.5 ± 16.8	283.0 ± 9.2	221.2 ± 13.1	307.8 ± 19.4	282.8 ± 20.3
<b>Riñón izquierdo</b>	245.0 ± 6.8	240.0 ± 38.2	270.6 ± 15.1	276.8 ± 25.8	247.5 ± 19.5	263.0 ± 10.4	244.0 ± 12.1	316.2 ± 21.6	301.8 ± 26.0
<b>Glándula adrenal derecha</b>	4.3 ± 0.9	4.7 ± 0.9	4.8 ± 0.7	5.2 ± 0.9	3.8 ± 0.5	4.5 ± 0.3	3.4 ± 0.2	3.8 ± 0.4	4.0 ± 0.0
<b>Glándula adrenal izquierda</b>	3.0 ± 1.0	4.7 ± 0.3	5.6 ± 0.4	4.2 ± 0.9	4.8 ± 0.8	4.5 ± 0.3	3.6 ± 0.2	4.4 ± 0.5	3.2 ± 0.2
<b>Pulmones</b>	276.3 ± 12.0	251.0 ± 13.6	257.8 ± 8.9	258.0 ± 16.7	239.5 ± 16.8	331.0 ± 36.9	410.8 ± 168.9	266.8 ± 26.9	275.4 ± 35.3
<b>Testículo derecho</b>	146.0 ± 7.9	106.0 ± 14.0	123.0 ± 5.4	131.0 ± 5.6	107.0 ± 6.3	144.0 ± 17.3	116.4 ± 8.4	140.4 ± 13.2	126.8 ± 3.6
<b>Testículo izquierdo</b>	147.7 ± 4.9	106.0 ± 18.7	133.4 ± 7.0	136.8 ± 6.3	114.3 ± 3.9	155.0 ± 17.3	123.0 ± 6.9	145.8 ± 9.3	134.4 ± 4.2
<b>Estómago</b>	354.3 ± 66.0	327.0 ± 6.1	346.0 ± 6.5	372.0 ± 25.2	335.8 ± 18.1	349.0 ± 11.0	281.0 ± 33.3	324.2 ± 9.3	341.2 ± 22.6
<b>Intestino</b>	6223.0 ± 478.7	4811.3 ± 131.2	5497.4 ± 351.8	5130.6 ± 505.6	5482.3 ± 357.9	5124.0 ± 168.6	4442.4 ± 404.6	4859.8 ± 153.9	4489.2 ± 353.1

MET: extracto metanólico. Los valores reportados se refieren al promedio ± EEM, con n ≥ 3 para cada grupo

**Tabla 5.** Peso relativo de diferentes órganos de los ratones después de ser tratados con el extracto metanólico durante 20 días y después de 15 días de observación posteriores al tratamiento

Órganos	Sin tratamiento	20 Días de administración				20 Días de administración + 15 días de reposo			
		Control Negativo (vehículo)	MET (10 mg/kg/día)	MET (100 mg/kg/día)	MET (1000 mg/kg/día)	Control Negativo (vehículo)	MET (10 mg/kg/día)	MET (100 mg/kg/día)	MET (1000 mg/kg/día)
<b>Cerebro</b>	1.154 ± 0.065	1.298 ± 0.114	1.247 ± 0.071	1.352 ± 0.098	1.301 ± 0.119	1.058 ± 0.023	1.256 ± 0.091	0.875 ± 0.193	1.086 ± 0.060
<b>Corazón</b>	0.415 ± 0.024	0.442 ± 0.024	0.511 ± 0.028	0.452 ± 0.025	0.441 ± 0.009	0.460 ± 0.020	0.407 ± 0.035	0.351 ± 0.078	0.453 ± 0.014
<b>Hígado</b>	6.868 ± 0.270	5.774 ± 0.224	6.904 ± 0.176	5.815 ± 0.551	6.134 ± 0.349	4.805 ± 0.117	5.301 ± 0.264	4.443 ± 1.072	5.221 ± 0.486
<b>Timo</b>	0.037 ± 0.006	0.040 ± 0.005	0.032 ± 0.004	0.042 ± 0.006	0.030 ± 0.004	0.027 ± 0.001	0.027 ± 0.005	0.015 ± 0.004	0.022 ± 0.002
<b>Vaso</b>	0.823 ± 0.026	0.835 ± 0.032	0.679 ± 0.069	0.723 ± 0.032	0.604 ± 0.012	0.549 ± 0.024	0.721 ± 0.127	0.524 ± 0.127	0.465 ± 0.019
<b>Riñón derecho</b>	0.581 ± 0.001	0.663 ± 0.021	0.730 ± 0.016	0.734 ± 0.034	0.636 ± 0.023	0.636 ± 0.000	0.595 ± 0.036	0.567 ± 0.125	0.663 ± 0.038
<b>Riñón izquierdo</b>	0.636 ± 0.031	0.699 ± 0.069	0.751 ± 0.016	0.782 ± 0.026	0.703 ± 0.011	0.595 ± 0.043	0.657 ± 0.039	0.596 ± 0.133	0.704 ± 0.037
<b>Glándula adrenal derecha</b>	0.011 ± 0.003	0.014 ± 0.003	0.014 ± 0.002	0.015 ± 0.002	0.011 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.009 ± 0.000	0.007 ± 0.002	0.009 ± 0.001
<b>Glándula adrenal izquierda</b>	0.008 ± 0.003	0.014 ± 0.002	0.016 ± 0.001	0.012 ± 0.002	0.014 ± 0.002	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.009 ± 0.002	0.008 ± 0.001
<b>Pulmones</b>	0.719 ± 0.056	0.747 ± 0.058	0.725 ± 0.052	0.743 ± 0.057	0.684 ± 0.035	0.754 ± 0.108	1.119 ± 0.490	0.482 ± 0.110	0.636 ± 0.045
<b>Testículo derecho</b>	0.378 ± 0.023	0.310 ± 0.020	0.346 ± 0.025	0.377 ± 0.022	0.309 ± 0.029	0.321 ± 0.029	0.311 ± 0.016	0.263 ± 0.061	0.299 ± 0.011
<b>Testículo izquierdo</b>	0.383 ± 0.016	0.308 ± 0.037	0.376 ± 0.032	0.393 ± 0.021	0.330 ± 0.025	0.346 ± 0.028	0.330 ± 0.018	0.273 ± 0.061	0.317 ± 0.018
<b>Estómago</b>	0.906 ± 0.138	0.982 ± 0.108	0.968 ± 0.036	1.059 ± 0.032	0.961 ± 0.043	0.784 ± 0.001	0.741 ± 0.057	0.615 ± 0.138	0.797 ± 0.023
<b>Intestino</b>	16.076 ± 0.890	14.396 ± 1.393	15.276 ± 0.565	14.469 ± 0.481	15.660 ± 0.834	11.588 ± 0.755	11.983 ± 1.282	9.209 ± 2.080	10.441 ± 0.284

MET: extracto metanólico. Los valores reportados se refieren al promedio ± EEM, con n ≥ 3 para cada grupo



**Tabla 6.** Valores hematológicos de los ratones después de ser tratados con el extracto metanólico durante 20 días y después de 15 días de observación posteriores al tratamiento

Analito	Unidades	20 Días de administración				20 Días de administración + 15 días de reposo			
		Control Negativo	MET (10 mg/kg/día)	MET (100 mg/kg/día)	MET (1000 mg/kg/día)	Control Negativo	MET (10 mg/kg/día)	MET (100 mg/kg/día)	MET (1000 mg/kg/día)
Hematocrito	L/L	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.31 ± 0.05	0.40 ± 0.03	0.44 ± 0.02	0.38 ± 0.01
Hemoglobina	g/L	123.67 ± 5.24	115.33 ± 4.91	114.00 ± 6.66	133.67 ± 7.86	97.50 ± 15.88	136.00 ± 8.50	145.67 ± 6.12	123.00 ± 5.61
Eritrocitos	X10 <sup>12</sup> /L	7.70 ± 0.36	7.17 ± 0.42	7.10 ± 0.31	9.10 ± 0.93	5.90 ± 1.10	8.83 ± 0.84	8.57 ± 1.13	7.85 ± 0.25
VGM calculado	fL	47.33 ± 2.19	48.33 ± 1.76	47.33 ± 1.20	43.33 ± 1.33	52.00 ± 0.58	45.33 ± 2.03	52.67 ± 7.17	48.75 ± 1.65
CGMH calculado	g/L	340.33 ± 3.18	332.33 ± 10.91	339.00 ± 2.89	343.67 ± 6.36	323.00 ± 5.77	341.00 ± 6.11	333.67 ± 0.88	321.25 ± 6.13
Proteínas totales	g/L	54.67 ± 2.40	51.00 ± 0.58	59.67 ± 4.63	50.33 ± 1.45	58.50 ± 5.48	54.67 ± 1.45	52.00 ± 1.15	50.50 ± 3.66
Leucocitos	X10 <sup>9</sup> /L	3.27 ± 0.19	1.83 ± 0.33	2.40 ± 0.61	2.87 ± 1.10	5.25 ± 1.88	1.93 ± 0.17	2.60 ± 0.85	2.33 ± 0.59
Neutrófilos	X10 <sup>9</sup> /L	0.68 ± 0.07	0.71 ± 0.15	0.40 ± 0.12	0.64 ± 0.17	1.58 ± 0.70	0.73 ± 0.03	1.37 ± 0.65	0.83 ± 0.38
Bandas	X10 <sup>9</sup> /L	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Metamielocitos	X10 <sup>9</sup> /L	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Mielocitos	X10 <sup>9</sup> /L	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Linfocitos	X10 <sup>9</sup> /L	2.35 ± 0.09	1.03 ± 0.30	1.87 ± 0.64	1.88 ± 0.78	3.51 ± 1.09	1.19 ± 0.16	1.13 ± 0.29	1.48 ± 0.32
Monocitos	X10 <sup>9</sup> /L	0.23 ± 0.14	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.06	0.33 ± 0.23	0.16 ± 0.08	0.01 ± 0.01	0.10 ± 0.00	0.03 ± 0.025
Eosinófilos	X10 <sup>9</sup> /L	0.10 ± 0.10	0.01 ± 0.007	0.03 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.007	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Basófilos	X10 <sup>9</sup> /L	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

MET: extracto metanólico, VGM: volumen globular medio, CGMH: concentración globular media de hemoglobina

Los valores reportados se refieren al promedio ± EEM, con n ≥ 3 para cada grupo

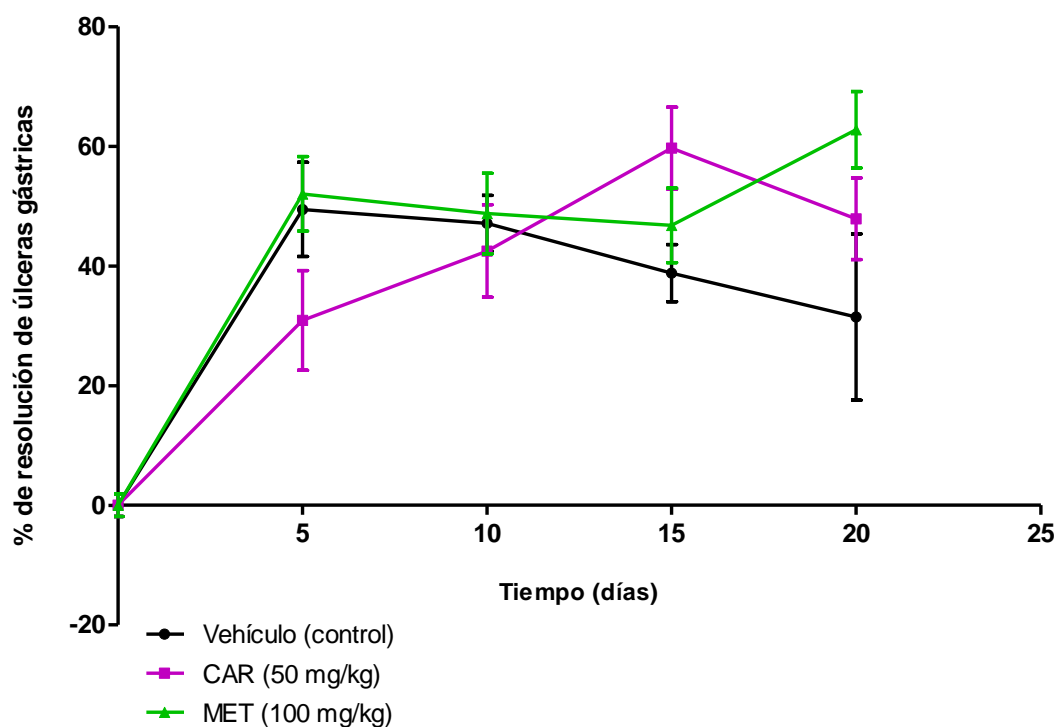
#### **5.4.2. Modelo de resolución de úlcera gástrica**

Este procedimiento experimental se realizó con el fin de determinar si la actividad del extracto metanólico dentro de la mucosa gástrica solo se limitaba a ser un agente protector o si también tenía la capacidad de resarcir o acelerar el proceso de resolución de las úlceras gástricas. Primero, se indujo la formación de úlceras gástricas con etanol absoluto. Posteriormente, durante un periodo de 20 días, se administró el extracto a una dosis de 100 mg/kg/día o carbenoxolona 50 mg/kg/día (como fármaco de referencia) y se compararon contra un grupo control al cual se administró solución salina, monitoreando los efectos a los 5, 10, 15 y 20 días.

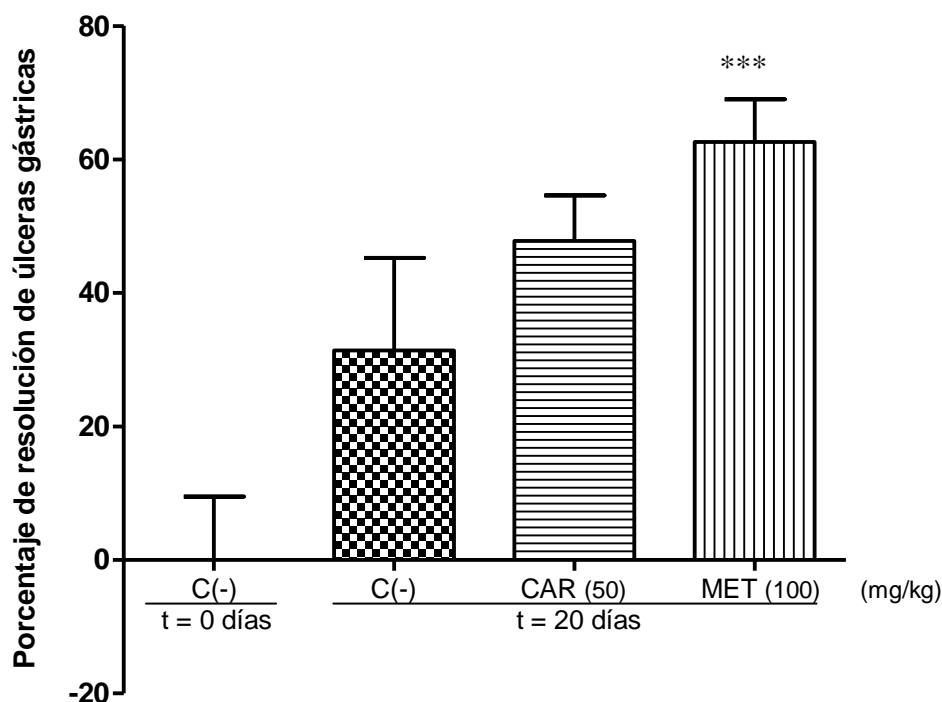
Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que el tratamiento con el extracto metanólico presentó un efecto de resolución de úlceras significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) al observado con el tratamiento con carbenoxolona y con la administración de solución salina (Figura 21).

Tanto la administración de solución salina como la administración de los tratamientos utilizados presentan un porcentaje de resolución de úlceras gástricas elevado que se puede ver desde los 5 días después de la inducción del daño con etanol (Figura 21). Este efecto se debe en gran medida a los mecanismos de defensa naturales de la mucosa gástrica, ya que este efecto se presenta con claridad en el grupo control (porcentaje de resolución de úlceras  $31.5 \pm 13.9\%$ ). Sin embargo, este nivel de resolución de úlcera gástrica en el grupo control, tratado con solución salina, se mantiene hasta los 20 días sin cambios realmente significativos. En cambio, a los 20 días de administración continua del extracto metanólico se presenta un aumento significativo del porcentaje de resolución de úlceras gástricas, con un  $62.7 \pm 6.4\%$  (Figura 22).

Por el contrario la administración de carbenoxolona induce una resolución de úlcera gástrica más lenta que en el caso del control negativo y el extracto metanólico, pero que va aumentando desde el día 5 al día 15 y se mantiene constante hasta el término del ensayo (Figura 21).

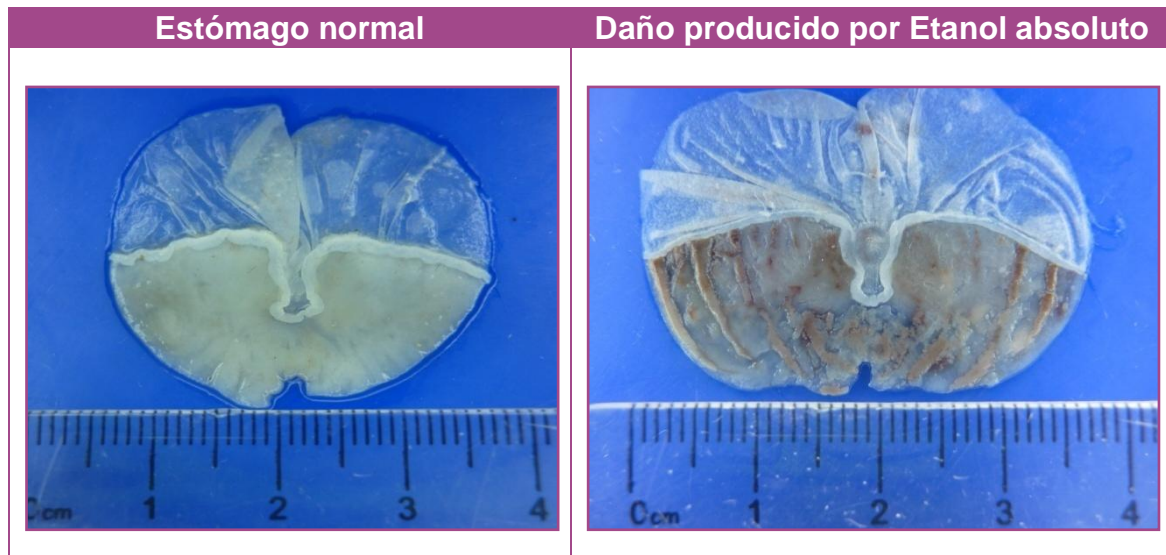


**Figura 21.** Evolución de la resolución de úlcera gástrica con el tratamiento de extracto metanólico durante 20 días consecutivos. Los resultados se comparan con el porcentaje de resolución de úlcera resultante de la administración del vehículo como grupo control y de carbenoxolona como fármaco de referencia. MET: extracto metanólico; CAR: carbenoxolona. Las concentraciones usadas se muestran en la figura. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  EEM.



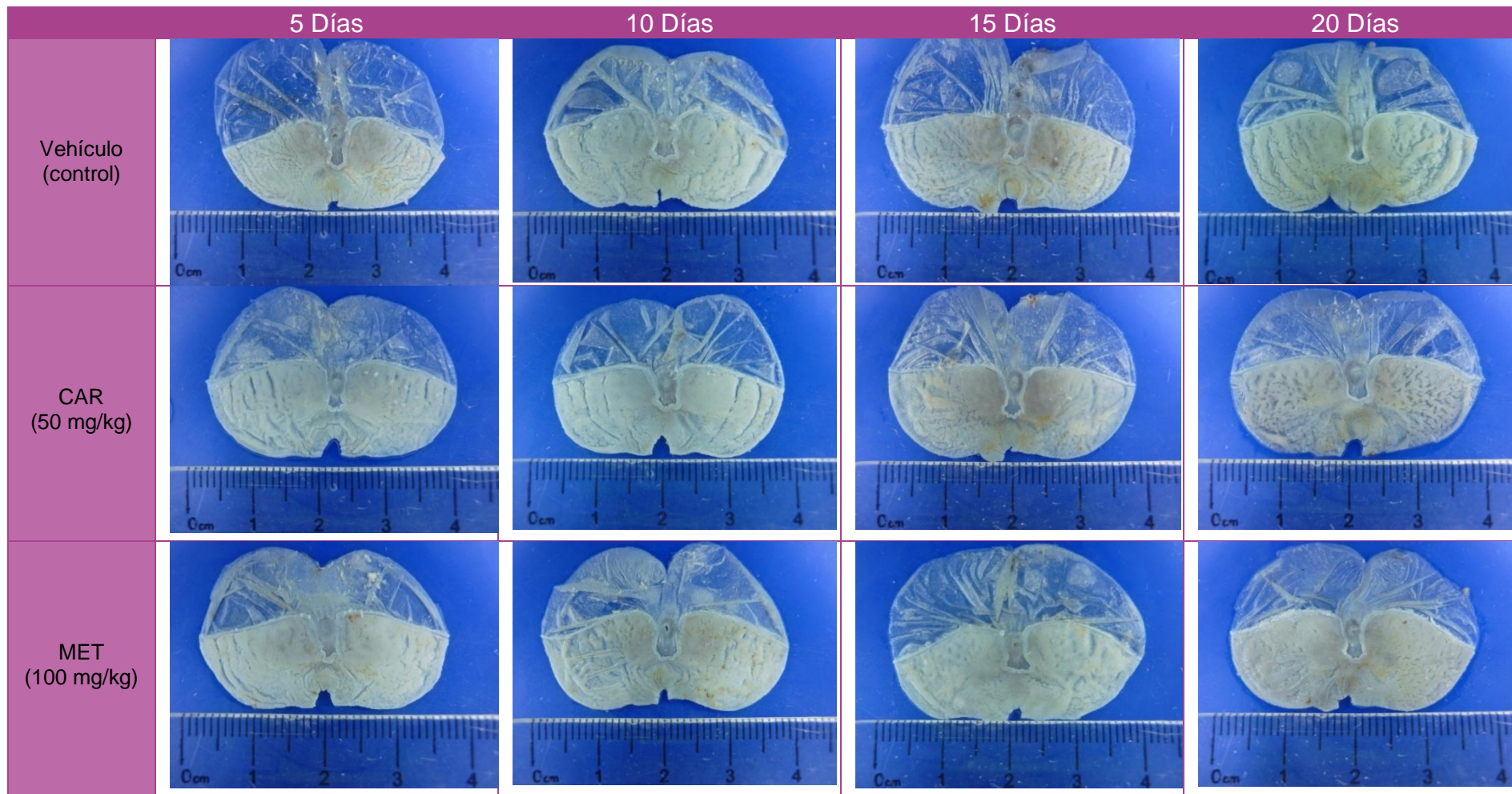
**Figura 22.** Efecto de resolución de úlcera gástrica al día 20 tras el tratamiento consecutivo con el extracto metanólico a 100 mg/kg/día, carbenoxolona a 50 m/kg/día y solución salina como control comparado con el daño inducido por la administración de etanol absoluto (t= 0 días). Los resultados se reportan como el promedio  $\pm$  E.E.M., con  $n \geq 8$ . \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; el análisis estadístico realizado consistió en un análisis de varianza seguido de una comparación múltiple de medias de Dunn.

La resolución de úlceras gástricas inducidas dentro de este modelo experimental es un proceso que puede observarse de manera macroscópica. En la Figura 23 se hace la comparación entre la apariencia de la mucosa gástrica de un estómago normal y la de un estómago dañado con etanol (una hora y media tras la administración de etanol absoluto). En un estómago normal, es decir, un estómago proveniente de un ratón que no ha sido sometido a ningún tratamiento experimental, la apariencia de la mucosa gástrica debe ser lisa y de color uniforme. Al ser administrados con etanol absoluto, a una dosis de 7 mL/kg, los ratones presentan las lesiones hemorrágicas características a lo largo de toda la mucosa gástrica.



**Figura 23.** Imágenes representativas de apariencia de la mucosa gástrica normal y la mucosa gástrica con un daño inducido por la administración aguda de etanol absoluta una dosis de 7 mL/kg.

La administración de los diferentes tratamientos a lo largo de este ensayo generó como resultado varias diferencias en la apariencia de la mucosa gástrica (Figura 24). Con la administración de solución salina desde el día 5 hasta el día 20 se observa que las úlceras permanecen de gran tamaño y siguen siendo muy numerosas. Cabe destacar que como parte del proceso natural de resolución, las úlceras de apariencia hemorrágica, sufren un proceso en el cual la sangre y restos de tejido necrosado se eliminan, sin embargo, el área dañada por la injuria del etanol permanece como una lesión profunda que atraviesa incluso la muscular de la mucosa. Con el tratamiento de carbenoxolona, durante todo el ensayo parece no haber diferencias significativas en cuanto al número de úlceras gástricas, sin embargo, para el día 20, las úlceras se observan de menor longitud. Para el caso del tratamiento con el extracto metanólico se observa que conforme avanza el tiempo del tratamiento, tanto el número de úlceras gástricas como su tamaño van disminuyendo y, por lo tanto, la apariencia de la mucosa gástrica con este tratamiento se ve más uniforme.



**Figura 24.** Fotos representativas de la evolución en la resolución de úlceras gástricas al administrar el extracto metanólico, durante 20 días consecutivos. MET: extracto metanólico; CAR: carbenoxolona

#### **5.4.2.1. Determinación de manifestaciones tóxicas dentro del ensayo de resolución de úlcera gástrica del extracto metanólico de *C. procera***

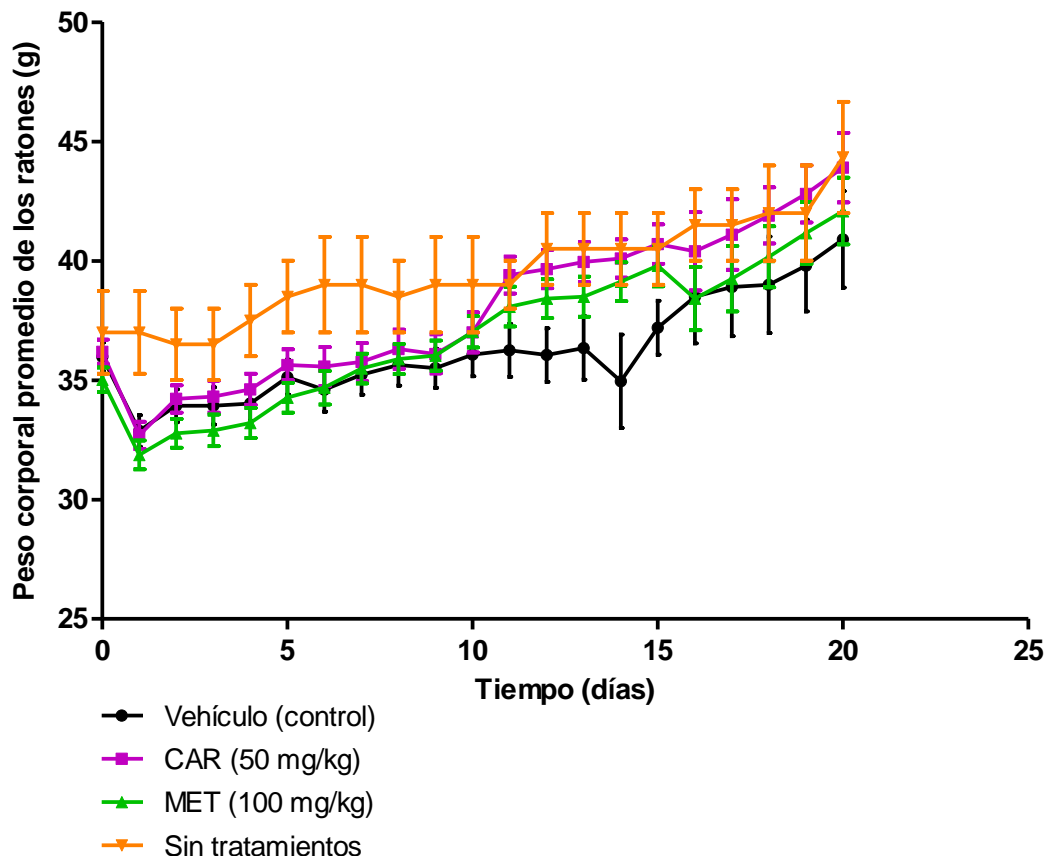
Para asegurar que la administración por 20 días de la carbenoxolona o del extracto metanólico de *C. procera* durante la realización del modelo de resolución de úlcera gástrica no estuviera provocando algunos efectos no deseados que de alguna manera afectaran los resultados del ensayo, se buscaron efectos adversos visibles en los individuos de experimentación de este modelo, como son cambios en la apariencia física y cambios en la conducta, así como efectos letales sobre los mismos. Durante todo el procedimiento experimental no se reportaron efectos adversos ni muerte de ningún individuo de experimentación.

Por otra parte, se monitoreó el peso corporal de los ratones de los grupos tratados con el extracto metanólico, carbenoxolona y con solución salina durante todo el ensayo y se comparó con un grupo de ratones normales, es decir, a los que no se les administró ningún tipo de tratamiento (Figura 25). Los ratones administrados con el extracto metanólico y carbenoxolona no presentan diferencias significativas en comparación con el grupo administrado con solución salina. Sin embargo, se encontró diferencia significativa entre el grupo administrado con solución salina y el grupo sin tratamientos, lo cual podría sugerir que la administración tanto de carbenoxolona como del extracto metanólico mejoran el estado de la mucosa gástrica de los ratones, lo que se ve reflejado en un aumento de peso más apegado a la normalidad.

Dentro del monitoreo del peso corporal se observa que para los tres grupos de ratones con tratamientos en el primer día del procedimiento experimental presentan una disminución en el peso corporal promedio. Esta variación en el peso se debe a que los ratones fueron sometidos a un ayuno de 24 horas justo antes de la inducción de las úlceras gástricas con etanol absoluto, además de que una dosis tan alta de etanol provoca cierto grado de sedación en los ratones (la mayoría de los individuos de experimentación permanecieron dormidos de 2 a 3 horas después de la administración de



etanol), por lo que pasan un periodo muy largo sin ingerir alimento, considerando que los ratones tienen un metabolismo muy acelerado, se ve reflejado en una disminución considerable en el peso corporal.



**Figura 25.** Peso corporal de los ratones durante la realización del modelo de resolución de úlcera gástrica inducida por etanol absoluto en ratón. Se administraron el extracto metanólico (100 mg/kg/día), carbenoxolona (50 mg/Kg/día) y solución salina por 20 días consecutivos después de la inducción las úlceras gástricas, comparados con un grupo sin tratamientos. Los resultados se reportan como el promedio  $\pm$  E.E.M., con  $n \geq 8$ . \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; el análisis estadístico realizado consistió en; análisis de varianza seguida de una comparación múltiple de medias de Dunn.

#### 5.4.2.2. Análisis histológico de los estómagos del modelo de resolución de úlcera gástrica

El análisis de la mucosa gástrica por técnicas histológicas e histoquímicas se realizó a los 5, 10, 15 y 20 días de administración del extracto metanólico, carbenoxolona y el control, administrado con solución salina. Sin



embargo, los resultados más demostrativos se encontraron a los 20 días de administración de los tratamientos, por lo que esos son los que se muestran a continuación (Figura 26 y Figura 27).

El análisis histológico demuestra que el daño en la mucosa gástrica provocada por la administración de etanol absoluto se caracteriza por la disrupción del epitelio gástrico, heridas hemorrágicas con infiltración eritrocitaria y de células inflamatorias.

Tras la administración por 20 días del extracto metanólico, el análisis histológico muestra que hay un aumento significativo en la regeneración de la mucosa gástrica, en la cual se observa una mejor organización glandular, comparada con el grupo control (Figura 26). Se observa que la integridad de la mucosa gástrica se encuentra más conservada, y que se presenta una disminución considerable en el infiltrado inflamatorio (Figura 26), que puede estar relacionada con una reducción de la respuesta inflamatoria debida a una aceleración de la resolución de las úlceras gástricas. Algo muy similar se observa con la administración de carbenoxolona.

Además, se observa que tanto la administración de carbenoxolona como la del extracto metanólico provocan una sobreproducción de moco neutro evidenciada por el análisis histoquímico (Figura 27), el cual se distingue por un color rosa intenso dentro de las preparaciones histológicas. Este moco, al tratarse de un agente protector de la mucosa gástrica, puede considerarse como un factor importante para el proceso de resolución de la úlcera gástrica, debido a que protege a la mucosa gástrica de la acción de agentes agresivos, como el ácido gástrico y la pepsina, de tal manera que, al presentarse una sobreproducción de moco, puede que ejerza un efecto protector, incluso en las zonas en donde se perdió la integridad del epitelio, a causa de la administración del etanol absoluto, y que se promueva un proceso de resolución del daño de mejor calidad o en un menor tiempo. Sin esta sobreproducción del moco gástrico, puede que las secreciones gástricas normales del estómago tengan un efecto nocivo para la mucosa gástrica, ya

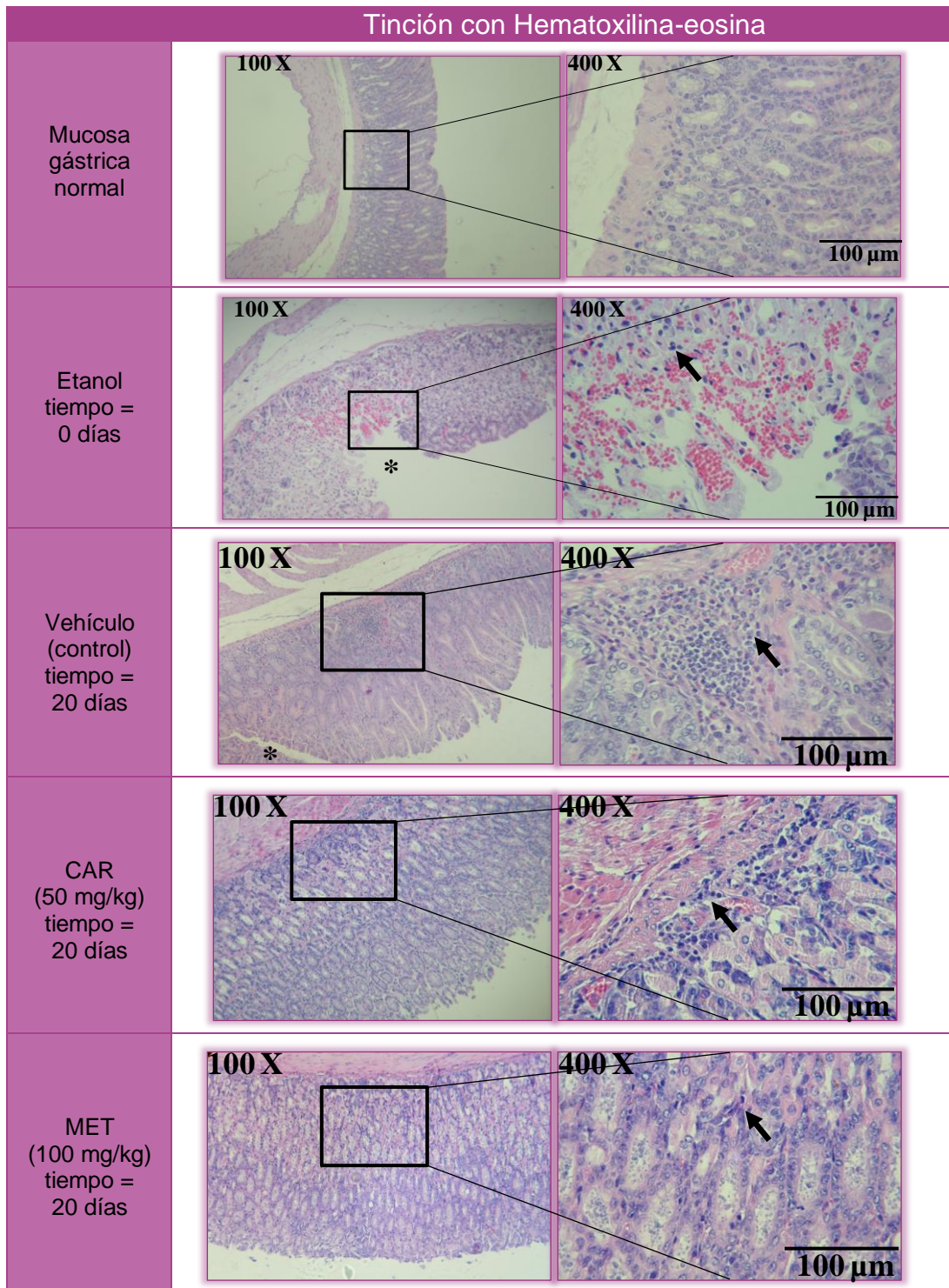
que, en las zonas en donde se indujeron las úlceras se observa una pérdida importante del epitelio gástrico.

Con la información obtenida hasta el momento se puede afirmar que el extracto metanólico acelera el proceso de resolución de úlcera gástrica, pero no se sabe cuáles el mecanismo por el cual se ejerce este efecto. Sin embargo, los resultados del análisis histológico e histoquímico sugieren que uno de los mecanismos por los cuales promueve la curación de las úlceras gástricas es mediante el aumento en la producción de moco.

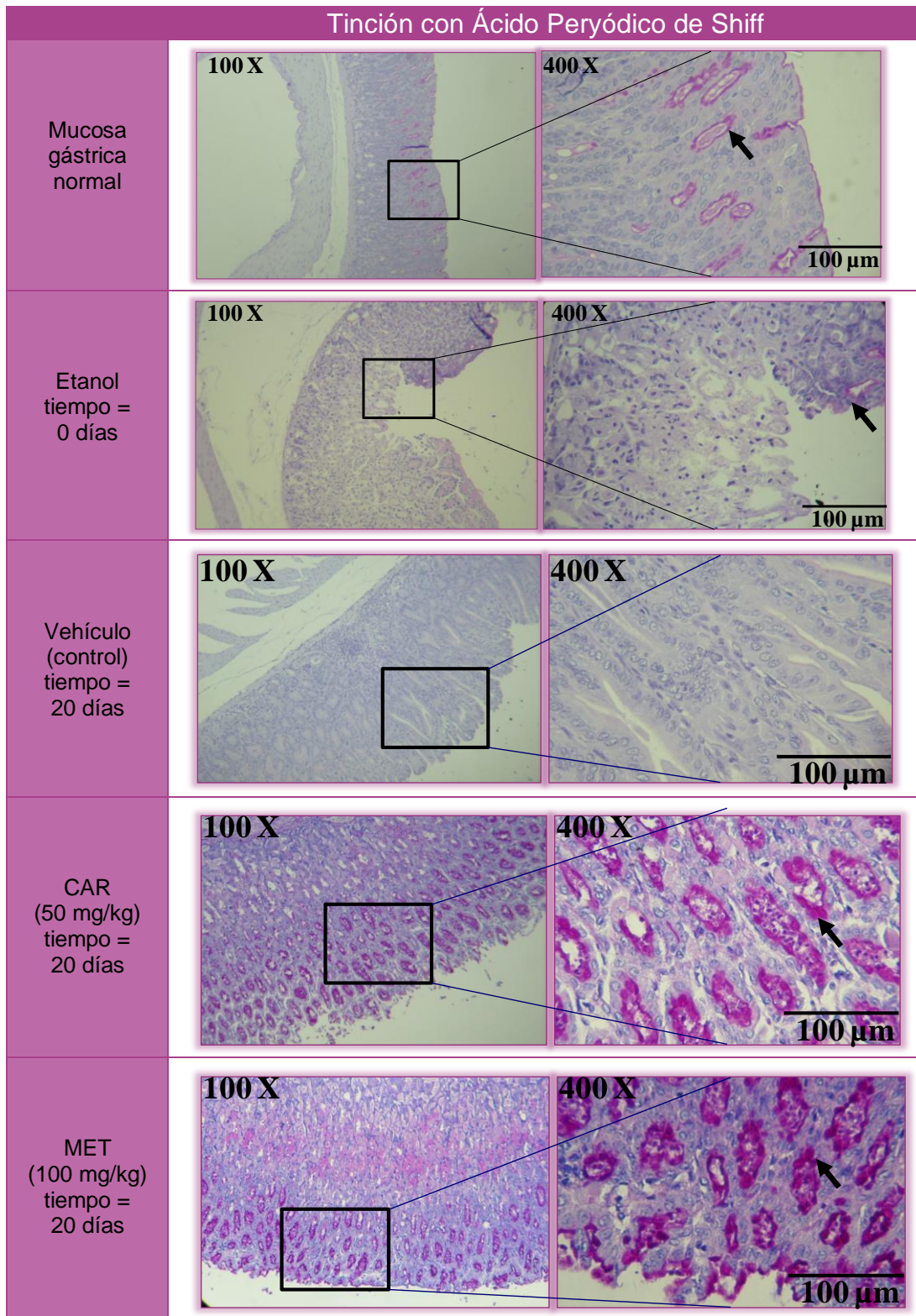
Por otro lado, tomando en cuenta que el óxido nítrico es un agente que tiene la capacidad de acelerar el proceso de curación de úlceras gástricas al aumentar el flujo sanguíneo y probablemente promoviendo angiogénesis en el tejido de granulación (Konturek, *et al.*, 1993), y que en este trabajo se demostró que el extracto metanólico actúa aumentando la concentración de óxido nítrico, se puede pensar que este mecanismo esté involucrado en la resolución de la úlcera gástrica por el extracto.

En este trabajo también se demostró que el extracto metanólico aumenta la concentración de prostaglandinas endógenas en la mucosa gástrica (Figura 11). Considerando que se ha reportado que las prostaglandinas, especialmente PGE<sub>2</sub> no solo previenen la formación de las úlceras gástricas, sino que también actúa mejorando el proceso de resolución de las úlceras ya que se ve favorecida la producción de moco (Konturek, *et al.*, 2005), se sugiere que este mecanismo también está relacionado con el mecanismo del efecto de resolución de úlceras inducido por el extracto metanólico.

A pesar de que se tienen varios indicios de cómo es que el extracto metanólico actúa sobre la mucosa gástrica para acelerar el proceso de curación de úlceras gástricas, se deben realizar ensayos más específicos para realmente poder elucidar su mecanismo de acción.



**Figura 26.** Análisis histológico de la mucosa gástrica de un ratón normal, del daño causado por la administración de etanol absoluto y de ratones tratados con carbenoxolona y el extracto metanólico durante 20 días después de la inducción de úlceras gástricas con etanol absoluto. Tinción de las preparaciones con hematoxilina-eosina ↑ Indica infiltrado inflamatorio, \* perdida de la integridad de la mucosa gástrica.



**Figura 27.** Análisis histoquímico de la mucosa gástrica de un ratón normal, del daño causado por la administración de etanol absoluto y de ratones tratados con carbenoxolona y el extracto metanólico durante 20 días después de la inducción de úlceras con etanol absoluto. Tinción de las preparaciones con ácido periódico de shiff. ↑ Indica presencia de moco neutro.



### **5.5. Fraccionamiento del extracto metanólico de *C. procera***

Al observar que el extracto metanólico tenía un gran potencial para ser considerado como parte de un tratamiento de la úlcera gástrica, ya que, además de poseer una muy buena actividad gastrorpotectora, también actuaba acelerando el proceso de resolución de las úlceras, se decidió tratar de simplificar su composición y se realizó un fraccionamiento primario del extracto teniendo como objetivo la identificación de las fracciones activas, de las cuales en un futuro, podría aislarse algún compuesto puro responsable de la actividad.

El fraccionamiento se realizó por medio de una columna abierta de sílica gel, a partir de 28 g del extracto metanólico. Se comenzó a eluir con un disolvente de baja polaridad y se fue aumentando la polaridad del sistema de elución.

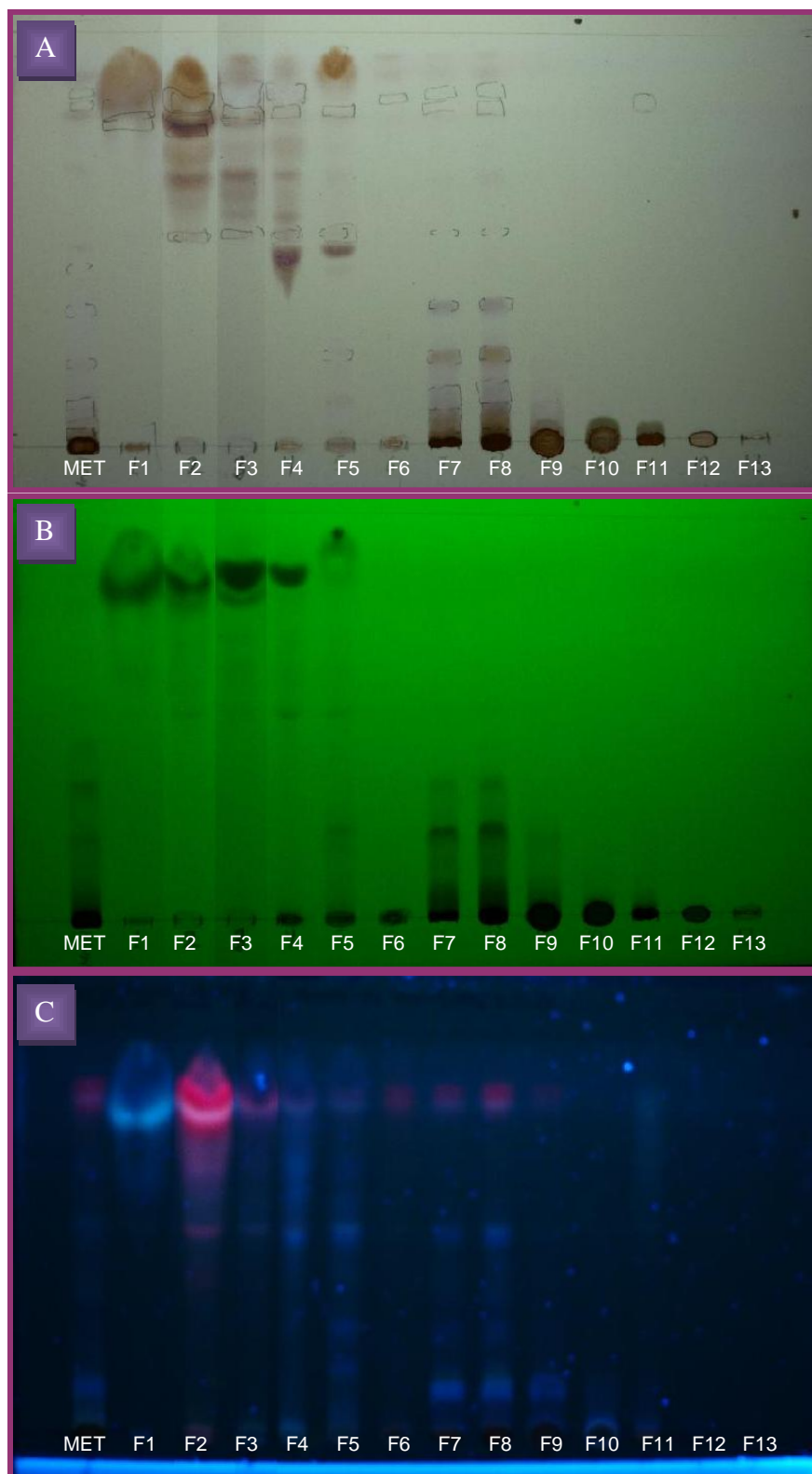
Al finalizar este procedimiento se obtuvieron 12 fracciones (F1 a F12) y quedó un residuo sólido en el punto de aplicación, sobre la sílica, que no eluyó con ninguno de los sistemas de elución utilizados, por lo que ese sólido se recuperó y se consideró como la última fracción (F13). Se redujo el volumen de las fracciones con un rotaevaporador y posteriormente se secaron a temperatura ambiente para obtener el peso de cada fracción y su correspondiente rendimiento con respecto al extracto metanólico (Tabla 7).

Para monitorear el fraccionamiento se realizó un análisis por cromatografía en capa fina, en la Figura 28 se puede apreciar el perfil cromatográfico del extracto metanólico íntegro junto con las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento primario.

**Tabla 7.** Peso y rendimiento de las fracciones obtenidas en el Fraccionamiento del extracto metanólico de *C. procera*

Fracción	Sistema de elución	Peso (mg)	Rendimiento (%)
F1	Hexano	22.7	0.08
F2	Acetato de etilo	504.3	1.80
F3	Acetato de etilo	166.6	0.56
F4	Acetato de etilo	204.8	0.73
F5	Acetato de etilo	102.5	0.37
F6	Acetato de etilo-Metanol (1:1)	10.7	0.04
F7	Acetato de etilo-Metanol (1:1)	2749.9	9.82
F8	Acetato de etilo-Metanol (1:1)	1858.3	6.64
F9	Acetato de etilo-Metanol (1:1)	16274.5	58.12
F10	Acetato de etilo-Metanol (1:1)	1253.7	4.48
F11	Etanol	955.5	3.41
F12	Etanol 70%	1846.8	6.56
F13	---	266.3	0.95

Por medio del análisis por cromatografía en capa fina se determinó que la composición de cada una de las fracciones primarias del extracto metanólico es diferente entre si y que efectivamente poseen una complejidad metabólica mucho menor comparada con el extracto íntegro. Sin embargo, aún presentan muchos compuestos y se requerirá de más fraccionamientos para lograr la obtención de productos puros.



**Figura 28.** Análisis por cromatografía en capa fina del fraccionamiento primario del extracto metanólico de *C. procera*. Sistema de elución: Hexano-Acetato de etilo-Metanol (5:3:2). (A) Revelada con sulfato sérico. (B) Luz UV 254 nm. (C) Luz UV 365 nm.

De las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento primario del extracto metanólico de *C. procera* se determinó la actividad gastroprotectora en búsqueda de una fracción con una menor complejidad metabólica comparada con el extracto íntegro, pero que conservara o mejorara la actividad antiulcerogénica observada. Además, se determinó la actividad anti *H. pylori* de estas fracciones, ya que Escobedo-Hinojosa y colaboradores en 2012 reportaron que el extracto metanólico de *C. procera* posee una actividad considerable contra esta bacteria.

### 5.5.1. Actividad gastroprotectora de las fracciones del extracto metanólico

Se evaluó la actividad antiulcerogénica de las fracciones a una concentración de 100 mg/kg en un modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto en ratón. No fue posible evaluar la actividad de las fracciones F1 y F6, debido a que el rendimiento en ambos casos resultó ser muy bajo. Los resultados mostraron que la fracción F7 presentó la mejor actividad gastroprotectora, con un porcentaje de gastroprotección de  $65.78 \pm 6.49\%$ , que es una actividad muy similar a la del extracto íntegro. Además, las fracciones F3, F4, F5, F8 y F9 también presentaron una actividad antiulcerogénica considerable (Tabla 8 y Figura 29). En la Figura 30 se muestran imágenes representativas de los estómagos después de su tratamiento con las fracciones.

**Tabla 8.** Porcentaje de gastroprotección de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento primario del extracto metanólico de *C. procera*

Tratamiento	% Gastroprotección
MET	$64.71 \pm 3.69$
F1	ND
F2	$0.00 \pm 22.73$
F3	$43.31 \pm 11.93$
F4	$41.92 \pm 14.10$

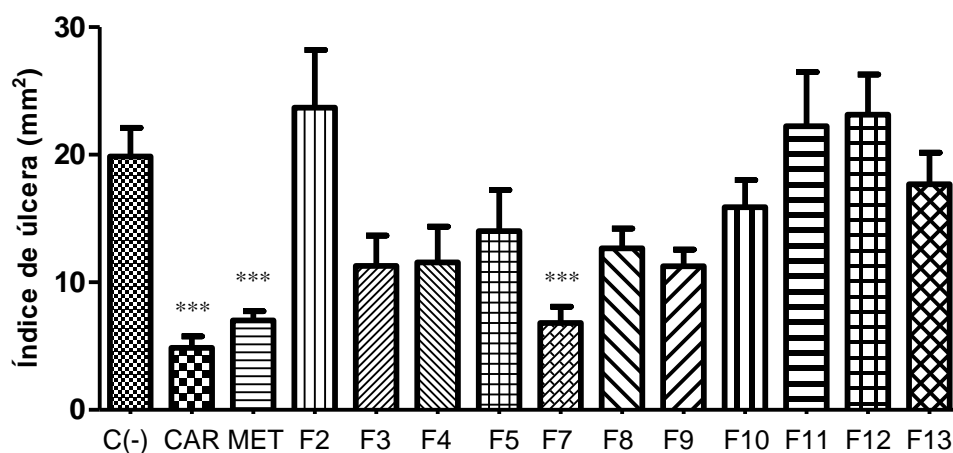


**Tabla 8.** Continuación. Porcentaje de gastroprotección de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento primario del extracto metanólico de *C. procera*

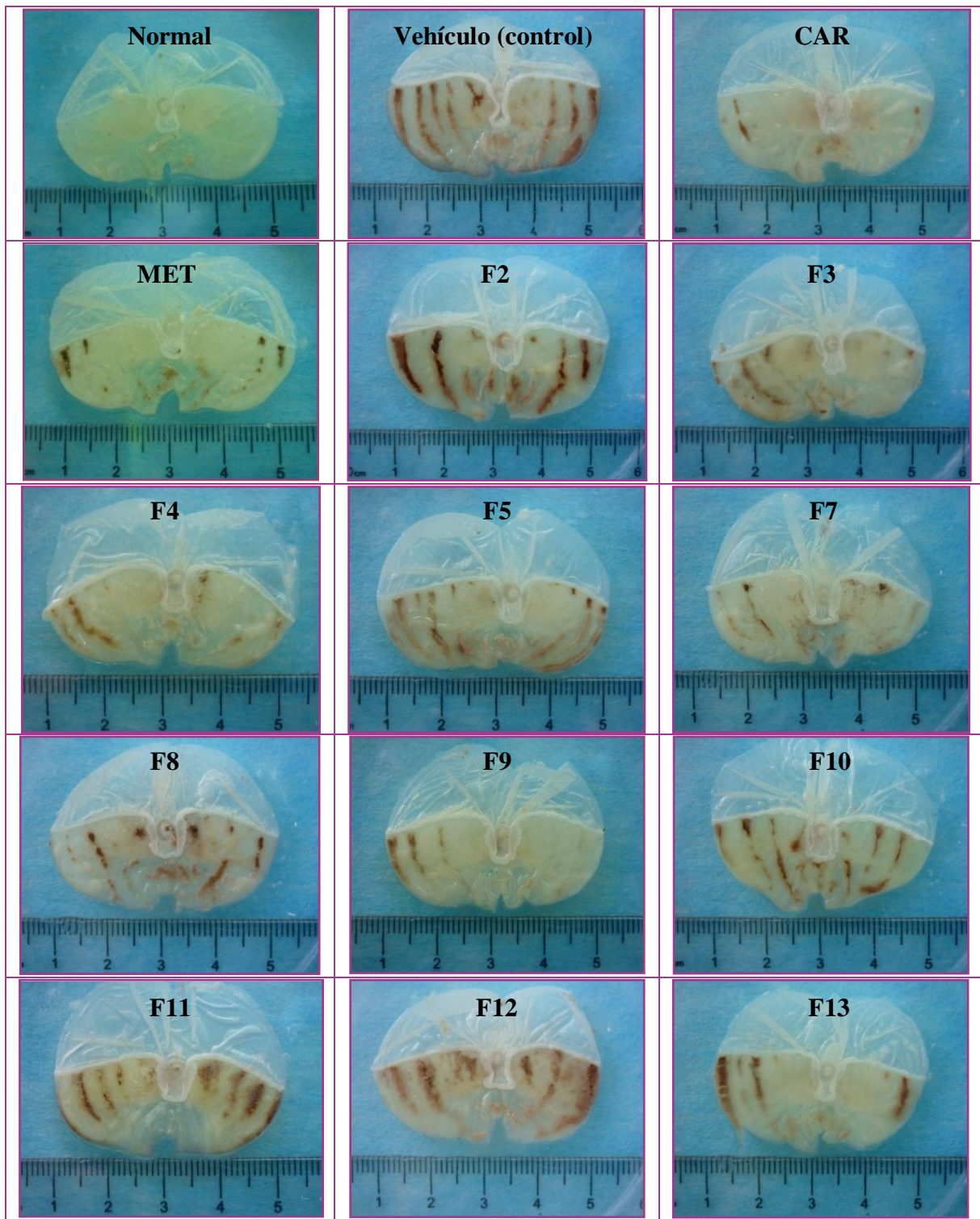
F5	29.64 ± 16.29
F6	ND
F7	65.78 ± 6.46
F8	36.34 ± 7.73
F9	43.38 ± 6.50
F10	20.13 ± 10.59
F11	0.00 ± 21.27
F12	0.00 ± 15.81
F13	11.06 ± 12.39

ND: No determinado

Los resultados se reportan como el promedio ± E.E.M., con n ≥ 8.



**Figura 29.** Efecto gastroprotector de algunas de las fracciones del extracto metanólico de *C. procera*. C(-): control negativo (solución salina), CAR: carbenoxolona, MET: extracto metanólico, F2 a F13: fracciones. Los resultados se reportan como el promedio ± E.E.M., con n ≥ 8. \* p ≤ 0.05; \*\* p ≤ 0.01; \*\*\* p ≤ 0.001; el análisis estadístico realizado consistió en un análisis de varianza seguido de una comparación múltiple de medias de Dunn.



**Figura 30.** Fotos representativas de la actividad gastroprotectora de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento primario del extracto metanólico de *C. procera*. CAR: carbenoxolona, MET: extracto metanólico, F2 a F13: fracciones.

Al realizar los ensayos de gastroprotección de las fracciones primarias se pudo detectar actividad antiulcerogénica, en varias de ellas, las cuales, de acuerdo con el análisis cromatográfico, tiene una composición diferente (por ejemplo F3 y F7), lo que sugiere que existe más de un compuesto que proporciona este efecto antiulcerogénico, resultado que concuerda con lo propuesto por Rosas-Acevedo en el 2010 quienes encontraron que el extracto metanólico íntegro pierde su actividad antiulcerogénica al realizar una partición en fracciones de acetato de etilo y metanol, con lo que sugieren que más de un compuesto debe estar presente para mantener la actividad que se reportó para su extracto metanólico.

Por otra parte, se han aislado e identificado algunos compuestos de esta especie. Uno de ellos es  $\beta$ -sitosterol, compuesto que ha sido identificado y aislado a partir de extractos de baja polaridad de la corteza de *C. procera* (Rosas-Acevedo, *et al.*, 2010, Rodríguez-López, *et al.*, 2006). A este compuesto se le atribuyen diferentes actividades, entre ellas se ha reportado que posee actividad antiulcerogénica en un modelo de úlcera inducida por ácido acético (Ling y Jones, 1995) y en un modelo de úlcera inducida por etanol en rata (Navarrete, *et al.*, 2002), en este último trabajo se reportó que  $\beta$ -sitosterol mostró una gastroprotección del  $85.7 \pm 6.3\%$  a una dosis de 100 mg/kg.

Tomando en cuenta estos antecedentes y considerando que, de acuerdo con el análisis cromatográfico, el extracto metanólico tiene la capacidad de arrastrar compuestos poco polares, se decidió buscar el  $\beta$ -sitosterol dentro de alguna de las fracciones primarias del extracto metanólico, ya que se trata de un compuesto de mediana polaridad y, de esta manera, poder identificar al  $\beta$ -sitosterol como uno de los agentes responsables de la actividad antiulcerogénica de este extracto.

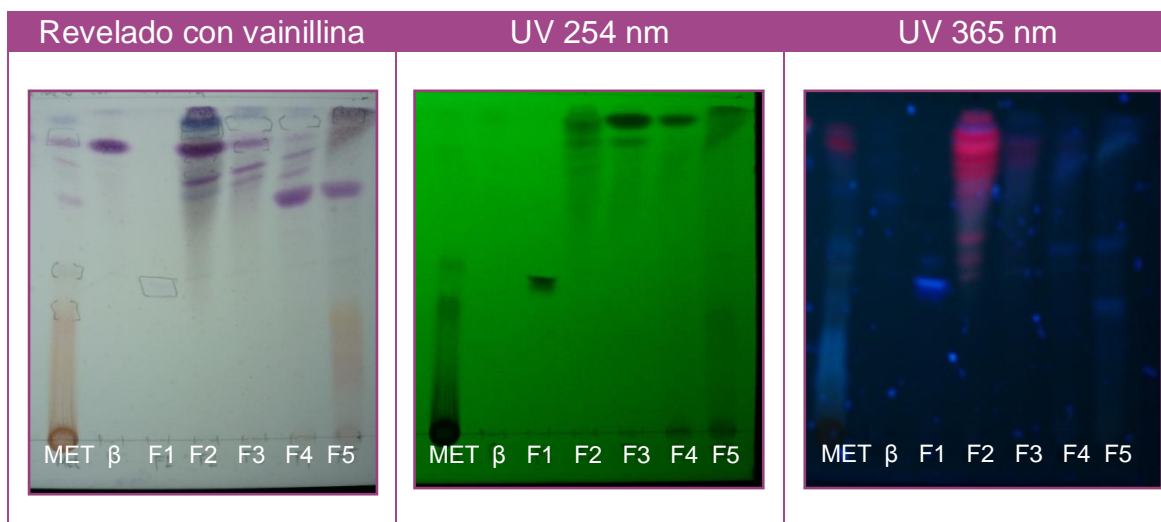
Se utilizó una referencia de  $\beta$ -sitosterol para realizar otro análisis por cromatografía en capa fina y determinar la presencia de este compuesto dentro del el extracto metanólico o alguna de sus fracciones. De acuerdo a este análisis,

$\beta$ -sitosterol solo se encuentra presente en las F2, F3, F4 y F5 siendo la F2 la fracción en donde aparentemente se encuentra en mayor proporción, en comparación con F3, F4 y F5 (Figura 31).

Dos de las fracciones en donde se encontró la presencia de  $\beta$ -sitosterol, es decir las fracciones F3 y F4, presentaron actividad antiulcerogénica con un porcentaje de gastroprotección de alrededor del 40%. Debido a que se sabe que  $\beta$ -sitosterol posee actividad gastroprotectora, puede pensarse que este compuesto sea, al menos en parte, responsable de la actividad a estas dos fracciones, ya que, hasta el momento, no se sabe si existan otros compuestos que les confieran esa actividad y en qué proporción se encuentren.

A pesar de que el  $\beta$ -sitosterol se encuentra presente en la F2 y aparentemente en mayor proporción que en F3 y F4, ésta no muestra actividad gastroprotectora. Esto puede deberse a que exista algún compuesto dentro de esta fracción que de alguna manera esté enmascarando la actividad del  $\beta$ -sitosterol o que la concentración a la que se encuentra no sea suficiente para poder detectar su efecto gastroprotector previamente reportado (Navarrete, *et al.*, 2002)

El  $\beta$ -sitosterol, al tratarse de un compuesto con actividad gastroprotectora, podría, en parte, estar contribuyendo en el efecto antiulcerogénico del extracto metanólico íntegro, sin embargo, el  $\beta$ -sitosterol se encuentra en concentraciones muy bajas dentro del extracto metanólico (como componente de F2, F3, F4 y F5, que juntas representan solo el 3.5 % del extracto íntegro de acuerdo al rendimiento del fraccionamiento). Por otra parte, debe tomarse en cuenta que existen otras fracciones, como la F7 (libre de  $\beta$ -sitosterol), que poseen un mayor rendimiento y una mejor actividad gastroprotectora, por lo que, en términos de rendimiento-actividad son más representativas que el  $\beta$ -sitosterol, en esta especie.



**Figura 31.** Análisis por cromatografía en capa fina del extracto metanólico y las fracciones F1 a F5 comparados con una referencia de  $\beta$ -sitosterol. Sistema de elución: Hexano-Acetato de etilo-Metanol (5:3:2). Revelada con vainillina y luz UV 254 y 365 nm. MET: extracto metanólico;  $\beta$ :  $\beta$ -sitosterol; F1-F5: fracciones.

### 5.5.2. Determinación de la actividad anti-*H. pylori* de las fracciones primarias del extracto metanólico de *C. procera*

Considerando que la infección por *H. pylori* es el principal agente causal de las úlceras pépticas (Atherton, 2006) y que se ha reportado que el extracto metanólico de *C. procera* posee actividad contra esta bacteria (Escobedo-Hinojosa, *et al.*, 2012), se decidió determinar la actividad anti-*H. pylori* de las fracciones primarias del extracto metanólico, en búsqueda de fracciones, que posean una menor complejidad metabólica que el extracto íntegro, en las que se mejore la actividad contra esta bacteria y que podrían ser una fuente para el aislamiento de compuestos con actividad anti-*H. pylori*.

Se determinó la actividad que tiene el extracto metanólico íntegro y las fracciones obtenidas del fraccionamiento primario de este extracto contra el crecimiento de la bacteria *H. pylori*. Para darle validez a este ensayo, se usaron 3 antibióticos de referencia, metronidazol, claritromicina y amoxicilina.

Primero se determinó la actividad del extracto metanólico íntegro para compararla con la actividad reportada en la literatura. Se obtuvo una CMI = 125 µg/mL, esta actividad es mayor a la determinada por Castillo-Juárez y colaboradores en el 2009 (CMI > 500 µg/mL), pero menor a la reportada por Escobedo-Hinojosa y colaboradores en 2012 (CMI = 62.5 µg/mL), a pesar de que se utilizó el mismo método de estudio que en estos dos trabajos. Estas diferencias en la actividad pueden deberse a la preparación misma del extracto metanólico, ya que la cantidad o proporción de los metabolitos activos extraídos en cada muestra puede variar en función del tiempo y la calidad de la extracción, así como de la época del año en la que se recolectó la corteza.

En cuanto al efecto anti-*H. pylori* del fraccionamiento primario, se encontró que las fracciones de menor polaridad poseen una buena actividad. El efecto que tienen estas fracciones (CMI = 62.5 µg/mL para F1 y CMI = 31.25 µg/mL para F2 a F6) frente a la bacteria puede considerarse como bueno, si lo comparamos con la actividad de uno de los fármacos de referencia utilizados, el metronidazol, el cual es uno de los antibióticos más utilizados para la erradicación de *H. pylori* y que tiene una CMI de 300 µg/mL (Tabla 9).

No fue posible determinar la CMI de las fracciones más polares (F7, F8, F9, F10, F11, F12 y F13) ya que la concentración más alta probada fue 125 µg/mL (Tabla 9). A esta concentración se logra apreciar cierto efecto inhibitorio, sin embargo no se llega a evitar por completo el crecimiento de esta bacteria. Otro problema que surgió al trabajar con algunas de las fracciones (F12 y F13) fue su baja solubilidad. No se evaluaron concentraciones por encima de 125 µg/mL debido a que ésta es la CMI del extracto íntegro por lo que un valor arriba de éste no resulta de interés.

**Tabla 9.** Actividad anti-*H. pylori* del extracto metanólico íntegro y sus fracciones primarias

Tratamiento	MIC (µg/mL)
Extracto metanólico	125
F1	62.5
F2	31.25
F3	31.25
F4	31.25
F5	31.25
F6	31.25
F7	>125
F8	>125
F9	>125
F10	>125
F11	>125
F12	>125
F13	>125
Metronidazol	300
Claritromicina	0.5
Amoxicilina	0.05

El fraccionamiento primario del extracto metanólico, permitió obtener fracciones que poseen una mejor actividad anti-*H. pylori*, en comparación con el extracto íntegro. Esto se debe a que, al tener una menor complejidad metabólica, la proporción de él o los compuestos activos dentro de cada fracción es mayor que en el extracto íntegro.

Por otro lado, el rendimiento de estas fracciones activas es muy bajo. Si todas las fracciones con actividad anti-*H. pylori* se juntaran (F1 a F6) solamente representarían el 3.6% del extracto íntegro, por lo que el extracto metanólico no

puede considerarse como una fuente potencial para aislar compuestos anti-*H. pylori*, debido a que el rendimiento sería demasiado bajo. Sin embargo, no puede descartarse que al utilizar el extracto íntegro, aunque los compuestos activos se encuentren en muy baja concentración, puedan llegar a ejercer su efecto *in vivo*, tal y como sucedió en los ensayos *in vitro*.

De esta manera, el extracto mentanólico no solo podría ser considerado como parte de un tratamiento de úlceras de etiología no bacteriana, sino también como parte de un tratamiento integral en úlceras de etiología bacteriana generadas por la presencia de *H. pylori*.



## 6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al conocimiento acerca de los mecanismos farmacológicos involucrados en la actividad antiulcerogénica de *C. procera*, específicamente del extracto metanólico.

El efecto gastroprotector del extracto metanólico está relacionado con los cuatro mecanismos estudiados, teniendo mayor impacto la participación de las prostaglandinas endógenas y el óxido nítrico.

La administración del extracto metanólico a las dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg por 20 días no produjo la muerte a los individuos de experimentación, ni produjo signos de toxicidad.

La administración por 20 días consecutivos del extracto metanólico favoreció el proceso de resolución de úlcera gástrica, en términos de disminución del número y longitud de las mismas.

Las fracciones F7 a F9 mostraron tener una buena actividad gastroprotectora y con un buen rendimiento. Las fracciones F2 a F6 mostraron una muy buena actividad anti-*H. pylori* pero con un rendimiento muy bajo. Por lo que es muy probable que las actividades correspondientes sean debidas a compuestos diferentes.

Los resultados obtenidos aportan datos importantes en la validación del uso etnomédico que se le da a *C. procera* dentro de la medicina tradicional mexicana como tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

El efecto gastroprotector, de resolución de úlceras gástricas y la actividad anti-*H. pylori* del extracto metanólico, así como su falta de toxicidad bajo el modelo estudiado, sugiere la posibilidad de considerarlo como una fuente potencial para el

desarrollo de nuevos agentes antiulcerogénicos e integrante de las terapias para el tratamiento de la úlcera gástrica de etiología no bacteriana y muy posiblemente de etiología bacteriana.

## 7. Perspectivas

- Estudiar el efecto resolutorio de úlcera gástrica del extracto metanólico en un modelo de infección por *H. pylori*.
- Evaluar el efecto de este extracto en la resolución en un modelo de úlcera gástrica crónica.
- Continuar con el fraccionamiento del extracto metanólico para aislar e identificar él o los compuestos responsables de la actividad gastroprotectora

## 8. Referencias

Akar, F., Uydeş-Doğan, B. S., Buharalıoğlu, C. K., Abban, G., Heinemann, A., Holzer, P. y Van de Voorde, L., 1999. Protective effect of cromakalim and diazoxide, and proulcerogenic effect of glibenclamide on indometacin-induced gastritis injury. *European Journal of Pharmacology*, 374: 461-470.

Andrade S.F., Lemos, M., Comunello, E., Noldin, V. F., Filho, V. C. y Niero, R., 2007. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. *Journal of Ethnopharmacology*, 113: 252–257.

Argueta, V., Cano, J. y Rodarte, M., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, I. Instituto Nacional Indigenista, México.

Arrieta, J., Benitez, J., flores, E., Castillo, C. y Navarrete, A., 2003. Purification of gastroprotective triterpenoid from the stem bark of *Amphypterygium adstringens*: role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Medica*, 69: 439-444.

Atherton, J. C., 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1: 63–96.

Blanckaert, I., Swennen, R. L., Paredes Flores, M., Rosas López, R. y Lira Saade, R., 2004. Floristic composition, plant uses and management practices in home gardens of San Rafael Coxcatlán, Valley of Tehuacán-Cuicatlán, Mexico. *Journal of Arid Environments*, 57: 39–62.

Baron, J. H., 1977. Effect of carbenoxolone sodium on human gastric acid secretion. *Gut*, 18: 721-722.

Barrett, K. E., Barman, S. B., Boitano, S. y Brooks, H. L., 2010. Ganong's Review of Medical Physiology. 23rd Edition. McGraw-Hill, pp. 429-450.

Brown, J. F., Hanson, P. J. y Whittle, B. J. R., 1992. Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach. *European Journal of Pharmacology*, 223: 103-104.

Brown, L. M., 2000. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic Reviews*, 22: 283-297.

Bucciarelli A. y Skliar M.I., 2007. Medicinal plants from Argentina with gastro protective activity. *Ars Pharmaceutica*, 48: 361–369.

Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar. A., Avila, G., Duran, A. y Lira, R., 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 429–439.

Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R. y Romero I., 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 402-405.

Demir S., Yilmaz, M., Köseoğlu, M., Akalin, N. y Aslan, D., 2003. Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 14: 39-43.

Doll, R., Hill, I. D. y Hutton, C. F., 1965. Treatment of gastric ulcer with carbenoxolone sodium and oestrogens. *Gut*, 6: 19-24.

Feldman, M., Friedman, L. S. y Brandt, L. J., 2002. Sleisenger & Fordtran. Enfermedades gastrointestinales y Hepáticas. Fisiología, diagnóstico y tratamiento. Séptima edición, tomo 1. Editorial Médica Panamericana, pp. 733-827.

Fox, S. I., 2011. Fisiología humana. 12ª Edición. Mc Graw Hill Interamericana editores.

Escobedo-Hinojosa, W. I., Días del Carpio, J., Palacios-Espinosa, J. F. y Romero, I., 2012. Contribution to the ethnopharmacological and anti-*Helicobacter pylori* knowledge of *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae). Journal of Ethnopharmacology, 143:1; 363-371.

García, S. X., Gijón, E. y Prieto, B., 2010. Fisiología médica. Guía calidad en educación médica. Intersistemas, pp. 389-406.

Gisbert, J. P., 2011. Enfermedades relacionadas con *Helicobacter pylori*: dispepsia, úlcera y cáncer gástrico. Gastroenterology and Hepatology, 34:16-27.

Goodier, T. E. W., Horwich, L. y Galloway, R. W., 1967. Morphological observations on gastric ulcers treated with carbenoxolone sodium. Gut, 8: 544-547.

Guslandi, M., 1994. Antiulcer drugs and gastric mucosal blood flow. Pharmacological Research, 30: 93-98.

Guth, P. H., 1992. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. The yale journal of biology and medicine, 65: 677-688.

Ham, M. y Kauntz, J. D., 2007. Gastroduodenal defense. Current Opinion in Gastroenterology, 23: 607-616.

Hatazawa, R., Tanaka, A., Tanigami, M., Amagase, K., Kato, S., Ashida, Y. y Takeuchi, K., 2007. Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP4 receptors. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293: G788–G797.

Hayllar, J. y Bjarnason, I., 1995. NSAIDs, Cox-2 inhibitors, and the gut. *The Lancet*, 346: 521-522.

Henman, F. D., 1970. Inhibition of peptic activity by carbenoxolone and glycyrrhetic acid. *Gut*, 11: 344-351.

Ishihara, T., Suemasu, S., Asano, T., Tanaka, K. y Mizushima, T., 2011. Stimulation of gastric ulcer healing by heat shock protein 70. *Biochemical Pharmacology*, 82: 728–736.

Iwata, F., Koo, A., Itoh, M., Lam, K., Leung, J. W. C. y Leung, F. W., 1997. Functional evidence linking potassium channels and afferent nerve-mediated mucosal protection in rat stomach. *Life Sciences*, 61: 1713-1720.

Kitamura, M., Sugamoto, S., Kawauchi, S, Kato, S. y Takeuchi, K., 1999. Modulation by endogenous nitric oxide of acid secretion induced by gastric distention in rats: enhancement by nitric oxide synthase inhibitor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 291: 181-187.

Konturek, S. J., Brzozowski, T., Majka, J., Pytko-Polonczyk, J. y Stachura, J., 1993. Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers. *European Journal of Pharmacology*, 239: 215-217.

Konturek, S. J., Konturek, P. C. y Brzozowski, T., 2005. Prostaglandins and ulcer healing. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56: 5–31.

Kumar, V., Abbas, A. K. y Fausto, N., 2005. Robbins and Contran Pathologic basis of disease. Seventh Edition. Elsevier Saunders, pp. 810-827.

Lipkin, M., 1971. Progress report. In 'defense' of the gastric mucosa. Gut, 12: 599-603.

Ling, W. H. y Jones, P. J. H., 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. Life Sciences, 57: 195-206.

Loguercio, C., Taranto, D., Beneduce, F., del Vecchio Blanco, C., de Vincentiis, A., Nardi, G. y Romano, M., 1993. Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. Gut, 34: 161-165.

Marieb, E. N. y Hoehn, K., 2010. Human anatomy & physiology. Eighth edition. Benjamin Cummings, pp. 866-877.

Masuda, E., Kawano, S., Nagano, K., Tsuji, S., Takei, Y., Tsujii, M., Oshita, M., Michida, T., Kobayashi, I., Nakama, A., Fusamoto, H. y Kamada, T., 1995. Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. Gastroenterology, 108: 58-64.

Matsuda H., Li, Y. y Yoshikawa, M., 1999. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. Life Sciences, 65: 27-32.

Miller, T. A., 1983. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. The American Physiological Society, 245: G601–G623.



Moore, K. L., Dalley, A. F. y Agur, A. M. R., 2010. Anatomía con orientación clínica. 6ª Edición. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 230-239.

Mutoh H., Hirashi, H., Ota, S., Ivey, K. J., Terano, A. y Sugimoto, T., 1990. Role of oxygen radicals in ethanol-induced damage to cultured gastric mucosal cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 258: G603-G609.

Navarrete, A., Reyes, B., Silva, A., Sixtos, C., Islas, V. y Estrada, E., 1990. Evaluación farmacológica de la actividad antiulcerosa de *Amphypterygium adstringens* (Cuachalalate). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 21: 28-32.

Navarrete, A., Martínez-Urbe, L. S. y Reyes, B., 1998. Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphypterygium adstringens* in rats. *Phytotherapy Research*, 12: 1-4.

Navarrete, A., Trejo-Miranda, J. L. y Reyes-Trejo, L., 2002. Principles of root bark of *Hippocratea excels* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 383–388

Okabe, S. y Amagase, K., 2005. An overview of acetic acid ulcer models. The history and state of the art of peptic ulcer research. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28: 1321-1341.

Pallara, J. W. y Velikkakathu, V. A., 2012. Acute and subacute toxicity studies of *Lygodium flexuosum* extracts in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S200-S202.

Pérez-Negrón E. y Casas A., 2007. Use, extraction rates and spatial availability of plant resources in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico: The case of Santiago Quiotepec, Oaxaca. *Journal of Arid Environments*, 70: 356–379.

Perkins, W. E. y Vars, L., 1973. Effects of carbenoxolone sodium on stress-induced gastric damage in rats. *British Journal of Pharmacology*, 47: 847–849.

Peskar, B. M., Lange, K., Hoppe, U. y Peskar, B. A., 1986. Ethanol stimulates formation of leukotriene C<sub>4</sub> in rat gastric mucosa. *Prostaglandins*, 31: 283-93.

Peskar, B. M., Ehrlich, K. y Peskar, B. A., 2002. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301: 969–974.

Pohle, T., Brzozowski, T., Becker, J. C., Van Der Voort, I. R., Markmann, A., Konturek, S. J., Moniczewski, A., Domschke, W. y Konturek, J. W., 2001. Role of reactive oxygen metabolites in aspirin-induced gastric damage in humans: gastroprotection by vitamin C. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 15: 677-687.

Robert, A., Nezamis, J. E., Lancaster, C. y Hanchar, A. J., 1979. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertronic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology*, 77: 433-43.

Rodríguez-López, V., Salazar, L. y Estrada, S., 2003. Spasmolytic activity of several extracts obtained from some Mexican medicinal plants. *Fitoterapia*, 74: 725–728.

Rodríguez-López, V., Aguirre-Crespo, F., Salazar, L. y Estrada-Soto, S., 2006. Identification of fatty acid esters and hydrocarbon derivatives from *Cyrtocarpa procera* Kunth by GC-MS. *Natural Product Research*, 20: 1-7.

Rosas-Acevedo, H., Terrazas, T., González-Trujano, M. E., Guzmán, Y. y Soto-Hernández, M., 2011. Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 134: 67–73.

Salim, A. S., 1994. Role of free radical scavengers in the management of refractory duodenal ulceration. A new approach. *Journal of Surgical Research*, 56: 45-52.

Schmassmann, A., Tarnawski, A., Peskar, B. M., Varga, L., Flogerzi, B. y Halter, F., 1995. Influence of acid and angiogenesis on kinetics of gastric ulcer healing in rats: interaction with indomethacin. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 268: G276-G285.

Seino, S., 1999. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annual Review Physiology*, 61: 337-362.

Sensakovic, J. W. y Smith, L. G., 2001. Oral antibiotic treatment of infectious diseases. *Medical Clinics of North America*, 85: 115-123.

Szabo, S., Nagy, L. y Plebani, M., 1992. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. *Clinica Chimica Acta*, 206: 95-105.

Takeuchi, K., Yagi, K., Kitamura, M. y Kubomi, M., 1998. Stimulation of duodenal bicarbonate secretion by carbenoxolone in rats: a comparative study with prostaglandin E<sub>2</sub>. *General Pharmacology*, 30: 739–744.

Tarnawski, A. S., 2005. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Digestive Diseases and Sciences*, 50: S24–S33

Torres, J., Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G., Gomez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Conyer, R, y Onofre, M., 1998. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *The Journal of Infectious Diseases*, 178: 1089–1094.

Villalobos, J. J., Olivera, M. A. y Valdovinos, M. A., 2006. *Gastroenterología*. Quinta edición. Méndez Editores, pp. 231-247.

Waldman, S. A. y Terzic, A., 2010. *Farmacología y terapéutica*. Principios para la práctica. Primera edición. Manual moderno, pp. 457-472.

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

Wang, H., Ma, L., Li, Y. y Cho, C., 2000. Exposure to cigarette smoke increases apoptosis in the rat gastric mucosa through a reactive oxygen species mediated and P53-independent pathway. *Free Radical Biology & Medicine*, 28: 1125-1131.

Whittle, B. J. R., Lopez-Belmonte, J. y Moncada, S., 1990. Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 99: 607-611.