



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACION DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DEL
EXTRACTO ACUOSO DE LA HOJA DE ZARZAMORA (*Rubus
fruticosus*) EN RATA CEPA WISTAR Y DETERMINACIÓN DE LA
CL50 MEDIANTE EL BIOENSAYO CON *Artemia salina***

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

SILVIA VERENICE MUÑOZ LOPEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO

PRESIDENTE: Prof. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez

VOCAL: Prof. Enrique Moreno Sáenz

SECRETARIO: Prof. Ruth Bustamante García

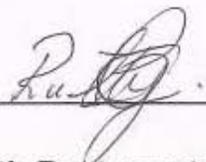
1er. SUPLENTE Prof. Alejandro Ortiz Osornio

2° SUPLENTE: Prof. Guillermo Celestino Cardoso Saldaña

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

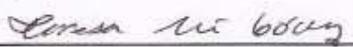
Bioterio 5° Piso, Edificio A, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR



Dra. Ruth Bustamante García

SUPERVISOR TÉCNICO



M. en C. Teresa Neri Gómez

SUSTENTANTE



Silvia Verenice Muñoz López

ÍNDICE

ABREVIATURAS _____	¡Error! Marcador no definido.
ÍNDICE DE FIGURAS _____	9
ÍNDICE DE TABLAS _____	11
1. INTRODUCCIÓN. _____	12
2. ANTECEDENTES _____	13
2.1 Estómago de rata _____	13
2.1.1 Anatomía _____	13
2.1.1.2 Pared gástrica _____	14
2.1.2 Fisiología _____	18
2.1.2.2. Secreción ácido-gástrica debida a alimentos y bebidas alcohólicas _____	18
2.1.2.3. Mecanismos de protección de la mucosa gástrica _____	19
2.1.3 Fases y regulación de la secreción de ácido _____	19
2.2 Enfermedades gastrointestinales _____	22
2.2.1 Gastritis _____	23
2.2.1.1 Clasificación de la gastritis _____	23
2.2.1.1.1 Gastritis aguda _____	23
2.2.1.1.2. Gastritis crónica _____	24
2.2.1.1.3. Gastritis específicas _____	24
2.2.2 Úlcera _____	25
2.2.2.1 Clasificación de úlcera gástrica _____	25
2.2.2.1.1 Úlceras primarias _____	25
2.2.2.1.2 Úlceras secundarias _____	25
2.2.2.3 Evolución de la úlcera _____	27



2.2.2.4 Etiologías que provocan las lesiones	29
2.2.2.4.1 <i>Helicobacter pylori</i>	29
2.2.2.4.2 Tabaco	30
2.2.2.4.3 Papel del estrés	31
2.2.2.4.4 AINES	31
2.2.2.5 Complicaciones	33
2.2.2.6 Síntomas	34
2.2.2.7 Diagnóstico	34
2.2.2.8 Tratamiento	35
2.2.2.8.1 Fármacos utilizados para el control de la acidez gástrica y el tratamiento de úlceras pépticas.	35
2.3 Modelo biológico utilizado para la inducción de úlceras gástricas.	40
2.3.1 Métodos de cuantificación de las úlceras	42
2.3.1.1 Medición macroscópica	42
2.3.1.2. Medición microscópica	42
2.4 Producto natural utilizado	44
2.4.1 Zarzamora o Zarza (<i>Rubus fruticosus</i> L.)	44
2.4.1.1 Taxonomía	44
2.4.1.2 Descripción	45
2.4.1.3 Origen y distribución geográfica	45
2.4.1.4 Valor nutricional	46
2.4.1.4.1 Flavonoides	46
2.4.1.4.1.1 Antocianinas	47
2.4.1.4.3 Taninos	48
2.4.1.4.4 Capacidad antioxidante y vitamina "C".	49



2.4.1.4.5 Radicales libres	50
2.4.1.5 Propiedades farmacológicas	51
2.5 Modelo para la evaluación CL50	51
2.5.1 Fundamento del uso de <i>Artemia salina</i>	51
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	53
4. OBJETIVOS	54
5. HIPÓTESIS	54
6. MATERIAL Y MÉTODOS	54
6.1 Material, reactivos y equipo	54
6.2 Metodología	55
6.2.1 Obtención del extracto	56
6.2.2 Determinación de la CL50	57
6.2.3. Efecto gastroprotector	60
6.2.4. Evaluación del extracto para el tratamiento de gastritis aguda	61
6.2.4.1 Evaluación de las lesiones de los estómagos	63
6.2.5 Análisis estadístico	63
7. RESULTADOS	64
7.1 Resultados de la determinación de la CL50	64
7.2 Resultados del estudio agudo (gastroprotector)	64
7.2.1 Resultados macroscópicos.	64
7.2.2 Resultados microscópicos	66
7.3 Resultados del estudio crónico.	68
7.3.1 Resultados macroscópicos	68
7.3.2 Resultados microscópicos estudio crónico	69
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	72



9. CONCLUSIÓN	75
10. BIBLIOGRAFIA	76
<i>ANEXO I</i>	84



ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
Ca ²⁺	Ion calcio
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado
CIT	Ácido cítrico
Cl	Cloro
Cl ⁻	Ion cloruro
CL50	Concentración letal cincuenta
Cm	Centímetro
Cox 1	Ciclooxigenasa 1
ETOH	Etanol
Fe ³⁺	Ion fierro 3+
G	Gramos
HyE	hematoxilina-eosina
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H ⁺	Ion hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HCO ₃ ⁻	Ion bicarbonato
HPO ₄ ²⁻	Ion fosfato ácido
I%	Porcentaje de inhibición
IBP	Inhibidores de la bomba de protones
K ⁺	Ion potasio
KCl	Cloruro de potasio
L	Litro
Log	Logaritmo base diez
mEq/h	Mili equivalentes por hora
Mg.6H ₂ O	Magnesio hexahidratado
Mg ²⁺	Ion magnesio



min.	Minuto
ml/Kg	Mililitro por kilogramo
Mm	Milímetro
Na ⁺	Ion sodio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
PEPTO	Pepto bismol™
Ppm	Partes por millón
SO ₄ ²⁻	Ion sulfato
SS	Solución salina
UI	Índice de úlcera
W	Watts
ZARZA	Extracto de las hojas de zarzamora



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Configuración del estómago (Atlas digital de anatomía para el bioterio) (Ver texto).....	14
Figura 2. Capas de la pared gástrica (Facultad de Biología, 2013) (Ver texto).....	15
Figura 3. Glándulas o células principales del estómago (Corpus, 2013) (Ver texto).	17
Figura 4. Anatomía general del estómago (Casco, 2011) (Ver texto).	18
Figura 5. Fase de regulación nerviosa de la secreción gástrica (Guyton & Hall, 2012) (Ver texto).....	20
Figura 6. Secreción del HCl en el estómago (Lopez, 2013) (Ver texto).	21
Figura 7. Casos e incidencias de las enfermedades gastrointestinales en México (Sánchez Garay, 2010) (Ver texto).	22
Figura 8. Gastritis aguda erosiva hemorrágica (Casco, 2011).	24
Figura 9. Clasificación de úlceras gastroduodenales de Johnson (Ancheta y Guzmán, 2011) (ver texto).....	27
Figura 10. Ciclo evolutivo de la úlcera gástrica (bvs, 2013) (ver texto).	29
Figura 11. Esquema de infección por <i>H. pylori</i> (González, 2013) (Ver texto).....	30
Figura 12. Componentes del tabaco. (RELIEF, 2013).....	31
Figura 13 Mecanismos de acción de los fármaco antiulcerosos (Méndez, 2005) (Ver texto).....	35
Figura 14. Estructura química de la ranitidina, citrato de bismuto (Velázquez y Fernández, 2008).	36
Figura 15. Estructura química de los inhibidores de la bomba de protones (IBP), modificaciones estructurales de estos fármacos en un medio ácido (Lars, 2003) (Ver texto).....	37
Figura 16. Estructura química del sSucralfato (Velázquez y Fernández, 2008)....	38
Figura 17. Estructura química del misoprostol (Delgado, Minguillon, y Joglar , 2004).	39
Figura 18. Hojas de <i>Rubus fruticosus</i> (EducaMadrid, 2013)	45
Figura 19. Estructura química base de los flavonoides (Ancheta y Guzmán, 2011).	46



Figura 20. Estructura general de las antiocianinas(Delgado, 2004).....	48
Figura 21. Taninos y su clasificación (AQM, 2010).	49
Figura 22. Estructura química de la vitamina C.....	50
Figura 23. Imagen de <i>Artemia salina</i>	53
Figura 24. Diagrama de flujo 1. Método de obtención del extracto acuoso de <i>Rubus fruticosus</i>	57
Figura 25. Equipo para la eclosión de los huevos de <i>A. salina</i> (Bustamante, 2012).	58
Figura 26. Esquema para determinar la CL50.....	60
Figura 27 Diagrama de flujo 2. Determinación del efecto gastroprotector.....	61
Figura 28. Diagrama de flujo 3. Evaluación del extracto de hojas de zarzamora para el tratamiento de la gastritis aguda.....	63
Figura 29. Gráfico para determinar la CL50 del extracto de las hojas de zarzamora	64
Figura 30. Evaluación del efecto gastroprotector, estudio agudo.....	65
Figura 31.Evaluación del efecto gastroprotector, estudio crónico	Error! Marcador no definido.
Figura 32. Fijación de muestra (Vigo, 2009).....	85
Figura 33. Inclusión en parafina	86
Figura 34. Micrótopo para parafina.	86
Figura 35. Tinción.....	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos celulares de mucosa gástrica: productos de secreción y ubicación. (Navarro, 2009).....	16
Tabla 2. Clasificación de Johnson de las úlceras gastroduodenales (Ancheta y Guzmán, 2011).....	26
Tabla 3 Ciclo evolutivo de Sakita-Miwa (Medicalcriteria, 2011).....	27
Tabla 4. Eficacia de la terapia farmacológica en la patología ulcerosa, (Ancheta y Guzmán, 2011).....	40
Tabla 5. Porcentaje de Inhibición (I%).....	66
Tabla 6. Evaluación microscópica del efecto gastroprotector del extracto acuoso de las hojas zarzamora, estudio agudo.	67
Tabla 7. Evaluación microscópica del efecto gastroprotector del extracto acuoso de las hojas de zarzamora, estudio crónico.....	70

1. INTRODUCCIÓN.

Desde hace más de un siglo las enfermedades del tracto gastrointestinal como úlceras, gastritis, síndrome de colon irritable, etc. constituyen una causa muy importante de morbilidad y mortalidad en México. Uno de los mecanismos que se creían hasta 1982 era que este tipo de afecciones eran provocadas por el estilo de vida del paciente (estrés, consumo de tabaco, uso de AINES y tipo de alimentación) en donde la estimulación del sistema nervioso generaba la producción masiva de jugos gástricos y en particular del ácido clorhídrico, lo que provocaba un daño en el tejido celular (Sánchez Garay 2010). Los fármacos utilizados para estas afecciones, presentaban compuestos cuyo pH era de tipo alcalino como las sales de aluminio y magnesio, disminuyendo la sensación de malestar pero provocando efectos de rebote. En la actualidad, la fitofarmacología nos permite realizar estudios para evaluar componentes naturales (ya sean frutos o plantas) que puedan tener efectos terapéuticos. Es por esta razón que el presente proyecto se enfocó a evaluar el efecto gastroprotector de la infusión de las hojas de zarzamora (*Rubus fruticosus*), en ratas, mediante un modelo de inducción químico de úlceras gástricas, así como determinar la concentración letal 50 (CL50) mediante un bioensayo con *Artemia salina*; ya que a esta planta se le han adjudicado efectos como: antihemorrágica ya que detiene cantidades pequeñas de sangre en heridas menores, ulceraciones cutáneas, estomatitis, glositis, y úlceras bucales, además debido a sus componentes como el ácido cítrico isocítrico, terpenoides ácidos, taninos flavonoides, y agentes antioxidantes, además de tener la capacidad de regeneración de la mucosa intestinal y la cicatrización como también un agente gastroprotector. Los resultados obtenidos mediante cortes histológicos así como la medición de las áreas de las lesiones en los estómagos demostraron que la decocción de las hojas de zarzamora disminuye el grado y el número de lesiones, lo cual sugiere un posible efecto gastroprotector además de ser una alternativa para el tratamiento de la gastritis.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estómago de rata

2.1.1 Anatomía

El estómago es una dilatación característica del tubo digestivo en forma de J, interpuesto entre el esófago y el duodeno, donde se acumulan los alimentos y cuya mucosa segrega un jugo digestivo potente (Garnica 2009). Ocupa casi todo el hipocondrio izquierdo y una gran parte del epigastrio. Está situado parcialmente, en el receso su frénico izquierdo, arriba del meso colon transverso, debajo del hígado y del diafragma (Navarro 2009).

El tamaño y la posición del estómago son objetos de variación considerable, dependiendo no solo del peso del animal, sino de su estado fisiológico. El estómago tiene dos partes, una porción granular y otra no granular con una pared muy delgada siendo esta parte recubierta, al igual que el esófago, por epitelio escamoso estratificado (Quezada, 1997; Garnica, 2009).

2.1.1.1. Descripción y configuración externa

La configuración externa del estómago se puede clasificar en (Figura 1):

- a) Porción vertical, la cual consta del
 - fundus gástrico
 - cuerpo gástrico.
 - extremidad inferior.

- b) Porción pilórica (Latarjet y Ruiz 2008)

- c) Curvatura mayor (Álvarez y Díaz 2007)

- d) Curvatura menor (Álvarez y Díaz 2007)

- e) Cardias. (Álvarez y Díaz 2007)

f) Píloro (Latarjet y Ruiz 2008).

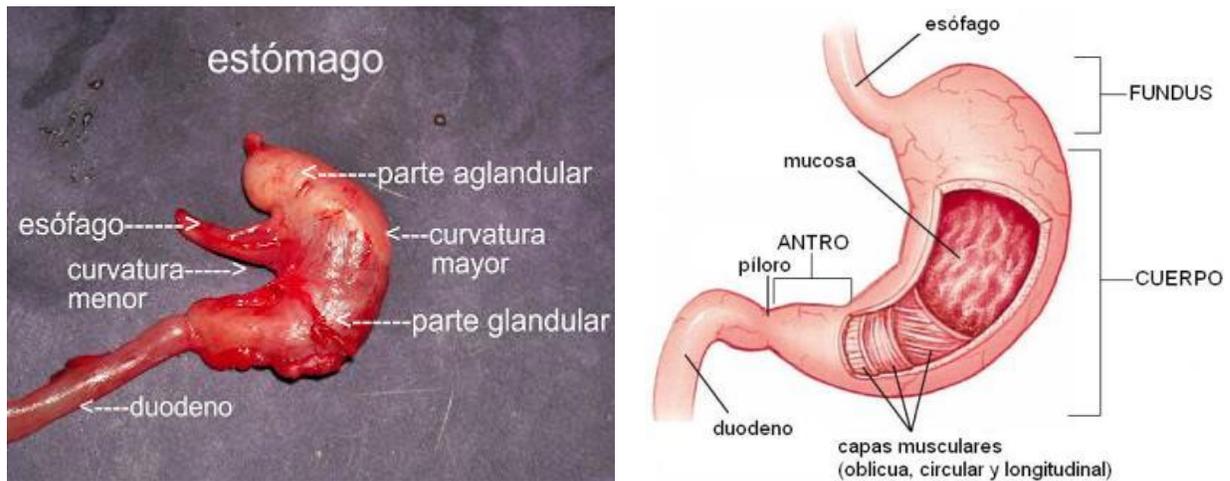


Figura 1. Configuración del estómago (Sistemas de nutrición, 2013) (Universidad de Ciencias Veterinarias, FCV UBA 2009) (Ver texto).

Además de la configuración externa, el estómago consta de una parte muy esencial para su motilidad y secreción del ácido clorhídrico (HCl) que es la pared gástrica.

2.1.1.2 Pared gástrica

La pared gástrica comprende cuatro capas (Figura 2) que, de la más superficial a la más profunda, son (Latarjet y Ruiz 2008):

a) Capa serosa.

Superficial, formada por el peritoneo.

b) Capa muscular.

Es gruesa, con tres planos de fibras musculares lisas:

- Superficial o longitudinal (Navarro, 2009; Latarjet y Ruiz 2008)
- Circular o media (Navarro, 2009; Latarjet y Ruiz 2008)
- Oblicua o profunda (Navarro, 2009; Latarjet y Ruiz 2008)

c) Capa submucosa.

Está formada por conectivo laxo con numerosos linfocitos y células plasmáticas. Contiene numerosos vasos sanguíneos y linfáticos (Universidad de Ciencias Veterinarias, FCV UBA 2009).

d) Capa mucosa.

La mucosa gástrica es una capa gruesa, blanda y aterciopelada, de color rojizo en la región corpofúndica y rosada en la antral (Navarro, 2009). La mucosa gástrica se divide en regiones secretoras y no secretoras de ácido (Soybel, 2005). Está formada por un epitelio simple de células cilíndricas altas que forma pliegues muy compactados. En las zonas más profundas de esos pliegues se forman las fositas gástricas o foveolas, cavidades en las que desembocan las glándulas gástricas. Éstas son tubulares simples o ramificadas. El epitelio de las foveolas está formado por células de revestimiento secretoras de moco que lubrican la superficie de la mucosa, y la protegen de posibles lesiones (Universidad de Ciencias Veterinarias, FCV UBA 2009).

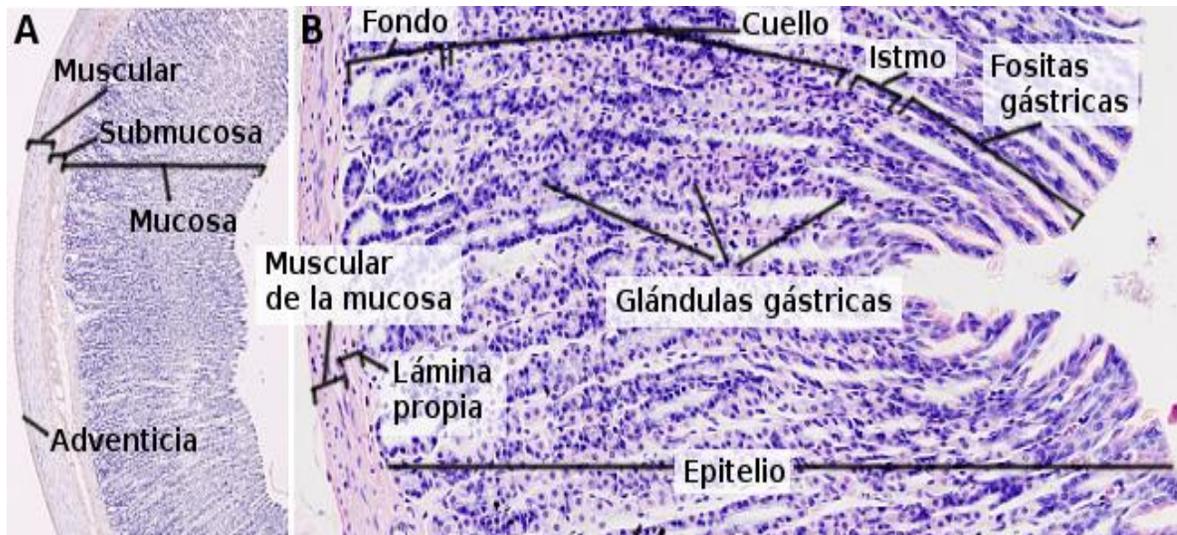


Figura 2. Capas de la pared gástrica (Facultad de Biología, Universidad de Vigo 2009)(Ver texto).

Microscópicamente, la mucosa gástrica está compuesta por 3 capas (Navarro, 2009):

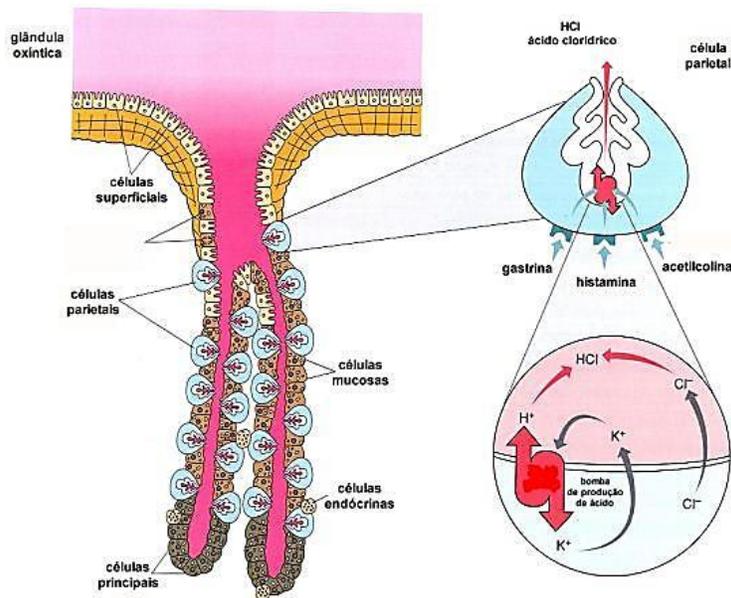
a) Epitelio, dispuesto en:

- Una capa de revestimiento superficial con células secretoras de moco (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos celulares de mucosa gástrica: productos de secreción y ubicación.
(Navarro, 2009).

Célula	Secreción	Localización predominante
Principales	Pepsina Renina	Cuerpo y fundus
Parietales u oxínticas	Ácido clorhídrico Factor intrínseco	Cuerpo y fundus
Mucosas	Moco	Cardias
Enteroendocrinas	Gastrina	Antro-píloro
G y D	Somatostatina	Cuerpo y fundus

- Glándulas que contienen los diferentes tipos celulares, y si bien se hallan presentes en toda la mucosa gástrica, existen áreas de claro predominio (Figura 3) (Navarro, 2009).



**Figura 3. Glándulas o células principales del estómago (Corpus Center s.f., 2013)
(Ver texto).**

En toda la longitud del aparato gastrointestinal, las glándulas secretoras favorecen dos funciones fundamentales. La primera es la secreción de enzimas digestivas. Y la segunda es la secreción del moco para la lubricación y protección de todas las regiones del aparato digestivo. La mayor parte de las secreciones gástricas se forma solo como respuesta a la presencia de alimentos en el aparato digestivo. El estómago secreta jugo gástrico el cual contiene una variedad de sustancias, como: cationes: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , H^+ , (pH aproximado, 1.0), aniones: Cl^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , pepsina, lipasa, moco y factor intrínseco (Navarro 2009).

- b) Lámina propia: Tejido conectivo laxo que actúa como soporte del epitelio, contiene tejido linfóide, y pequeños vasos y nervios (Navarro, 2009).
- c) Muscular de la mucosa: Estrato delgado de músculo liso, que rodea la base glandular (Figura 4) (Navarro, 2009).

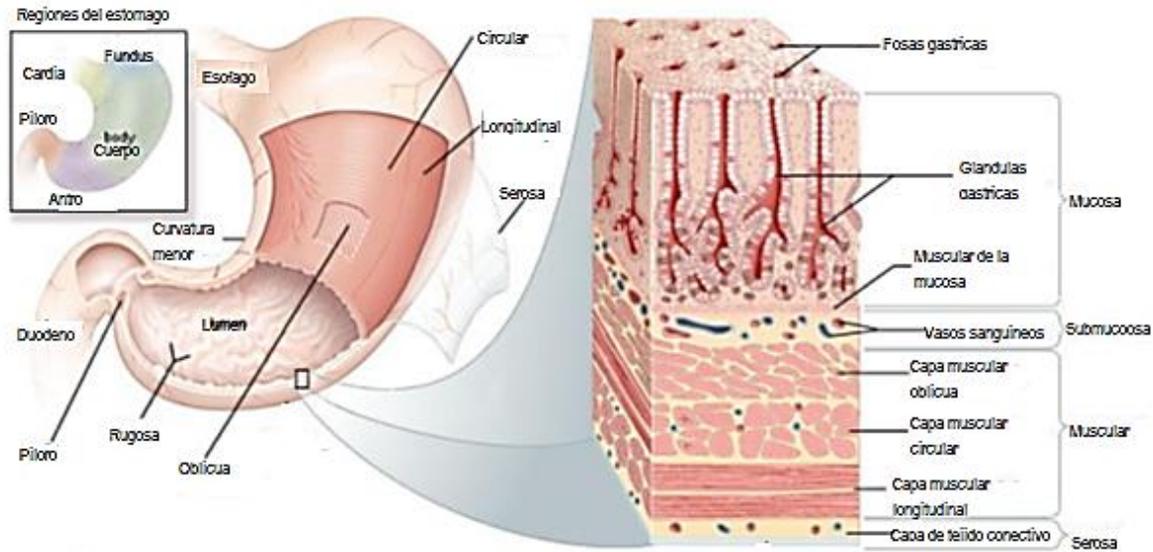


Figura 4. Anatomía general del estómago (Casco, 2011) (Ver texto).

Lo anterior corresponde a la anatomía general del estómago pero a continuación se dirá la parte fisiológica, como la regulación de la secreción del HCl desde los secretogogos entre otras funciones.

2.1.2 Fisiología

El estómago presenta varias funciones entre las cuales están: actuar como depósito de las grandes cantidades de alimentos ingeridas en cada comida, fragmentar el alimento en partículas pequeñas y mezclarla con las secreciones gástricas, vaciar el contenido gástrico al duodeno a una velocidad controlada además de proveer una barrera que prevenga el paso de microorganismos al intestino y mantener una mucosa protectora contra agresiones endógenas y exógenas (Rodríguez, 2010).

2.1.2.2. Secreción ácido-gástrica debida a alimentos y bebidas alcohólicas

Además de los alimentos, las bebidas alcohólicas, como la cerveza y el vino tinto, tienen una gran potencia como secretogogos tanto en humanos como animales. Tras la administración de estos secretogogos, entre 30 y 45 min, después se estimula de manera importante la secreción ácida gástrica en modelos animales.

Durante la secreción activa se observan concentraciones elevadas de gastrina sérica, lo que indica el efecto estimulador de la bebida alcohólica en la secreción ácida debido no solo al alcohol sino a otras sustancias como son las xantinas, principalmente la cafeína (Marín 2008; Méndez y Uribe 2005).

2.1.2.3. Mecanismos de protección de la mucosa gástrica

Los factores protectores más importantes se alojan en las células de la mucosa gástrica que secretan moco, en sus dos fases tanto en solución como un gel. El moco constituye una barrera más eficaz de protección gástrica contra la acción del ácido. Igualmente importante es la producción del HCO_3^- en la célula de la mucosa y su paso a la luz gástrica, donde entra en contacto con los hidrogeniones producidos por la célula parietal, formando agua e hidróxido de carbono impidiendo que éstos (el H^+), al unirse con el cloro (Cl^-), formen mayor cantidad de HCl. El flujo sanguíneo constituye un importante mecanismo protector del estímulo ácido, ya que transporta la sangre rica en oxígeno y las sustancias, como las prostaglandinas, que impiden la perpetuación de la secreción ácida. Igualmente, impiden la hipoxia local que podría favorecer el mal funcionamiento de mecanismos defensores locales como, por ejemplo, la renovación celular (Ancheta y Guzmán, 2011). La secreción de HCl se realiza en tres fases, las cuales se describen a continuación.

2.1.3 Fases y regulación de la secreción de ácido

La secreción de ácido, ha sido dividido en tres fases interrelacionadas, una cefálica, otra gástrica y la intestinal (Figura 5) (Rodríguez, 2010).

- a) En la fase cefálica, la simple imaginación o percepción visual de la comida es capaz de aumentar el estímulo vagal e iniciar la actividad gastrointestinal, así como el oler, probar o tragar (Rodríguez, 2010).

- b) La fase gástrica es producto del efecto químico de los alimentos y la distensión gástrica, donde la gastrina parece ser su principal mediador (Rodríguez, 2010).

c) La fase intestinal, es responsable sólo de una pequeña proporción de la secreción de ácido en respuesta a la comida, y sus mediadores aún están en controversia (Rodríguez, 2010).

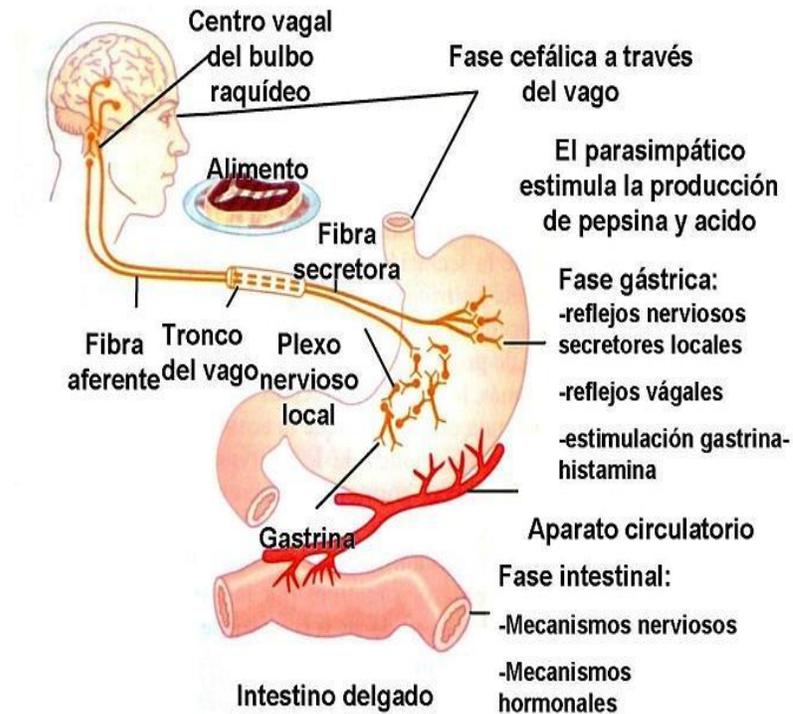


Figura 5. Fase de regulación nerviosa de la secreción gástrica (Guyton y Hall 2012) (Ver texto).

Por otro lado, la formación de ácido incluye los siguientes pasos:

a) La entrada al canalículo principalmente de cloruro de potasio (KCl) y cloruro de sodio (NaCl).

b) El agua se disocia en iones hidróxido e hidrógeno, los cuales son secretados hacia el canalículo en intercambio por iones potasio mediante la H-K-ATPasa. El HCl es entonces secretado por el extremo abierto del canalículo hacia el lumen glandular.

c) El agua pasa hacia el canalículo mediante ósmosis debido a los iones ya secretados hacia el canalículo. Así la secreción final contiene agua, HCl (150-160mEq/L), KCl (15mEq/L) y una pequeña concentración de NaCl.

d) Por último, el dióxido de carbono (CO_2), se combina bajo la influencia de la anhidrasa carbónica con los iones hidroxil para formar HCO_3^- , los cuales difundirán hacia el líquido extracelular en intercambio por iones Cl^- (Figura 6) (Rodríguez, 2010).

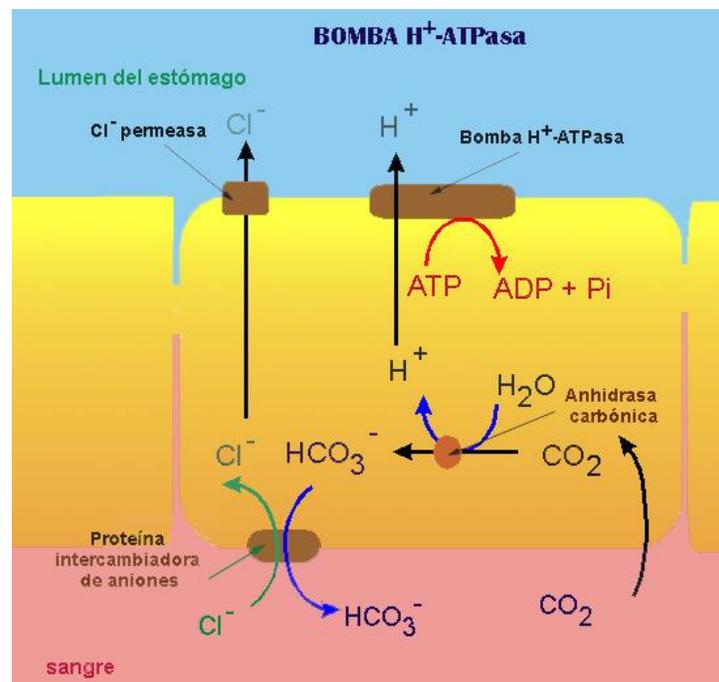


Figura 6. Secreción del HCl en el estómago (Lopez, 2013) (Ver texto).

Por lo que al alterar la regulación de la secreción del HCl en el estómago ya sea por consecuencia de una bacteria, del incremento de producción del HCl se tendrán varias consecuencias como son las enfermedades gastrointestinales principalmente gastritis y úlceras.

2.2 Enfermedades gastrointestinales

Las enfermedades gastrointestinales son enfermedades de origen multifactorial que se caracterizan desde el punto de vista anatomopatológico por la lesión localizada y en general solitaria de la mucosa del estómago o del duodeno y que se extiende, como mínimo, hasta la *muscularis mucosae* (Ancheta y Guzmán, 2011).

Las enfermedades gastrointestinales son un problema muy grave en México, al revisar la situación epidemiológica en el año 2003 de las úlceras, gastritis y duodenitis se reportaron 1, 335,714 casos y una incidencia de 128,171 casos. Para el 2008 se mantuvieron en el mismo lugar con 1, 523,116 casos y una incidencia de 1 767.07 por 100,000 habitantes. Durante este periodo el comportamiento epidemiológico fue ascendente (Figura 7) (Sánchez, 2010).

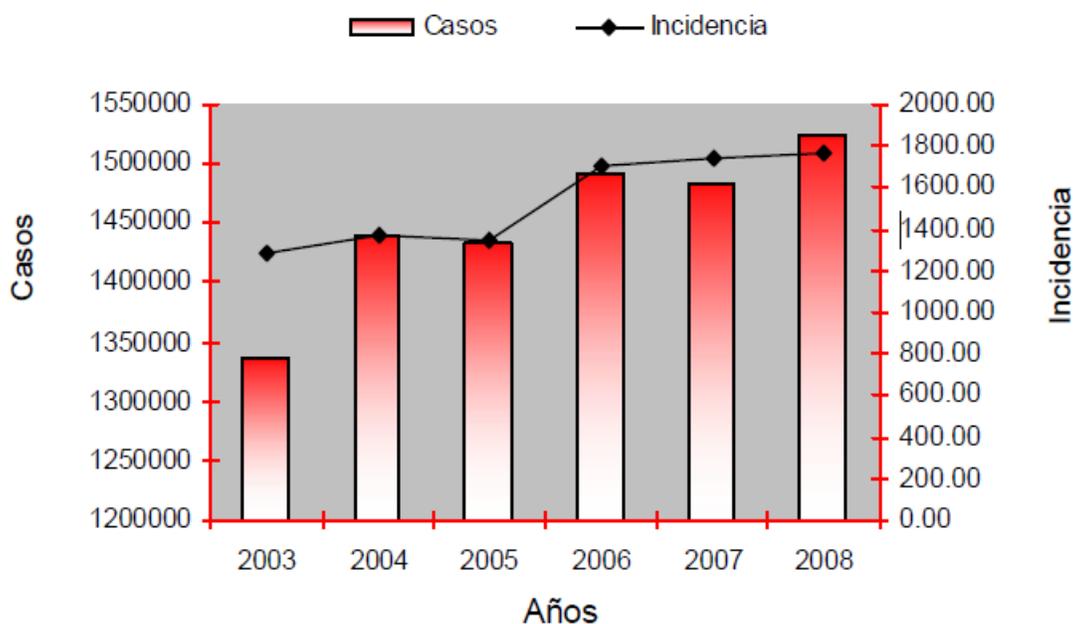


Figura 7. Casos e incidencias de las enfermedades gastrointestinales en México (Sánchez, 2010) (Ver texto).

Estas incidencias, de los trastornos ácido péptico influyen en la calidad de vida y la productividad de los afectados, son causas comunes e importantes de morbilidad y mortalidad (Martínez, y otros 2010). Uno de estos trastornos es la gastritis.

2.2.1 Gastritis

El término gastritis significa literalmente inflamación del estómago, dentro de esta denominación se incluyen todas aquellas enfermedades inflamatorias agudas o crónicas, focales o difusas que afectan al estómago. Por lo tanto, no se trata de un proceso patológico homogéneo, sino uno heterogéneo, como un grupo de enfermedades de etiología y mecanismos patogénicos multifactoriales, que puede tener alteraciones macroscópicas y/o microscópicas de la mucosa que recubre interiormente el estómago. Debido a la variedad de factores que provocan gastritis, está clasificada de acuerdo al sistema Sydney (Casco, 2011; Gutiérrez, 2011).

2.2.1.1 Clasificación de la gastritis

La clasificación de la gastritis fue descrita en Sydney, en 1990, y es denominada mundialmente como sistema Sydney; el cual establece una división histológica y endoscópica, ambas basadas en características topográficas, morfológicas, y etiológicas. Desde el punto de vista nosológico, la divide en gastritis aguda, crónica y específica o especiales (Cordova y De la Torre 2009; Gutiérrez, 2011).

2.2.1.1.1 Gastritis aguda

Es la forma más habitual de gastritis, se caracteriza por inflamación de la mucosa acompañada por el desarrollo de múltiples erosiones, las mismas que aparecen como lesiones hemorrágicas múltiples, bien definidas y de máximo 3 a 5 mm de diámetro, pueden también aparecer como auténticas úlceras lo cual da lugar a hemorragias de mayor o menor intensidad. Microscópicamente las erosiones pueden mostrar necrosis en la mucosa que no sobrepase la *muscularis mucosae*. Este tipo de afección presenta síntomas típicos como náuseas, vómitos, eructos ácidos, dolor en el epigastrio y pérdida de apetito (Cordova y De la Torre 2009). Y ésta se subdivide en:

- Gastritis erosiva hemorrágica (Figura 8)
- Gastritis aguda flemonosa supurativa



Figura 8. Gastritis aguda erosiva hemorrágica (Casco, 2011).

2.2.1.1.2. Gastritis crónica

Es una inflamación de la mucosa gástrica que se presenta gradualmente, y que persiste durante un tiempo prolongado provocando lesiones de carácter irreversible. En el origen del trastorno pueden involucrarse diversos factores, como el consumo reiterado de sustancias o fármacos irritantes de la mucosa gástrica (alcohol, nicotina, antiinflamatorios), bebidas muy frías o muy calientes, reflujo biliar desde el duodeno, trastornos autoinmunes o infecciones por bacterias como *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) que son las más frecuentes (Cordova y De la Torre 2009). Por lo tanto se subdivide en:

- Gastritis crónica por *H. pylori*
- Gastritis crónica autoinmune
- Gastritis hipertrófica

2.2.1.1.3. Gastritis específicas

Este grupo incluye patología de la mucosa gástrica cuya etiología es una causa específica, no comparte las mismas características de grupos anteriores, se clasifican en

- Gastritis linfocítica
- Gastritis eosinofílica
- Gastritis granulomatosa
- Gastritis colagenosa

2.2.2 Úlcera

La úlcera es una pérdida de sustancia en la mucosa, que se extiende por lo menos hasta la *muscularis mucosae* y que se localiza siempre en regiones del tracto digestivo expuesta a la acción del HCl y precisa como sustrato la existencia de mucosa gástrica o de áreas de metaplasia gástrica. Cuando la pérdida de sustancia no alcanza la submucosa, se habla de erosiones, en lugar de úlceras.

El desarrollo de la úlcera se produce como consecuencia de la pérdida de la situación de equilibrio, que en condiciones normales se logra a través de los mecanismos fisiológicos que gobiernan la función de la mucosa gástrica y su constante reparación ante los agentes agresivos (Luis 2008); Los mecanismos defensivos o protectores de la mucosa gástrica reflejan la capacidad del huésped para protegerse de los efectos nocivos de los factores agresivos. Las prostaglandinas defienden la mucosa inhibiendo directamente la secreción ácida a nivel de las células parietales, aumentando la producción del HCO_3^- y moco mejorando el flujo sanguíneo de la mucosa. Las principales localizaciones son el estómago y el duodeno; en este último caso, las lesiones suelen situarse en la primera porción duodenal (Cilleruelo y Fernández 2002)

2.2.2.1 Clasificación de úlcera gástrica

2.2.2.1.1 Úlceras primarias

La localización más frecuente de este tipo de úlceras es el duodeno. Entre ellas se incluyen las producidas por *H. pylori*.

Existen úlceras *H. pylori* negativas cuya causa es desconocida, por lo que también se denominan idiopáticas. El carácter diferencial respecto a las anteriores es que no presentan nodularidad, la gastritis está prácticamente ausente y con cierta frecuencia su forma de presentación clínica es una hemorragia digestiva (Cilleruelo y Fernández 2002).

2.2.2.1.2 Úlceras secundarias



Aparecen en presencia de factores ulcerogénicos identificables, diferentes a la existencia de *H. pylori*. Suelen ser de carácter agudo y su localización es más frecuente en estómago que en duodeno (Cilleruelo y Fernández 2002).

Ácido Acetil salicílico y los fármacos analgésicos AINES (analgésicos antiinflamatorios no esteroideos) causan lesión directa en la mucosa gástrica pero también, y lo que es clínicamente más relevante dado que por vía parenteral producen los mismos efectos que por vía no parenteral, van a alterar los mecanismos protectores a través de una disminución de la secreción del HCO_3^- . Ambos fármacos causan daño micro vascular y retrasan la cicatrización del epitelio. Otros fármacos capaces de producir lesiones gástricas son el ácido valproico, agentes quimioterapéuticos, el KCl y el alcohol. Los estudios sobre la acción de los corticoides son poco concluyentes y se piensa que pueden lesionar la mucosa gástrica muy ocasionalmente a dosis elevadas (Cilleruelo y Fernández 2002).

Las clasificaciones de la úlcera gástrica que se encuentran en la bibliografía son innumerables, sin embargo la clasificación de Johnson (Tabla 2) es la más utilizada (Ancheta y Guzmán, 2011).

Tabla 2. Clasificación de Johnson de las úlceras gastroduodenales (Ancheta y Guzmán, 2011).

Clasificación	Descripción
TIPO I	Úlceras únicas en la curvatura menor
TIPO II	Úlceras gástricas asociadas con úlceras duodenales
TIPO III	Úlceras pre-pilóricas
TIPO IV	Úlcera gástrica alta (cerca al fondo)
TIPO V	Estómago con úlceras múltiples

Esta clasificación describe y explica de forma fisiopatológica sus orígenes (Figura 9), y, recientemente fueron agregados los tipos IV y V (Ancheta y Guzmán, 2011).

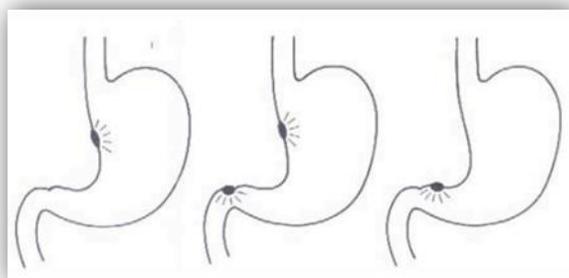


Figura 9. Clasificación de úlceras gastroduodenales de Johnson (Ancheta y Guzmán, 2011) (ver texto).

2.2.2.3 Evolución de la úlcera

La úlcera gástrica presenta un ciclo evolutivo descrito por Sakita-Miwa y por eso lleva su nombre de. Las fases de este ciclo evolutivo se describen en la Tabla 3.

Tabla 3 Ciclo evolutivo de Sakita-Miwa (Dr. Firman 2011).

Estadios	Manifestación
Activa	
A1	La mucosa que rodea está edematosamente hinchada y el epitelio de regeneración no es visto endoscópicamente
A2	El edema que la rodea se ha reducido, el margen de la úlcera es claro, y una ligera cantidad de epitelio de regeneración se ve en el margen de la úlcera. Un halo rojo en la zona marginal y una escara blanca circular en el margen de la úlcera son visualizados frecuentemente. Por lo general, la convergencia de los pliegues de la mucosa puede ser seguidas hasta el margen de la úlcera
Cicatrización	
H1	Una fina capa blanca de regeneración del epitelio se está extendiendo en la base de la úlcera. El gradiente entre el margen de la úlcera y la

	base de la úlcera se está convirtiendo en plano. El cráter de la úlcera es aún evidente y el margen de la úlcera es marcado. El diámetro del defecto mucoso es de aproximadamente la mitad a dos tercios de A1
H2	El defecto es más pequeño que en H1 y la regeneración del epitelio cubre la mayor parte del piso de la úlcera. El área de la capa blanca es de aproximadamente un cuarto a un tercio que el de A1
Curación	
S1	El epitelio de regeneración cubre completamente el fondo de la úlcera. La capa blanca ha desaparecido. Inicialmente, la región de regeneración es marcadamente roja. Tras una minuciosa observación, muchos capilares pueden ser vistos. Esto se llama "cicatriz roja"
S2	En varios meses a unos pocos años, el enrojecimiento se reduce al color de la mucosa circundante. Esto se llama "cicatriz blanca"

Dicho ciclo se realiza entre 30 y 60 días, cuando no se cumple y no llega la cicatrización se convierte en una úlcera péptica crónica (González y Herrera, 2006). Y como las úlceras son provocadas por múltiples factores es necesario cuidarse para que no se convierta en una úlcera crónica.

Este ciclo (Figura 10) debe ser conocido por todos los endoscopistas y consiste en (Hernández 2008)

- a) Período activo (A: *acute*): La característica principal es el depósito de fibrina.
- b) Período de curación (H: *healing*): La base de la úlcera es muy delgada, con una capa central también muy delgada con depósito central delgado.
- c) Período de cicatrización (S: *scar*): ya no se observa fibrina.

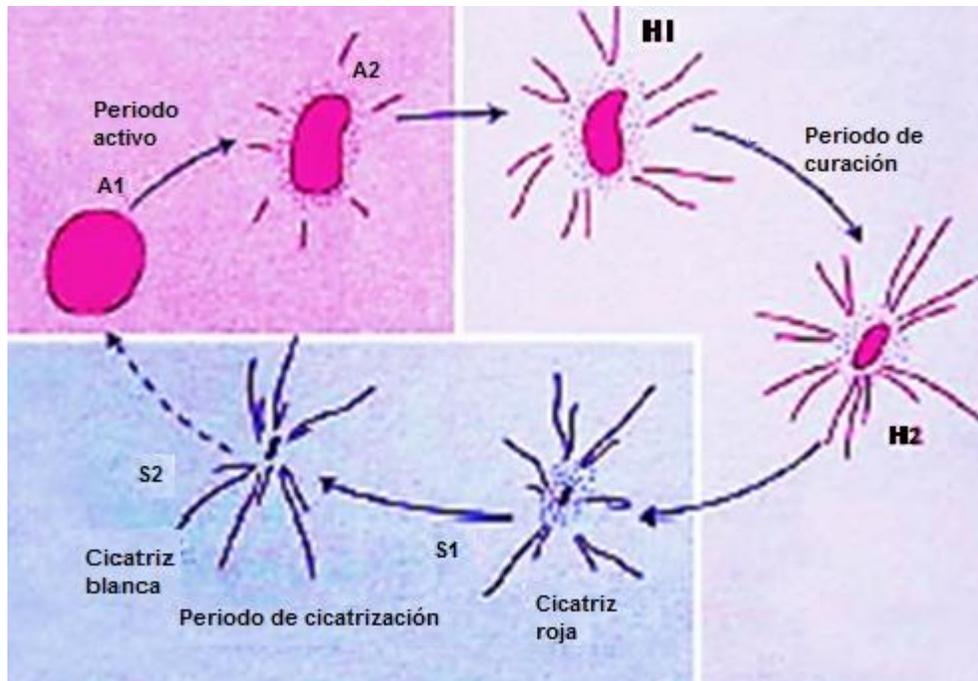


Figura 10. Ciclo evolutivo de la Úlcera gástrica (Hernández 2008) (ver texto).

2.2.2.4 Etiologías que provocan las lesiones

2.2.2.4.1 *Helicobacter pylori*

Este microorganismo cuenta con un mecanismo potencialmente amplio para producir lesiones en el epitelio. Provoca una amplificación de la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica frente a su colonización, induce alteraciones en la secreción gástrica y sintetiza productos tóxicos que lesionan directamente al epitelio (González y Herrera, 2006).

H. pylori evade el ataque del sistema inmune causando una inflamación crónica e indolente por varios mecanismos, puede dañar el sistema de defensa de la mucosa y reducir el grosor de la capa de mucus, disminuye el flujo de sangre a la mucosa, e interactúa con el epitelio gástrico a través de los estadios de la inflamación. La infección por *H. pylori* puede también incrementar la secreción de ácido gástrico mediante antígenos, factores de la virulencia, y mediadores solubles, induce la inflamación aumentando la masa de células parietales y así la capacidad de secretar ácido (Figura 11) (Martínez y otros 2010).

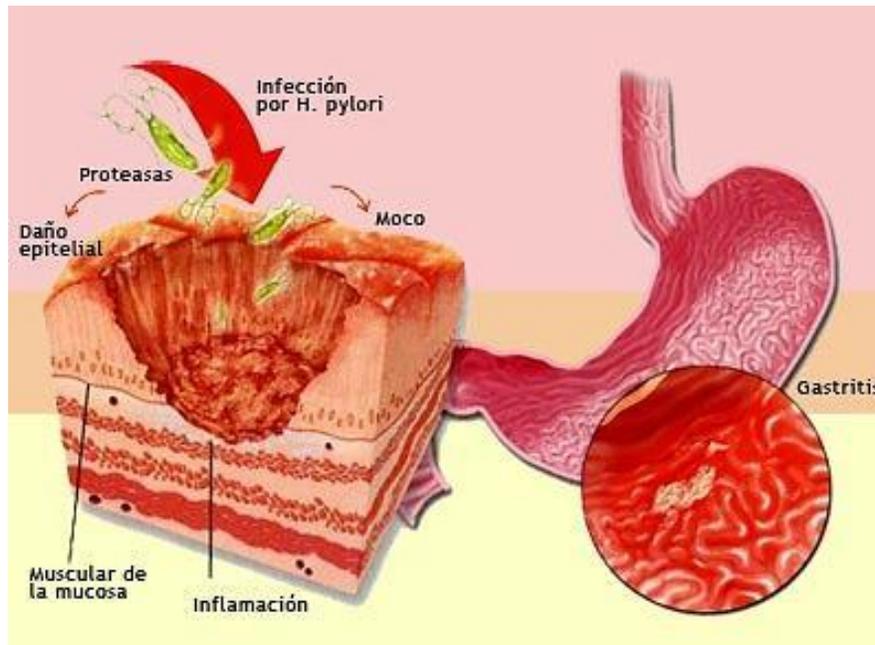


Figura 11. Esquema de infección por *H. pylori* (González, 2013) (Ver texto).

2.2.2.4.2 Tabaco

Estudios epidemiológicos indican que los fumadores tienen doble prevalencia de úlceras por depósitos de benzopirenos e incremento de acidez (Figura 12), que aquellos que no lo son. El tabaco incrementa la producción de ácido gástrico e incrementa el reflujo duodenal gástrico (Sánchez, 2010).



Figura 12. Componentes del tabaco (Nelsbach 2006).

2.2.2.4.3 Papel del estrés

El estrés es una amenaza aguda contra los mecanismos de homeostasis de un organismo. Provoca respuestas adaptativas para mantener la estabilidad del medio interno y asegurar la supervivencia del organismo. El uso frecuente de estos mecanismos de homeostasis por exposición a estrés crónico (induce respuesta metabólica), excesivo o frecuente que puede llevar a la desadaptación y predispone a la enfermedad (Sánchez, 2010).

2.2.2.4.4 AINES

En estudios publicados se ha demostrado que los AINES, aún en presentación farmacéutica de comprimidos con cubierta entérica, o administración sistémica también provocan daño (Navarro, 2009). Los principales factores de riesgo para la producción de úlceras asociadas a este tipo de medicamentos son: dosis altas, uso concomitante de dos o más AINES, co-morbilidades e historia de úlcera sangrante previa (Sánchez, 2010). El principal mecanismo causante de los efectos adversos del tracto gastrointestinal superior asociados a AINES, es la inhibición sistémica de la síntesis de prostaglandinas, que se encuentran involucradas en la reparación y defensa de la mucosa gastrointestinal, aunque hay otros mecanismos asociados, el efecto de los AINES en la mucosa duodenal es alterar la barrera mucosa protectora frente al ácido gástrico. Este ácido, junto a la acción corrosiva

de la pepsina, exacerba y potencia el daño a la mucosa gástrica, iniciado por el efecto de la inhibición de prostaglandinas. El ácido gástrico desempeña así, un papel fundamental en el daño gastroduodenal asociado a los AINES. La elevación del pH intra-gástrico por encima de cuatro, es clave en el tratamiento y prevención de los efectos adversos del tracto gastrointestinal superior, vinculados al uso de AINES (Ancheta y Guzmán, 2011).

Las propiedades irritantes que existen al contacto directo con la mucosa, pueden estar relacionadas también con la pérdida de la capacidad hidrofóbica de la capa de gel de la mucosa, lo que permite una mayor difusión retrograda del ácido gástrico hacia la mucosa. La combinación de estos procesos después de la administración de AINES puede dar lugar a la muerte celular epitelial rápida, hemorragia superficial y erosiones (Ancheta y Guzmán, 2011).

El nivel sistémico, se encuentra relacionado con la inhibición de la síntesis de la ciclooxigenasa tipo 1 (COX1), responsable de la síntesis de prostaglandinas gastrointestinales, disminuyendo así, la secreción de bicarbonato y del mucus, el flujo sanguíneo de la mucosa, y aumentando la retrodifusión de los hidrogeniones desde la luz gástrica hacia las células (Ancheta y Guzmán, 2011).

2.2.2.4.5 Otras etiologías

Existen otras etiologías, que se consideran raras debido a su poca incidencia en relación a los mencionados anteriormente como son:

- a) Hipersecreción ácida (1%)
 - Síndrome de Zolling-Elison (0.1-1.0%)
 - Mastocitosis sistémica
 - Síndromes mieloproliferativos con basofilia
 - Hiperplasia/hiperfunción de las células G antrales
 - Idiopática

- b) Otras infecciones

- Virales: herpes simple tipo I, citomegalovirus
 - Por bacterias del género *Helicobacter* diferente de *H. pylori*
-
- c) Obstrucción duodenal (anillo congénito, páncreas anular)
 - d) Insuficiencia vascular (por consumo de cocaína)
 - e) Radiación
 - f) Quimioterapia (vía arteria hepática)
 - g) Amiloidosis tipo III
 - h) Síndrome de Neuhauser: tremor-nistagmo-úlceras
 - i) Porfiria cutánea tardía (forma familiar)
 - j) Idiopática

A pesar de la disponibilidad de medicamentos efectivos que propician la cicatrización, alivian los síntomas y disminuyen la recurrencia de úlceras, continúan ocurriendo complicaciones, como hemorragias, perforación, penetración y obstrucción al vaciamiento gástrico (Méndez y Uribe 2005) por eso es necesario buscar alternativas para aliviar la gastritis.

2.2.2.5 Complicaciones

El 25% de los pacientes con úlceras gástricas presentan hemorragias de las cuales el 10% persisten o recurren. La mortalidad se correlaciona con edad >60 años y presencia de enfermedades coexistentes. En cuanto a la perforación ocurre cuando el contenido gástrico pasa hacia la cavidad peritoneal. Es baja la incidencia comparada con las hemorragias pero alta comparada con la obstrucción, los factores de riesgo son la edad >50 años, género masculino, uso de AINE y esteroides, presenta una mortalidad de 13-24%. Se manifiesta con dolor epigástrico, se acompaña en ocasiones de náuseas y vómito y a veces es secundaria a hemorragia. En todas aquellas úlceras que desorganizan toda la pared gástrica sin contaminación peritoneal. La úlcera penetra en estructuras adyacentes o la limitan adherencias fibrosas. Su incidencia es incierta debido a que puede ser asintomática, pero se encuentra en casi el 20% de los pacientes

sometidos a intervención quirúrgica por úlcera. Y por último la obstrucción, alrededor del 2% de los pacientes con úlceras peptídicas presenta esta complicación. La obstrucción tiene dos mecanismos. Primero, una úlcera aguda puede producir suficiente inflamación y edema, o espasmo muscular. Segundo, la cicatrización crónica con fibrosis puede causar obstrucción pilórica o duodenal. En este último caso, el estómago puede dilatarse en forma masiva y trastornar su motilidad (Méndez y Uribe 2005). Las personas que presentan este padecimiento, (úlceras) ya sea de forma aguda o crónica, suelen tener síntomas característicos.

2.2.2.6 Síntomas

Los pacientes con úlcera experimentan dolor abdominal en la zona comprendida entre las costillas y el ombligo o sufren hemorragia gastrointestinal. El dolor que produce la úlcera péptica aumenta entre comidas y puede despertar al paciente por la noche, puede incluso obstruir la salida del estómago produciendo náuseas y vómitos. Los signos de hemorragia se evidencian en forma de vómitos con sangre o en forma de heces pegajosas y negras (Casco, 2011).

La presencia de anorexia y pérdida de peso puede ocurrir en más de la mitad de los pacientes; estos síntomas son la consecuencia de un retardo en el vaciamiento gástrico que acompaña a la ulceración del estómago, incluso en ausencia del síndrome de obstrucción al vaciamiento gástrico (Latarjet y Ruiz 2008). Una vez que se presentan los síntomas no se puede asegurar la presencia de úlceras por lo que es necesario su diagnóstico, a pesar de que existen diversos estudios clínicos solo uno parece ser el más certero (Casco, 2011).

2.2.2.7 Diagnóstico

En la actualidad, el estudio endoscópico se recomienda como la prueba número uno para confirmar la presencia de ulceración peptídica en pacientes con síndrome dispéptico. El estudio de contraste con bario es sustancialmente menos sensible que la endoscopia para identificar ulceraciones y, a diferencia del estudio endoscópico, no permite la toma de biopsias de lesiones sospechosas. Las

úlceras pépticas afectan cualquier parte del estómago, pero más del 80% se localiza en la curvatura menor dentro de los 90 mm cercanos al píloro, por lo que es necesario un tratamiento efectivo para las úlceras gástricas (Latarjet y Ruiz 2008).

2.2.2.8 Tratamiento

2.2.2.8.1 Fármacos utilizados para el control de la acidez gástrica y el tratamiento de úlceras pépticas.

En el mercado existe una gran variedad de medicamentos para el tratamiento de las úlceras gástricas los cuales actúan por diferentes mecanismos y en diferentes partes del tracto gastrointestinal (Figura 13) por lo que se clasifican en:

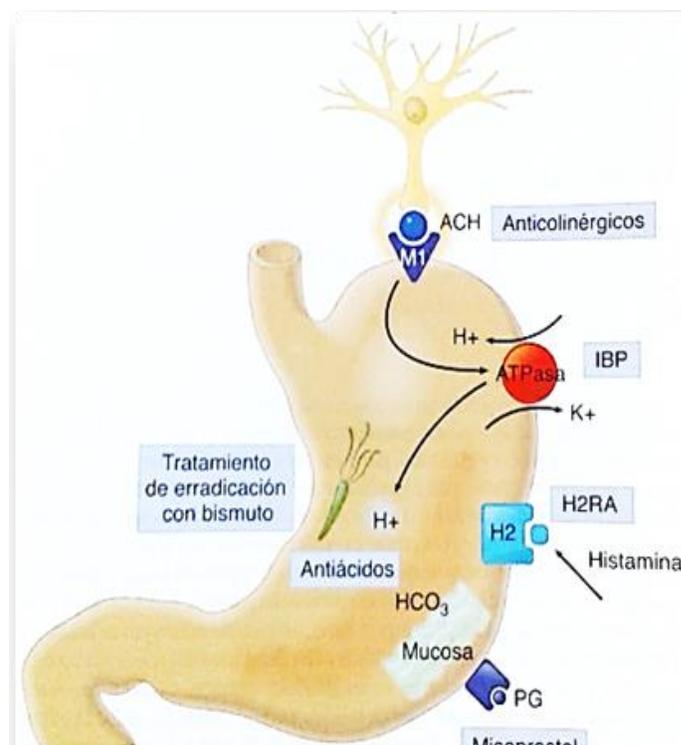


Figura 13 Mecanismos de acción de los fármacos antiulcerosos (Méndez y Uribe 2005) (Ver texto).

- a) Los que disminuyen los factores agresivos: neutralización ácida.
 - Los antiácidos: dadas las múltiples dosis diarias que se precisan para que estos fármacos sean eficaces, el cumplimiento del tratamiento es, a nivel

práctico, muy difícil, por lo que se usan para el alivio temporal de los síntomas. Muchos de estos fármacos combinan las sales de aluminio y magnesio para disminuir los efectos secundarios de estreñimiento y diarrea, respectivamente, que poseen estas sustancias. Pero no se recomiendan como primera opción (Méndez y Uribe 2005).

- Los antagonistas de los receptores H_2 : son antagonistas competitivos de la acción de la histamina, reversibles y muy selectivos, aunque hay que tener en cuenta que no inhiben la acción directa de la acetilcolina y la gastrina sobre la producción de ácido. La primera en ser utilizada fue la cimetidina, pero en la actualidad el uso más extendido corresponde a la ranitidina (Figura14), de acción más potente y con menos efectos secundarios que la anterior (Méndez y Uribe 2005).

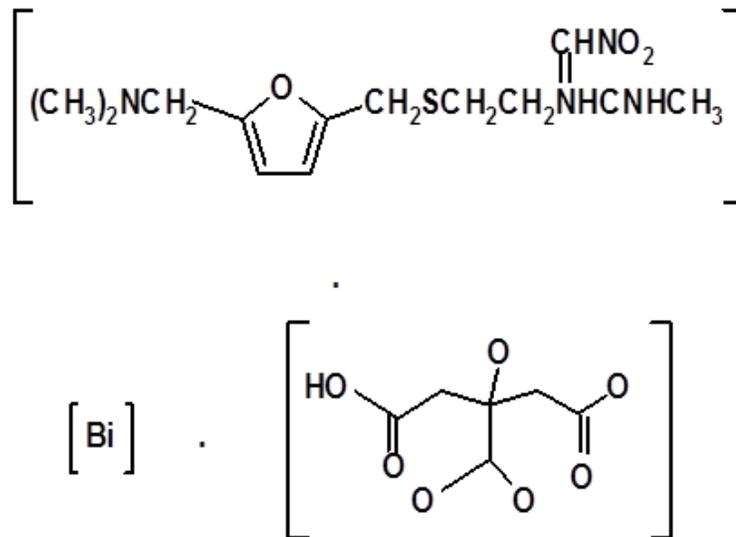


Figura 14. Estructura química de la Ranitidina, citrato de bismuto (Velázquez y Fernández, 2008).

- Los inhibidores de la bomba de protones actúan inhibiendo irreversiblemente la vía final común de la formación de ácido (Figura15). El fármaco que se utiliza por excelencia es el omeprazol. Las cápsulas de

omeprazol tienen una cubierta que se deshace en el pH ácido del estómago, donde se liberan los gránulos que hay en su interior que, a su vez, tienen una cubierta que resiste el ácido y sólo se libera el profármaco cuando llega al pH más alcalino de las porciones proximales del intestino delgado, lugar donde se absorbe (Méndez y Uribe 2005).

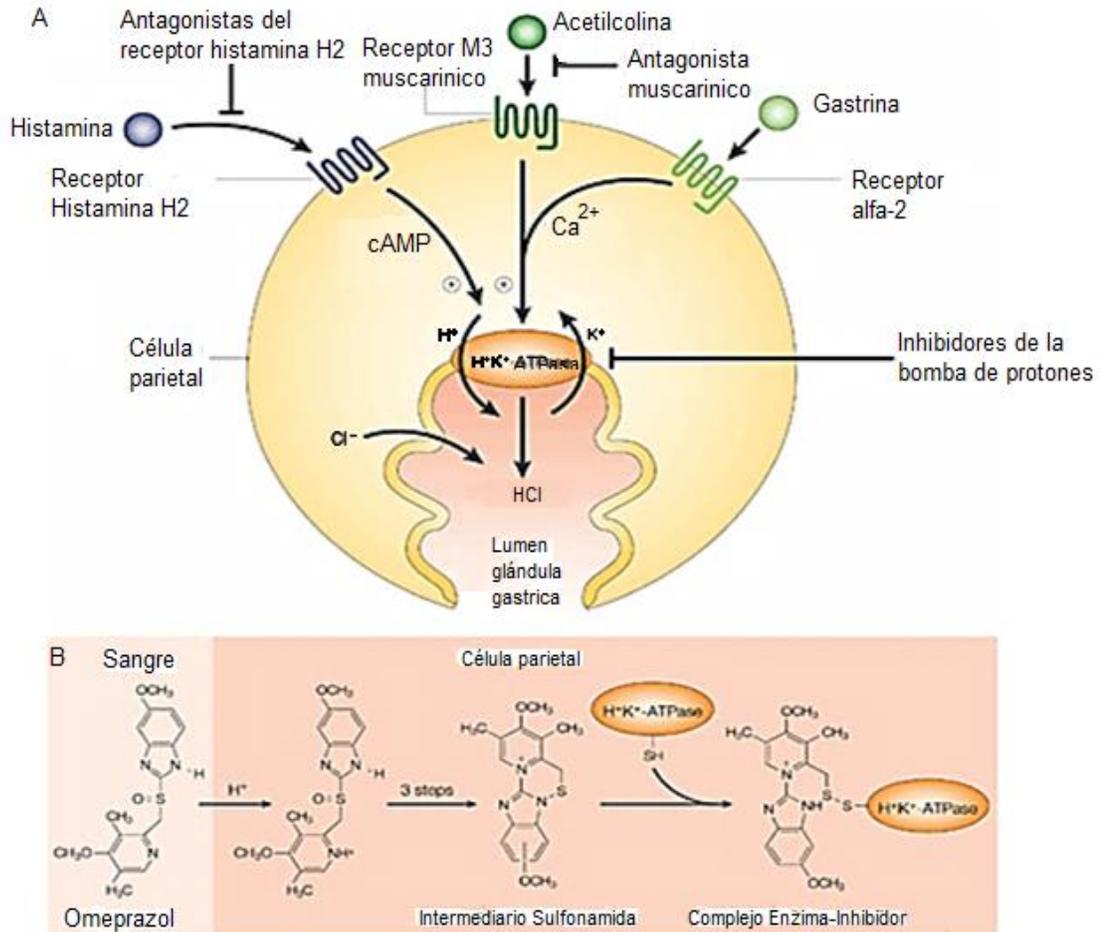


Figura 15. Estructura química de los inhibidores de la bomba de protones (IBP), modificaciones estructurales de estos fármacos en un medio ácido (Lars, 2003) (Ver texto).

b) Mejora de los factores defensivos: agentes citoprotectores.

- El sucralfato (Figura 16) forma un gel pegajoso que se adhiere a las zonas de mucosa lesionada protegiéndola al mismo tiempo que aumenta el flujo sanguíneo y la producción de moco y bicarbonato. No sólo actúa a nivel del

pH ácido del estómago sino también y de forma eficaz en esófago y duodeno. Debe tomarse con el estómago vacío y evitarse la ingestión de leche y antiácidos porque se unen a él neutralizando sus efectos (Méndez y Uribe 2005).

Aun cuando la molécula de sucralfato contiene hidróxido de aluminio, este agente posee poca capacidad para neutralizar la secreción ácida. El hidróxido de aluminio se disocia cuando se expone al ácido gástrico, y deja el anión sulfato, el cual se puede unir a las proteínas cargadas electrostáticamente en el tejido gástrico dañado. De esta manera, el sucralfato se une al cráter dañado, donde forma una barrera protectora que evite el ataque ulcero péptico posterior (Méndez y Uribe 2005).

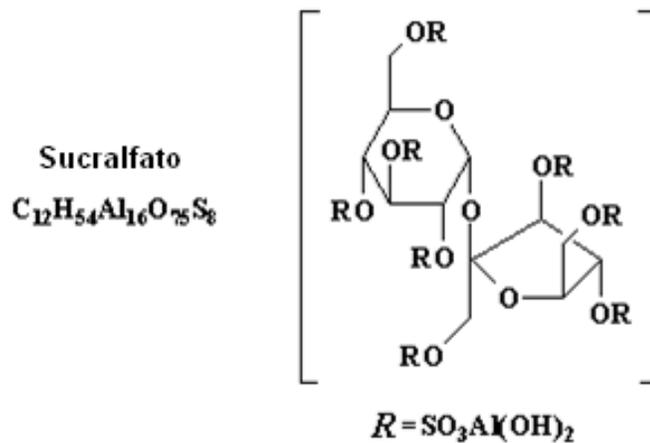


Figura 16. Estructura química del Sucralfato (Velázquez y Fernández, 2008).

c) Medicamentos anti ulcerosos diversos

- Bismuto: Forma un complejo con el moco que cubre los cráteres ulcerosos; de esta manera aumenta la protección contra el ácido ulcero péptico (Méndez y Uribe 2005).
- Análogos de las prostaglandinas: Inhiben la secreción gástrica, estimula la secreción de moco y bicarbonato e incrementa el flujo sanguíneo. No

obstante la FDA solo aprobó el misoprostol (Figura 17) debido a que este tipo de fármaco tiene efectos secundarios como riesgo de aborto, diarrea frecuente (Méndez y Uribe 2005).

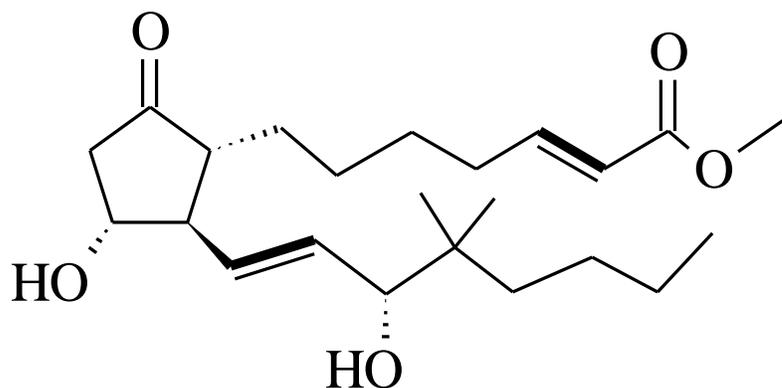


Figura 17. Estructura química del misoprostol (Delgado, Minguillon, y Joglar , 2004).

- Anticolinérgicos: Inhiben la secreción ácida gástrica que estimula los alimentos, solo reduce un 50% por lo que se prefiere utilizar los antagonistas de los receptores H2 y los inhibidores de la bomba de protones (Méndez y Uribe 2005).

En la actualidad el tratamiento de la úlcera péptica, se encuentra en un proceso radical de transformación. La terapia convencional más común consiste en el empleo de un inhibidor de la secreción ácida o de un protector de la mucosa. Generalmente, estos tratamientos tienen una duración media de 4 a 8 semanas, pero a pesar de esto, las recidivas son frecuentes (Tabla 4). En este sentido es importante las propiedades de los distintos fármacos: citoprotección, es la capacidad de los fármacos, originalmente de las prostaglandinas, para prevenir injuria a la mucosa gástrica, producida por una variedad de agentes ulcerogénicos y necrotizantes. Esta propiedad se diferencia de la gastroprotección, debido a que esta solo reduce erosiones profundas, mientras que las células de la superficie no muestran mejoría; la gastroprotección en cambio, brindan protección de la mucosa

gástrica, mientras que un organoprotector es un compuesto que protege un órgano de daño por erosión (Ancheta y Guzmán, 2011).

Tabla 4. Eficacia de la terapia farmacológica en la patología ulcerosa, (Ancheta y Guzmán, 2011).

Fármacos	Porcentaje de curación en 4 semanas
Inhibidores de las bombas de protones Omeprazol Lazoprazol Pantoprazol	70-80% úlcera gástrica
Antihistamínicos H ₂ Cimetidina Ranitidina Famotidina	60-70% úlcera gástrica
Protector de la mucosa Sucralfato	60-70% úlcera gástrica
Prostaglandinas Misoprostol	50-70% úlcera gástrica
Sales de bismuto	60-70% úlcera gástrica

2.3 Modelo biológico utilizado para la inducción de úlceras gástricas.

Las características fisiológicas de la secreción gástrica para humanos, como para ratas, son similares, presentando inclusive, secreción de ácido y pepsina, con una distribución de los valores para pepsinógeno sérico que en ambos son similares; es de hacer notar que de la misma forma que sucede en humanos, la formación úlceras, se encuentra determinada por factores propios del individuo (Ancheta y Guzmán, 2011).

La utilización de modelos animales en la inducción de úlceras gástricas, ha permitido ampliar los conocimientos en la complejidad y multifactorialidad de las úlceras gástricas. Se han desarrollado diferentes modelos, lo cuales se enfocan al daño agudo en la mucosa gástrica; se utilizan sustancias necrotizantes como el etanol, ácidos o bases fuertes, AINES, isquemia o estímulos estresantes (Ancheta y Guzmán, 2011).

El efecto de las sustancias necrotizantes es a nivel de la mucosa gástrica, provocando ruptura y desprendimiento del epitelio, además de, congestión vascular. Por esta razón las sustancias en dichos modelos son administradas por vía orogástrica, por medio de una cánula (Ancheta y Guzmán, 2011).

- Los AINES más utilizados en la inducción de úlceras gástricas, son ácido acetil salicílico e indometacina, ambos causan daño a nivel local, sin embargo la indometacina puede provocar úlceras gástricas por mecanismos sistémicos, por medio de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, perjudicando la microcirculación a nivel de la mucosa gástrica, promoviendo así, la adición de neutrófilos a las células endoteliales (Ancheta y Guzmán, 2011).
- Los animales que son sometidos a estrés suelen presentar úlceras sangrantes en pocas horas como un efecto negativo de los mecanismos de defensa desencadenados. Los factores que producen estrés son muy variados, entre ellos podemos mencionar la hipotermia, los esfuerzos durante competencias o entrenamientos y sobrealimentación. Robert en 1979, describió los mecanismos citoprotectores al observar que la integridad de la superficie gástrica se mantenía gracias a la barrera de la mucosa gástrica. Utilizando un modelo experimental en ratas sometidas a hipotermia e inmovilización se observó que la hipotermia causa una alteración primaria en la microcirculación mucosal que provoca una disminución en la secreción de mucus y HCO_3^- debilitando la barrera de la mucosa gástrica. Paralelamente se produce un aumento de la motilidad gástrica que actúa provocando un efecto erosivo mecánico, favoreciendo el desprendimiento de mucus. El debilitamiento de la barrera de la mucosa gástrica y el efecto erosivo permiten que el HCl llegue hasta la superficie gástrica lesionándola. Estudios realizados en ratas han demostrado la importancia del aumento de la motilidad en la formación de las úlceras inducidas por estrés al prevenirlas con la administración de atropina (Toso, y otros 2007).

- Para la inducción de lesiones gástricas, en este trabajo se usó la técnica propuesta por Robert y colaboradores, para lo cual se usó alcohol 98% administrado vía orogástrica, mediante canulación, a dosis de 10 mL/kg. El alcohol es una molécula con gran capacidad de incrementar el estrés oxidativo celular. A nivel de los tejidos, incrementa la apoptosis celular, que es uno de los principales tipos de muerte celular, además de inflamación y la necrosis, especialmente gástrica y hepática (Huamán, y otros 2009).

2.3.1 Métodos de cuantificación de las úlceras

2.3.1.1 Medición macroscópica

Existen varios métodos para cuantificar el tamaño de las úlceras, entre éstos tenemos: los cuantitativos no sistemáticos, como son la suma de longitudes de las lesiones, o el índice de úlcera, donde se multiplica el largo por el ancho, obteniendo así el área de la misma. El problema de estos métodos, es que secundario a la forma irregular a que se presentan las úlceras, se pierden ciertas áreas con el cálculo realizado (Ancheta y Guzmán, 2011).

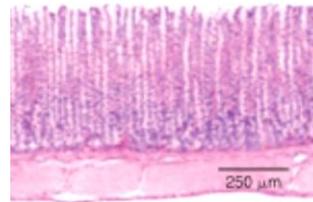
También existen los métodos sistemáticos, en los cuales las muestras son colocadas en una lámina cuadrículada, midiendo así su tamaño, ya sea a simple vista, con un microscopio o estereoscopio, las desventajas de estos métodos, son que si bien se obtienen, una mejor cuantificación del área, toman mucho tiempo, y en el caso del que emplea un estereoscopio, este queda fuera del alcance de los laboratorios pequeños (Ancheta y Guzmán, 2011).

2.3.1.2. Medición microscópica

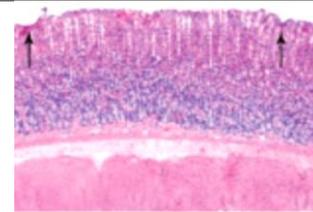
La medición microscópica se basa en la preparación de cortes histológicos, y su posterior análisis por un patólogo. La mayor desventaja de este método, es que da espacio a la subjetividad del evaluador. Esta forma de medición puede evitar en gran medida, el sesgo, utilizando una escala que le otorgue un puntaje a cada una de las características encontradas dentro de las úlceras gástricas; en ratas fue propuesta una escala de medición por Morini G y Grandi D. Para evaluar la

severidad del daño a la mucosa, se toma de base la profundidad de la lesión y se hace de acuerdo a la siguiente escala (Ancheta y Guzmán, 2011):

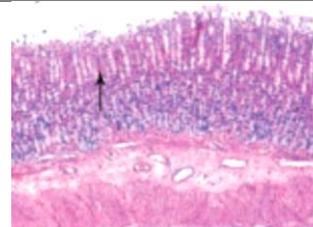
Grado 0: Todas las células de la mucosa gástrica se encuentran intactas.



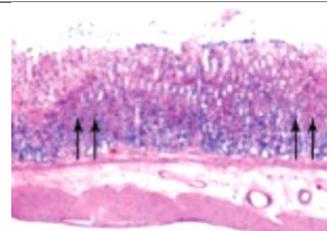
Grado 1: Las células de la mucosa que se encuentran en la superficie luminal se encuentran dañadas y parcialmente exfoliadas, las células de las criptas se encuentran intactas.



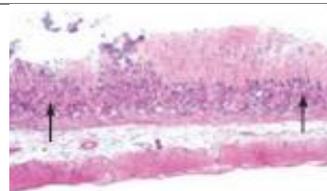
Grado 2: Células de la superficie luminal, se encuentran extensamente dañadas, aunado el daño de las células de las criptas, mientras las células glandulares se encuentran intactas.



Grado 3: Aunado al daño de las células superficiales y las criptas, se evidencia el daño en el área parietal de las células glandulares gástricas, numerosas células exfoliadas y necrosis completa de la capa celular superficial.



Grado 4: Daño grado 3 severo que se extiende a la porción inferior de las glándulas y edema de submucosa.



2.4 Producto natural utilizado

El empleo de plantas medicinales con fines curativos, es una práctica que se ha utilizado desde tiempos inmemorables, durante mucho tiempo, los remedios naturales y sobre todo las plantas medicinales, fueron los únicos recursos que poseían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales, que poseen propiedades medicinales, y ampliar su experiencia en el empleo de los productos extraídos de las mismas.

La fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de plantas, nunca ha dejado de tener vigencia. Gran parte de la población recurre a tratamientos alternativos, ya que es un tratamiento de fácil obtención y bajo costo, sin embargo existen pocos trabajos experimentales, que corroboren la efectividad de estas plantas sobre las úlceras gástricas, y si este beneficio es comparable con los tratamientos médicos tradicionales (Ancheta y Guzmán, 2011). Las plantas que son ricas en componentes polifenoles y otros compuestos antioxidantes, como es el caso de las hojas de zarzamora, se piensa que tienen la propiedad como agente gastroprotector es decir para prevenir la gastritis y también como tratamiento.

2.4.1 Zarzamora o Zarza (*Rubus fruticosus* L.)

La zarzamora ya era conocida en el neolítico, es por lo tanto una planta muy antigua que ya fue alabada por sus propiedades medicinales por Dioscórides y Teofrasto; los grandes médicos y farmacólogos de la Antigüedad hablan de ella (El Dioscórides renovado 1999).

2.4.1.1 Taxonomía

Zarzamora (*Rubus fruticosus*)

REINO:	Plantae
PHYLUM:	Magnoliophyta
CLASE:	Magnoliopsida
ORDEN:	Rosales
FAMILIA:	Rosaceae (Muniz, Brugnoli y Masciadri 2011)



GENERO *Rubus*
ESPECIE *fruticosus*

2.4.1.2 Descripción

La planta de la zarzamora o (*Rubus fruticosus*) es un arbusto de ramas arqueadas y espinosas, hojas compuestas de 3 o 5 folíolos elípticos y de borde aserrado, dispuestos de forma palmeada (Figura 18). Florece desde el final de la primavera hasta el principio del otoño. Sus flores crecen en racimos compuestos, con 5 sépalos y 5 pétalos blancos o rosados sobre un receptáculo ensanchado, con numerosos estambres. Su fruto es una polidrupa, la popular mora o zarzamora, que es al principio rojiza y finalmente negra brillante cuando madura (Asociación Española para la Cultura, el Arte y la Educación, 2013).



Figura 18. Hojas de *Rubus fruticosus* (EducaMadrid, Plataforma tecnológica s.f.).

Con fines medicinales se recolectan las raíces, las hojas jóvenes y frutos bien maduros. Las hojas se recogen a mano una por una, justo en el momento de la floración de la planta, que sucede en primavera-verano. Los frutos se recogen en verano-otoño cuando están bien maduros, para consumir en fresco. Las hojas se dejan secar a la sombra en lugar bien aireado; se almacenan resguardadas del polvo y la humedad (Asociación Española para la Cultura, el Arte y la Educación, 2013).

2.4.1.3 Origen y distribución geográfica



La zarza comprende numerosas variedades e híbridos, muy abundantes y extendidos por todo el mundo. Nace de forma espontánea en bordes de caminos, lindes de bosques abiertos, campos en barbecho, y en otros diversos lugares que abarca desde los valles hasta las montañas. También se cultiva en Europa como planta medicinal y por sus frutos (Asociación Española para la Cultura, el Arte y la Educación, 2013).

2.4.1.4 Valor nutricional

Los principales componentes de la hoja de zarzamora son los taninos hidrolizables aproximadamente 8-14%, galotaninos y elagitaninos diméricos. También cabe mencionar la presencia de hidroquinonas, ácido cítrico e isocítrico, arbutina, flavonoides, compuestos triterpénicos pentacíclicos ácidos, ácido rubítico, pequeñas cantidades de aceite esencial, goma y lípidos (Vanaclocha y Cañigueral 2006; Witchyl, 2004). Así como también contienen un alto contenido en fibras, carotenoides y antocianinas.

2.4.1.4.1 Flavonoides

Los flavonoides tienen una estructura química muy definida. De manera general son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (o aromáticos) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, los autores los denominan simplemente como compuestos C₆C₃C₆ (Figura 19).

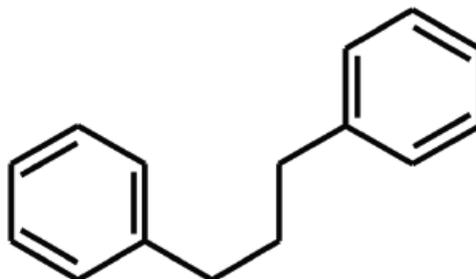


Figura 19. Estructura química base de los flavonoides (Ancheta y Guzmán, 2011).

Los flavonoides son pigmentos naturales, presentes en los vegetales, que brindan protección al organismo de daños producidos por agentes oxidantes, el organismo humano no produce estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben de obtener mediante la alimentación o por medio de suplementos. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilofenólicos y excelentes propiedades de quelación de metales transitorios tales como hierro, cobre y zinc, catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en diferentes patologías, tales como: úlcera estomacal, duodenales e inflamaciones. En general se les atribuye a los flavonoides propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, (Ancheta y Guzmán, 2011), antiagregantes, antihemorrágicas, vasodilatadoras, antineoplásicas, antivirales, antibacterianas, antialérgicas y hepatoprotectoras (Rodríguez, y otros 2010).

Tienen la ventaja de ser hidrosolubles y liposolubles, por eso en contrastes con otros antioxidantes, que no poseen esa doble cualidad, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, combaten la inflamación, alergias y aumentan la efectividad de las células *natural killer* (NK) del sistema inmunológico. Se ha identificado más de 5000 flavonoides, entre los que se pueden destacar: citroflavonoides, isoflavonoides, proantocianidinas y antocianidinas, ácido elágico, catequina y caenferol (Ancheta y Guzmán, 2011).

2.4.1.4.1.1 Antocianinas

Las antocianinas son un grupo de pigmentos de color rojo, hidrosolubles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Químicamente las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace β -glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ión flavilio (Figura 20). El interés en los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Durante el

paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante. Estudios con fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que éstas son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas (Aguilera y Reza, 2011). En promedio 100 g de fruta fresca en el caso de la zarzamora contienen 83 a 326 mg de antocianinas. Se encuentran ampliamente distribuidos (aunque no en concentraciones altas) en las flores y los frutos principalmente en las “berries”. Juegan un papel muy importante en el mecanismo de protección de las plantas al ataque de los insectos (Rodríguez, y otros 2010).

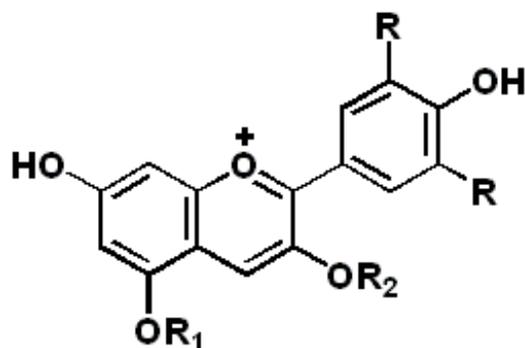


Figura 20. Estructura general de las antocianinas, R1 y R2 pueden ser H o azúcares R puede ser OH o H (Delgado, Minguillon y Joglar 2004).

2.4.1.4.3 Taninos

Santos-Buelga y Scalbert (2000) citaron, los taninos son metabolitos secundarios de las plantas, comprenden un grupo heterogéneo de polifenoles en plantas, son solubles en agua, (Rodríguez, y otros 2010). Presenta actividades farmacológicas como: antiinflamatorias y astringentes. Por ejemplo tienen acción secante y antiinflamatoria de la mucosa gástrica por lo que resultan muy efectivos en casos

de diarreas o cólicos. Tienen una potente acción astringente y son vasoconstrictoras es decir ayudan a que la sangre coagule. Son antihemorrágicas.

Los taninos son beneficiosos en el tratamiento para hemorroides (alivio hinchazón, vasoconstricción, etc.) (Quiroz 2007). Freudenberg (1920), divide a los taninos en dos grandes grupos, taninos hidrolizables y taninos condensados. Los taninos condensados son los más comunes en nuestra dieta, y sus efectos en la salud han sido mucho más estudiados que las de los taninos hidrolizables (Figura 21) (Rodríguez, y otros 2010).

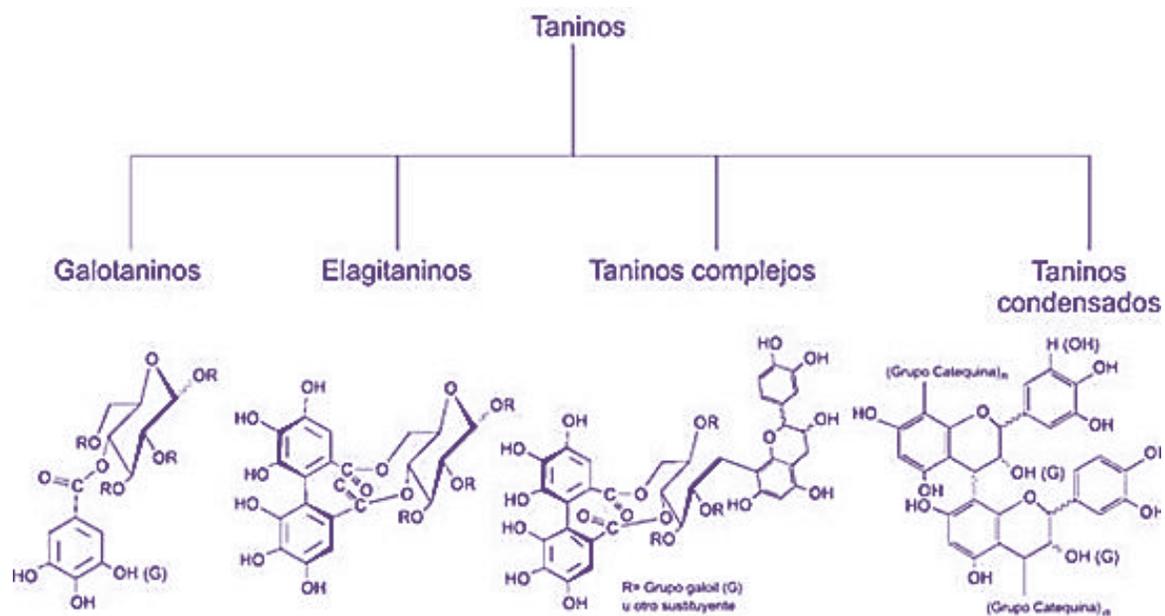


Figura 21. Taninos y su clasificación (Rodríguez, y otros 2010).

2.4.1.4.4 Capacidad antioxidante y vitamina “C”.

El cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes.

La pérdida en este balance de óxido-reducción lleva a un estado de estrés oxidativo y este estado se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas, que no alcanzan a ser compensados por los sistemas

de defensa antioxidantes, causando daño y muerte celular. Esto ocurre en patologías degenerativas, de tipo infeccioso, inmune, inflamatorio, etc. (Rodríguez, y otros 2010). La dieta juega un papel importante en la prevención de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través de la ingestión de compuestos bioactivos de origen vegetal. Entre ellos, las vitaminas hidrosolubles como es la vitamina C (Figura 22) y liposolubles, carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos (Dra. Almajano 2009).

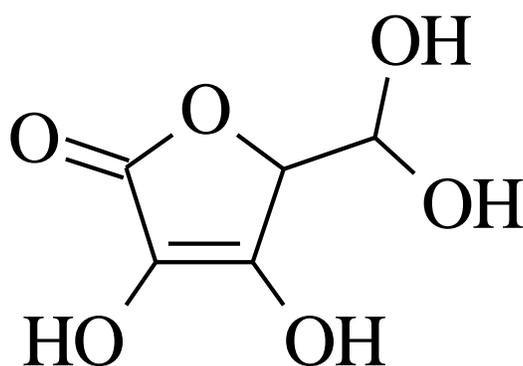


Figura 22. Estructura química de la vitamina C.

2.4.1.4.5 Radicales libres

Los radicales libres, son especies químicas que tienen un electrón impar en una órbita externa, son extremadamente reactivos e inestables y entran en reacción con químicos orgánicos e inorgánicos. Se caracterizan, por ser muy reactivos y de vida media relativamente corta. Son capaces de dañar seriamente las estructuras celulares ya que aceptan o donan electrones iniciando y propagando reacciones en cadena que transforman esas biomoléculas en compuesto oxidados muy reactivos, causan lesión celular por inducción de la lipoperoxidación, que resulta en daño estructural y funcional de la célula. La lipoperoxidación es un fenómeno complejo iniciado por la sustracción de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno ubicado entre dos uniones no saturadas en una molécula de lípido. El resultado es la formación de un nuevo lípido radical libre con un carbono central, que en la presencia de oxígeno, produce peróxidos lipídicos o hidroperóxidos lipídicos. Otros componentes celulares que presentan riesgos de daño por los

radicales libres, son las proteínas, ácidos nucleicos y moléculas que contienen sulfuro y no saturadas (Gonzalez y Herrera, 2006).

Las células presentan mecanismos de protección, de manera que los radicales libres pueden ser transformados a productos menos tóxicos o no tóxicos. La protección de las células contra estos compuestos comprende no solo la captura de estos intermediarios agresivos, sino también la prevención de su formación, la inhibición de su propagación y la reparación de las lesiones (González y Herrera, 2006).

2.4.1.5 Propiedades farmacológicas

Como infusión presenta propiedades medicinales como: Astringente, diurético, antidiarreico, antidiabético, hemostático, laxante, bactericida y fungicida, leve efecto desinflamatorio. Detienen pequeñas pérdidas de sangre de heridas menores. Ulceraciones cutáneas, estomatitis, glositis, gingivitis, faringitis dolor de garganta y las úlceras bucales (Plantas medicinales, 2010). Se emplean como antihemorrágico interno, en menstruaciones prolongadas además de que presenta actividad antioxidante (Asociación Española para la Cultura, el Arte y la Educación, 2013). También se emplean las hojas de zarzamora para el lavado de erupciones dérmicas (Vanaclocha y Cañigueral 2006).

2.5 Modelo para la evaluación CL50

2.5.1 Fundamento del uso de *Artemia salina*

El ensayo de letalidad de *Artemia salina* se basa en la posibilidad de causar la muerte de larvas de este crustáceo cultivadas en el laboratorio. Este método fue propuesto por Michael en 1956 y posteriormente, desarrollado por Vanhececke, Sleet y Brendel con el propósito de contar con una herramienta útil y sencilla para la determinación de toxicidad. Este método, en el cual se determina el valor de la CL50 de compuestos y extractos en medio salino, ha sido utilizado para la detección de toxinas de hongos y cianobacterias, toxicidad de extractos de

plantas, metales pesados y para predecir citotoxicidad de compuestos puros (Bustamante 2012)

Meyer y colaboradores en 1982, propusieron el uso de *Artemia salina*, como organismo de prueba en un bioensayo general para evaluar la actividad biológica de sustancias vegetales, esto se basa en la premisa de que los compuestos bioactivos son tóxicos a altas dosis y que la letalidad en un organismo simple puede ser utilizada para detectar y guiar el fraccionamiento de los extractos, el bioensayo, en la propuesta se consideró que si una determinada sustancia en una cierta concentración produce efectos farmacológicos y que esa misma sustancia en concentraciones elevadas produce efectos tóxicos, entonces la toxicidad, medida como la mortalidad producida a un organismo simple, como *A. salina*, puede ser utilizada como criterio para la detección y evaluación de actividad biológica en extractos vegetales, Se comprueba la existencia de actividad biológica con este bioensayo, "cuando el valor de LC 50 de los extractos expresado en mg/ml es inferior a 1,000 (Cortés, 2005; Jerry y McLaughlin, 1998; Gorriti y Zárate, 1998).

A. salina (Figura 23) tiene varias ventajas al ser utilizada para bioensayo, como por ejemplo: los quistes son viables por varios años, posee una alta sensibilidad a tóxicos, se utiliza un volumen pequeño de muestra, requiere de instrumentación poco compleja, es posible la miniaturización y es un bioensayo rápido, simple y económico (Perez, 2003).

Actualmente los ensayos en *A. salina* se consideran una herramienta útil para la evaluación preliminar de la toxicidad de los extractos de plantas, la detección de distintos tipos de actividad biológica y para aislar e identificar las sustancias vegetales bioactivas (Cortés, 2005; Jerry & McLaughlin, 1998)



Figura 23. Imagen de la *Artemia salina*.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad ácido péptica, se observa frecuentemente dentro de las patologías de mucosa gástrica. El constante flujo de ácido hacia el interior de la luz gástrica, además de los diferentes alimentos, agentes químicos, estrés, factores endógenos, entre otros ponen en riesgo a las células de la mucosa a desarrollar úlcera gástrica. La úlcera gástrica es una enfermedad de interés mundial, estimándose que existen alrededor de 14.5 millones de personas en el mundo que padecen de dicha patología con una mortalidad de 4 millones anuales, secundario a complicaciones o mal manejo de ésta. Por su etiología multifactorial se vuelve una patología muy frecuente, que a pesar de la bibliografía y estudios sobre el tema, presenta una amplia tasa de fracasos en su prevención y tratamiento. En el mercado existe una gran cantidad de fármacos para los padecimientos gastrointestinales como son los antiácidos, los inhibidores de H₂, los inhibidores de la bomba de protones (IBP) entre otros. La eficacia terapéutica superior de los IBP's frente a otros antisecretores, como los inhibidores H₂, los han convertido en los fármacos de elección del tratamiento de las enfermedades peptídicas. Sin embargo, debido a los temores sobre seguridad, el omeprazol, el primer fármaco de la familia de los IBP, fue comercializado en las dosis mínimas eficaces. Por la misma razón, los siguientes fármacos del grupo, lansoprazol y pantoprazol, se comercializaron en dosis equipotentes desde el punto de vista de eficacia antisecretora. Un segundo punto importante es que la respuesta a los IBP presenta una marcada variabilidad interindividual probablemente determinada

genéticamente y que condiciona la eficacia clínica de estos fármacos (Luis 2008). Además de que los medicamentos que se encuentran para el tratamiento no son 100% efectivos, los pacientes no cumplen con el tratamiento ya que son muy extensos además de que influyen dos factores principalmente, que cuando se sienten mejor dejan de tomar su tratamiento y ya no cumple con el tiempo establecido y el segundo factor es el económico. Por lo que la búsqueda de sustancias con nuevas actividades biológicas que aborden este problema, se encuentran siendo investigadas; como lo es el uso de sustancias naturales ricas en flavonoides para el tratamiento de la úlcera gástrica, siendo las hojas de zarzamora (*Rubus fruticosus*) un ejemplar que presentan un alto contenido de flavonoides entre otros agentes antioxidantes por lo que es necesario saber si el extracto acuoso de estas hojas tendrá un efecto gastroprotector.

4. OBJETIVOS

Determinar si el extracto acuoso de las hojas de zarzamora o zarza (*Rubus fruticosus*) posee actividad gastroprotectora en úlceras gástricas inducidas por un método químico mediante la administración oral de etanol en ratas cepa Wistar, (mediante estudios macroscópicos y microscópicos). Además, determinar la CL50 por medio de un bioensayo con *Artemia salina*.

5. HIPÓTESIS

Debido a los componentes que presentan las hojas de zarzamora como son ácido cítrico, isocítrico, flavonoides entre otros antioxidantes solubles en un medio acuoso, entonces tendrá propiedades terapéuticas como gastroprotector logrando una recuperación de la mucosa gástrica.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material, reactivos y equipo

Material biológico

- Hojas de zarzamora (*Rubus fruticosus*).



- Ratas de la cepa Wistar de peso entre 230-300g. Los animales empleados en este experimento provienen del Bioterio de la facultad de Química y no se habían sometido previamente a experimentación. Las condiciones de mantenimiento de los animales son las que establece la NOM-062-ZOO-1999. En el caso del alimento y agua fueron ad libitum.
- Huevecillos de *A. salina*

Material de laboratorio

- Caja Petri
- Cajas de acrílico con tapa para ratas
- Estuche de disección
- Frascos de vidrio con tapa
- Jeringas de 1 y 20mL
- Microscopio
- Pisos de malla para cajas de rata
- Probeta de 100mL
- Sonda esofágica de metal recta para rata (calibre 20mm)
- Vasos de precipitados de 50 y 250mL
- Vidrios de reloj

Reactivos

- Ácido cítrico grado reactivo (Sigma-Aldrich)
- Agua Mili Q
- Alcohol 98% (ETOH , Merck)
- Formaldehído al 10% (Merck)
- Medio de cultivo para *Artemia salina* (Agua de mar).
- Salicilato de bismuto (Pepto bimol, PyG™)
- Solución salina isotónica (SSI, 0.9%; ABBOTT)

6.2 Metodología



6.2.1 Obtención del extracto

Para la obtención del extracto acuoso de las hojas de zarzamora (*Rubus fruticosus*) la primera etapa del proceso fue:

- a) Desechado: el cual consiste en dejar a temperatura ambiente las hojas extendidas en una charola para su uso posterior, esto se realiza para poder conservar las hojas y que de esta manera no se contaminen con microorganismos.
- b) Una vez que las hojas se encuentran secas, se realiza la fragmentación de estas para obtener un mayor contacto de superficie y así poder extraer los componentes.
- c) Se pesó 25.0 gramos de estos fragmentos.
- d) Se realizó una decocción de estas hojas, es decir se puso a hervir 250 ml de agua junto con los 25.0 gramos de las hojas fragmentas y después se dejó enfriar y se almacenó para su uso posterior.



Figura 24. Diagrama de flujo 1. Método de obtención del extracto acuoso de *Rubus fruticosus*

6.2.2 Determinación de la CL50

Para el cultivo de *Artemia salina* se empleó agua de mar artificial la cual fue preparada de acuerdo a la siguiente fórmula: para 1L, en agua destilada se disolvieron 23 g de NaCl, 11 g de Mg 6H₂O, 4g de Na₂SO₄, 1.3g de CaCl₂·2H₂O y 0.7g de KCl, se ajustó el pH de la solución a 8.0 con Na₂CO₃.

Para la eclosión de los huevos se utilizó una cámara de vidrio de 2 compartimientos (uno oscuro y otro iluminado por una lámpara de 18 W que se colocó en una altura aproximada de 30 cm). El agua salina, se esteriliza, se oxigena por 15 min. Previo a la colocación de los huevecillos. Se agregaron 0.1 g

de huevecillos por cada litro de agua de mar artificial. Se mantuvo la aireación constante, la temperatura de 28°C y el pH de 8 durante el tiempo de incubación para garantizar la oclusión de los crustáceos (48h) (Figura 25). Para la determinación de la CL50, se organizaron grupos con 10 nauplius y por triplicado para cada uno de ellos. Se incubaron por 24 Horas. Finalizado el tiempo se contaron los sobrevivientes. Con los datos obtenidos se realizaron las gráficas correspondientes para cada muestra y se determinó la CL50, usando el método de Reed-Muench para el análisis de los datos obtenidos, el cual consiste en contabilizar el número de crustáceos vivos y muertos en todas las dosis. Se obtiene la distribución de la frecuencia de los valores, en donde la media de esta distribución es la concentración letal media (González, 2001).



Figura 25. Equipo para la eclosión de los huevos de *A. salina* (Bustamante, 2012).

- a) Una vez que se tienen a las *A. salina* se forman 6 grupos y cada uno con 10-20 *artemias* por triplicado, y se colocaron en un vial (Figura 26).

GRUPO I Agua Milli Q

GRUPO II Agua de mar artificial (agua artificial)

GRUPO III Agua artificial (90%) más el extracto concentración 1 ppm (10%)

GRUPO IV Agua artificial (90%) más el extracto concentración 10 ppm (10%)

GRUPO V Agua artificial (90%) más el extracto concentración 100 ppm (10%)

GRUPO VI Agua artificial (90%) más el extracto concentración 1000 ppm (10%)

- b) Se incubaron por 24 horas. Finalizado el tiempo se contaron el número de sobrevivientes. Con los datos obtenidos se realizaron las gráficas correspondientes para cada muestra y se determinó la CL50, usando el método de Reed-Muench.

El método de Reed-Muench se sustenta en el principio de que, cualquier sujeto que responda a una dosis dada por un agente responderá a cualquier dosis que sea más alta que esa primera; y que cualquier sujeto que no responda a una dosis dada no responderá a una que sea más baja que esa. El objetivo final de este método es calcular la CL50 (concentración letal que afecte al 50% de los expuestos). Es un método estadístico en donde el punto final se determina por interpolación, a partir de las frecuencias acumuladas de respuestas positivas y negativas.

Para realizar el grafico se tiene que hacer la acumulación de respuestas positivas, sumar desde la dilución más alta a la más baja y la acumulación de respuestas negativas, sumar desde la dilución más baja a la más alta

Obtener la proporción de respuestas positivas sobre respuestas negativas y el % de respuestas positivas a partir de los totales acumulados. Por último se grafica las respuestas positivas y negativas acumuladas en función del Log_{10} de la concentración, se interpola el 50% y se obtiene el dato (Instituto de virología, 2013)

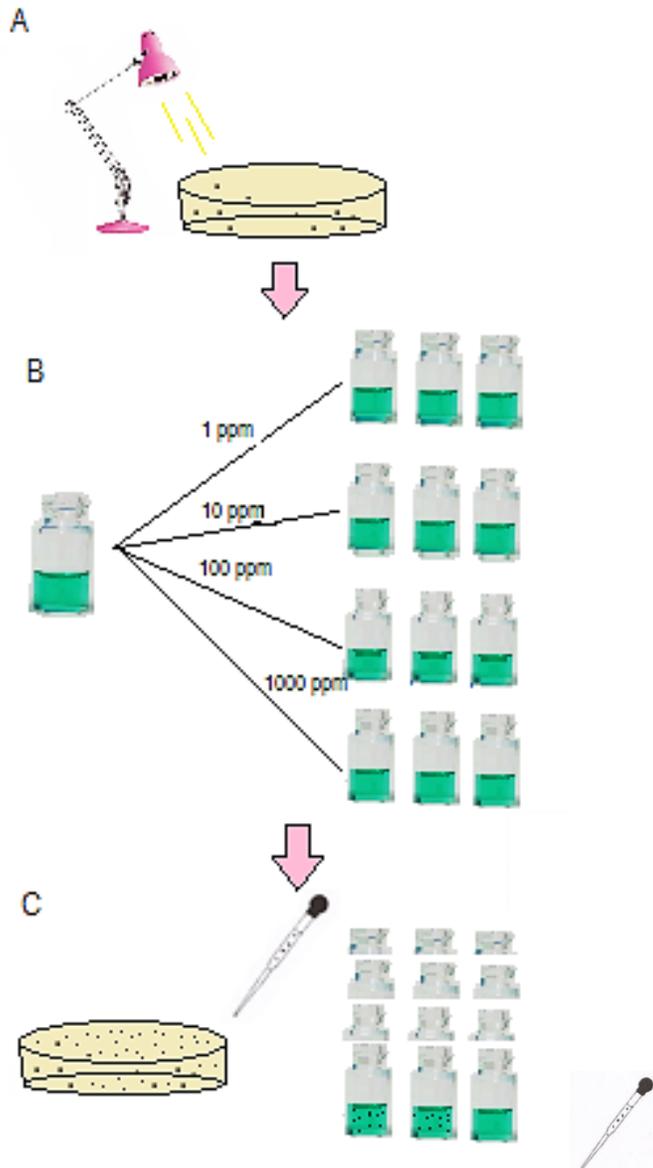


Figura 26. Esquema para determinar la CL50. (A) representa la eclosión de las artemias. (B) Las diluciones para tener los viales a diferentes concentración y (C) conteo de 1020 *artemias* para cada vial.

6.2.3. Efecto gastroprotector

Para este procedimiento se trabajó con 7 grupos, cada uno con 3 ratas.

Grupo I	Solución salina (SS)
Grupo II	SS más etanol (ETOH)
Grupo III	Pepto bismol (PEPTO)
Grupo IV	PEPTO más ETOH

Grupo V	Ácido cítrico (CIT)
Grupo VI	CIT más ETOH
Grupo VII	Extracto de las hojas de zarzamora (ZARZA)

- Se pesó y se marcó a las ratas.
- Se les administró por vía oral un mililitro de la sustancia o extracto correspondiente.
- Después de una hora se les administró un mililitro de ETOH al grupo correspondiente.
- Después de una hora se sacrificó a las ratas y se obtuvo su estómago para su evaluación posterior.

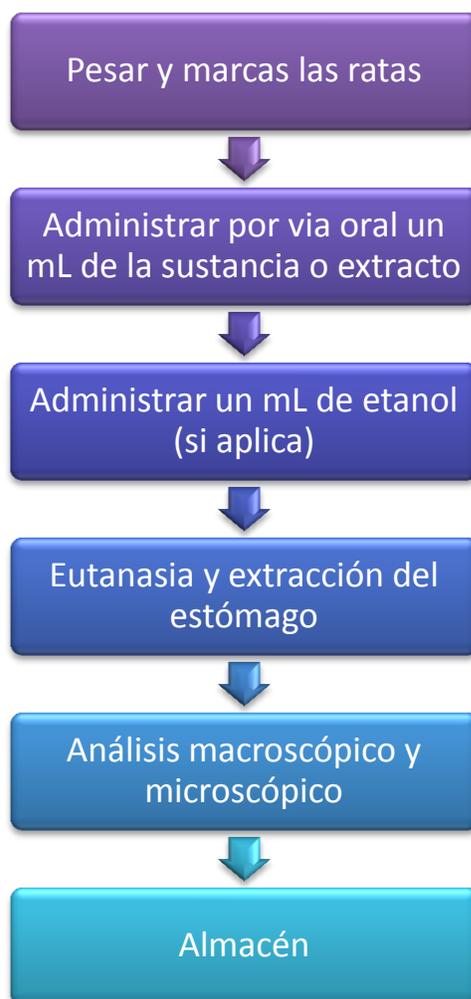


Figura 27 Diagrama de flujo 2. Determinación del efecto gastroprotector

6.2.4. Evaluación del extracto para el tratamiento de gastritis aguda.



Se trabajó con 4 grupo los cuales cada uno presentaba 6 ratas. Los grupos con los que se trabajó fueron.

- Grupo I ETOH
- Grupo II ETOH mas PEPTO
- Grupo III ETOH mas AC
- Grupo IV ETOH mas el extracto de las hojas de zarzamora (ZARZA)

- a) Se pesó y marcó a las ratas.
- b) Se les administró por vía oral un mililitro de ETOH a todos los grupos.
- c) Después de una hora se les administró un mililitro de la sustancia o extracto correspondiente.
- d) Una vez transcurrido un día se sacrificó a una rata de cada grupo y se extrajo el estómago para su evaluación posterior y a las ratas restantes se les administró un mililitro de la sustancia o extracto correspondiente; Esto se repitió hasta que el estómago se recuperara por completo o se sacrificara a la última rata del grupo.



Figura 28. Diagrama de flujo 3. Evaluación del extracto de hojas de zarzamora para el tratamiento de la gastritis aguda

6.2.4.1 Evaluación de las lesiones de los estómagos

6.2.4.1.1 Análisis macroscópico

Una vez que se obtuvieron los estómagos tanto de la administración aguda como crónica, la evaluación posterior que se realizó fue la medición de la úlcera, por medio de métodos cuantitativos no sistemáticos: el número de lesiones y el índice de úlcera (UI), donde se multiplicó el largo por el ancho, obteniendo así el área de las mismas, las cuales se graficaron.

Y por último se obtuvo el porcentaje de inhibición (I%) de la administración aguda el cual se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$I\% = \left(\frac{UI_{EtOH} - UI_{Trat}}{UI_{EtOH}} \right) \times 100$$

En donde

UI_{EtOH} = índice de úlcera del tratamiento con etanol

UI_{Trat} = índice de úlcera del tratamiento con PEPTO, CIT O ZARZA

6.2.4.1.2 Análisis microscópico

Una vez obtenido los datos se realizaron los cortes histológicos de cada estómago, para de esta manera obtener los resultados microscópicos (Ver Anexo 1) y aplicar la escala de medición por Morini G y Grandi D.

6.2.5 Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de ANADEVIA de una vía o Kruskal-Wallis, en el caso donde se encontraron diferencias significativas con $p < 0.05$, se utilizó una prueba post-hoc (Dunnet), Se grafica los resultados obtenidos del número de lesiones y área de las lesiones en el programa Sigma plot, versión 11.0, Sigma Stat 3.5.

7. RESULTADOS

7.1 Resultados de la determinación de la CL50

En la Figura 29, se observa la relación entre las frecuencias acumuladas de los crustáceos de *Artemia salina* muertos con respecto a los vivos. Se obtuvo la CL50 para el extracto acuoso de zarzamora de 251 ppm.

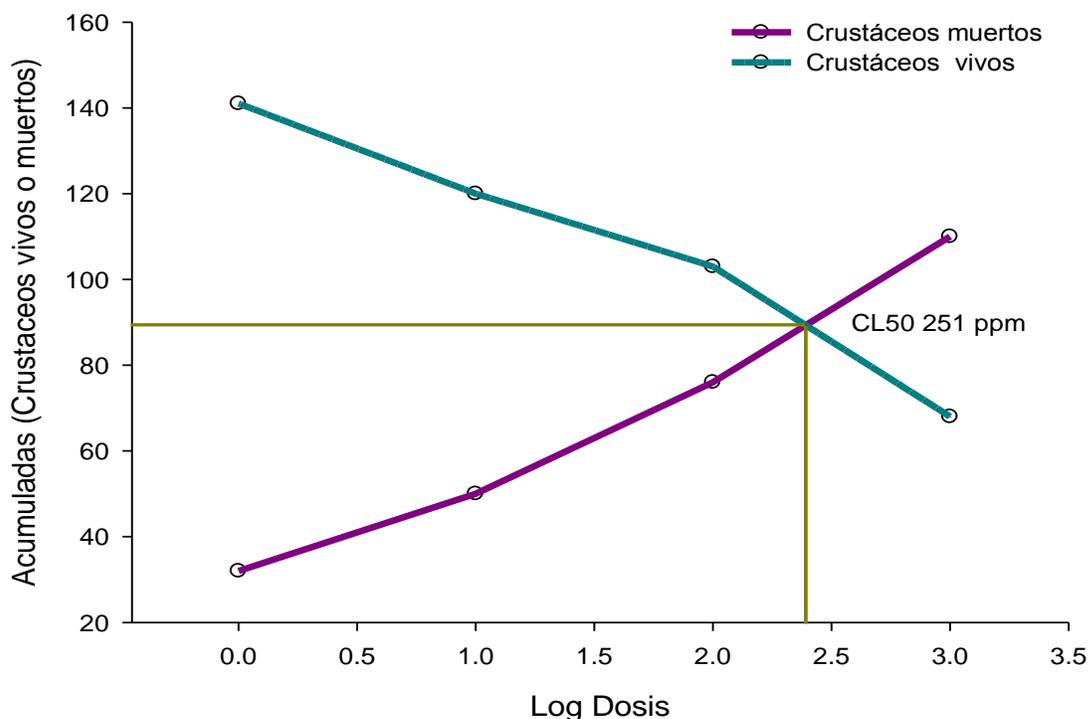


Figura 29. Gráfico para determinar la CL50 del extracto de las hojas de zarzamora. Frecuencia acumulada de crustáceos de *Artemia salina* muertos vs vivos con respecto al logaritmo de la concentración del extracto acuoso de las hojas de zarzamora.

7.2 Resultados del estudio agudo (gastroprotector)

7.2.1 Resultados macroscópicos.

A continuación se describen los resultados obtenidos en las diferentes fases experimentales.

En la Figura 30, se muestra el promedio del área de las lesiones (cm^2) \pm E.S. (panel A) y el promedio del número de lesiones \pm E.S. (panel B) para el etanol

(ETOH), subsalicilato de bismuto (PEPTO) y ácido cítrico (CIT) como controles positivos y el extracto acuoso de *Rubus fruticosus* (ZARZA), con relación al panel superior podemos observar que para el extracto y los controles positivos existe una disminución del área lesionada con respecto al etanol, obteniéndose diferencias significativas a $p < 0.05$ $F = 8.35$. Así mismo en el panel B se observa esta misma tendencia de disminución pero en este caso referente al número de lesiones ($p < 0.05$, $F = 23.0$).

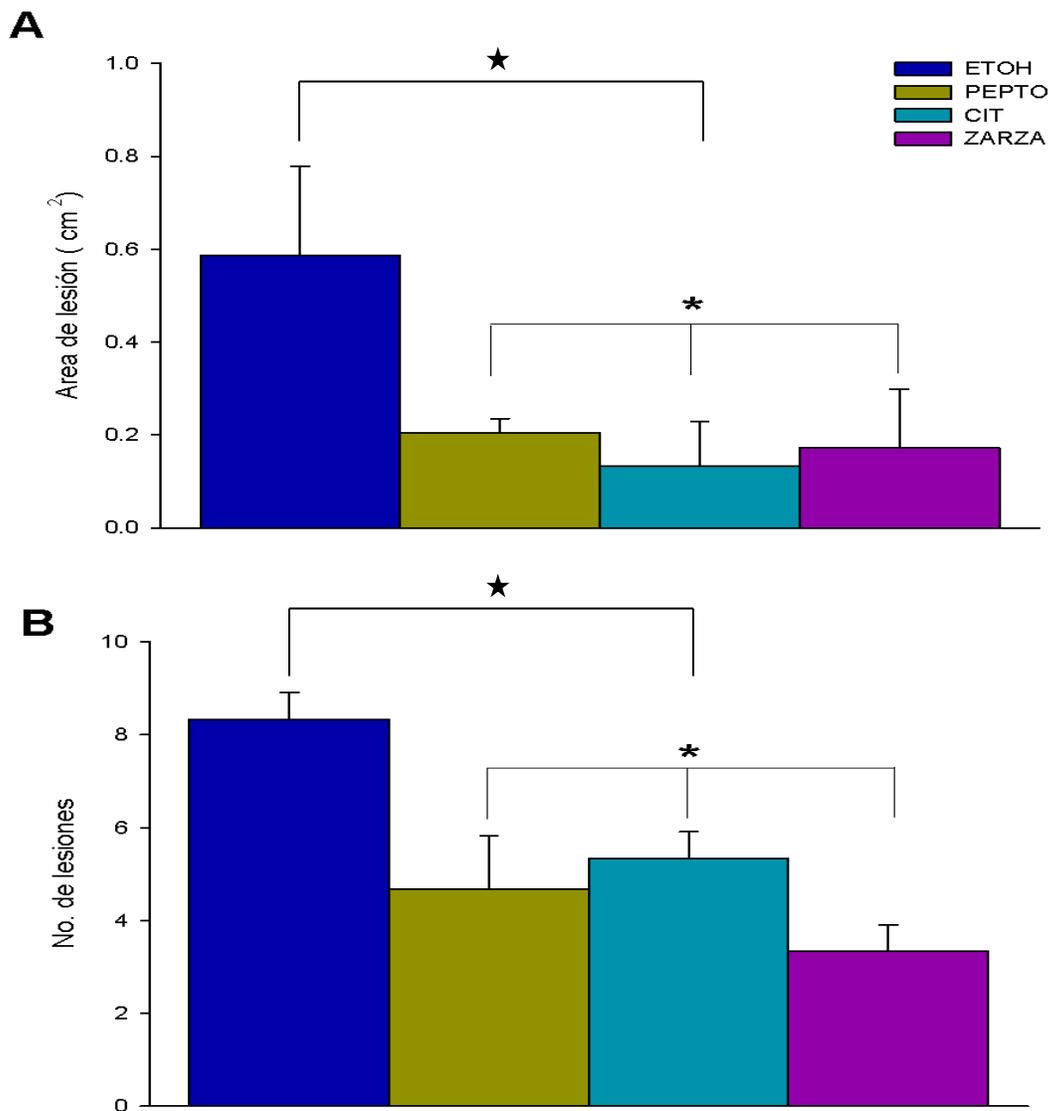


Figura 30. Evaluación del efecto gastroprotector, estudio agudo. Promedio del área lesionada \pm E.S. panel (A) y el promedio del número de lesiones que se observaron en cada uno de los estómagos \pm E.S. (panel B). Donde PEPTO= subsalicilato de

bismuto, CIT=ácido cítrico y ZARZA=extracto acuoso de *Rubus fruticosus*. *p<0.05

En cuanto a los resultados del porcentaje de Inhibición del análisis macroscópico tenemos que tanto los grupos tratados con el pepto como con el extracto acuoso de hojas de zarzamora previa administración del etanol, tienen el mismo porcentaje de inhibición (65%), siendo mayor con el ácido cítrico (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de Inhibición (I%)

Tratamiento	N	UI (mm2)	(%)I	Peso de rata (g)
Control SSI	3	0	-	320.23
PEPTO	3	0	-	314.73
CIT	3	0	-	302.27
ETOH	3	0.586	0	346.63
PEPTO + ETOH	3	0.205	65	271.66
CIT. +ETOH	3	0.132	77	293.06
ZARZA + ETOH	3	0.205	65	277.67

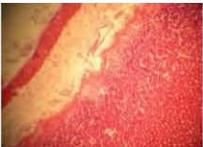
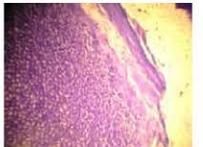
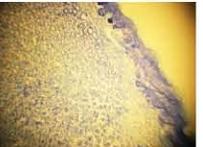
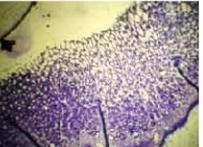
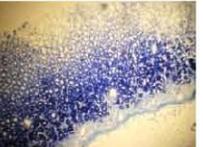
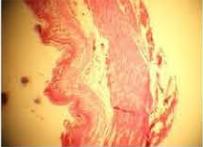
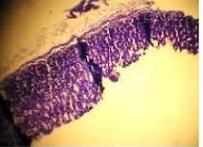
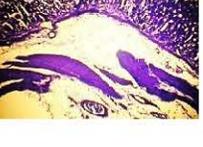
Sin % de inhibición, controles íntegros, sin administración de ETOH.

7.2.2 Resultados microscópicos

En la Tabla 6 se muestra en la primera columna la estructura macroscópica del estómago después de los tratamientos, en donde se observa que el control integro (SS) presenta la morfología típica de un estómago sano; cuando se realiza la administración de etanol (ETOH) se observa que produce lesiones características en la mucosa gástrica, como ulceración hemorragias y pérdida de solución de continuidad, en relación con PEPTO (pepto bismol™) y CIT (ácido cítrico), no se aprecian hay lesiones aparentes, en los grupos previamente tratados con etanol, se observan lesiones las cuales son menores en cuanto a tamaño y número. Las lesiones fueron clasificadas de acuerdo a la escala de medición por Morini G y Grandi D* (Ancheta y Guzmán, 2011). En las siguientes columnas se muestran las fotografías de los cortes histológicos que se realizaron a cada estómago y fueron teñidos con las tinciones de hematoxilina-eosina (HyE), violeta de cresilo y azul de toluidina respectivamente y en la última columna se encuentra la descripción de las lesiones que presenta cada estómago.



Tabla 6. Evaluación microscópica del efecto gastroprotector del extracto acuoso de las hojas zarzamora, estudio agudo.

Grupo	Estómago	Clasificación (Grado)	Cortes histológicos			Descripción
			HyE	Violeta	Azul	
SS		0				la estructura se encuentra sin ninguna lesion.
ETOH		4				las tres capas del estómago se encontrarán dañadas junto con las celulas
PEPTO		0				Las tres capas se encuentran en perfectas condiciones
PEPTO + ETOH		1				El epitelio o superficie luminal se encuentran parcialmente dañadas
AC		0				No se observa ninguna lesion
AC + ETOH		2				El epitelio y la lamina propia presentan severos daños al igual que las celulas
ZARZA+ ETOH		1				Las celulas del epitelio se encuentran parcialmente dañadas

7.3 Resultados del estudio crónico.

7.3.1 Resultados macroscópicos

En la siguiente Figura (31), se muestran los resultados tras la administración crónica de los tratamientos, en donde en el panel A, se graficó el promedio del área de lesión, \pm E.S., observándose diferencias significativas a $p < 0.05$ ($H=31.58$) y en el panel B, el promedio del número de lesiones en función del tiempo \pm E.S.; $p < 0.05$, $H=83.00$. En ambos gráficos se observa diferencias estadísticamente significativas de los tratamientos con respecto al control con ETOH, donde disminuye en función del tiempo, tanto el área como el número de lesiones, tal resultado se aprecia con los grupos tratados con el ácido cítrico (CIT) y del extracto acuoso de las hojas de zarzamora (ZARZA), al segundo día.

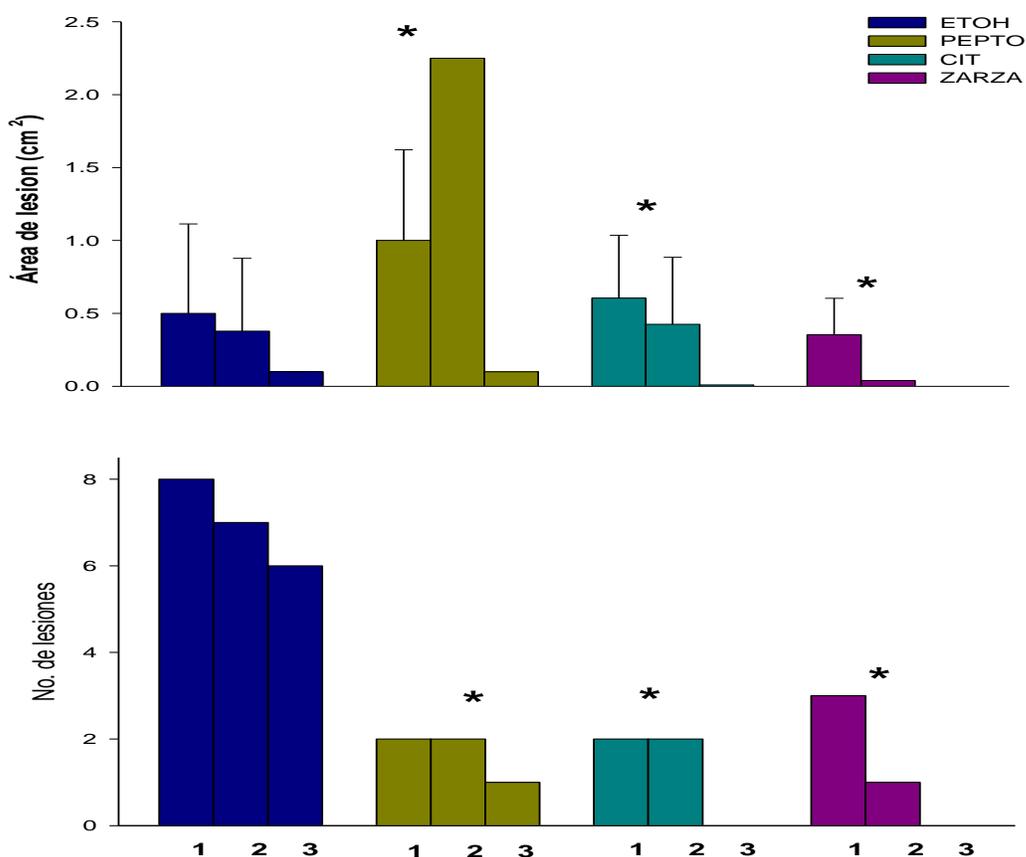
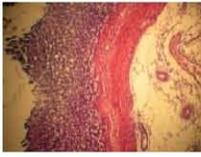
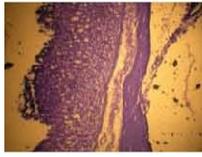
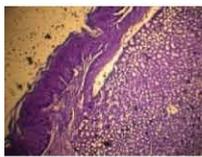
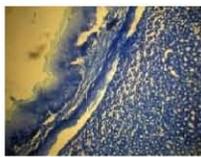
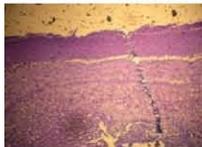


Figura 31. . Evaluación del efecto gastroprotector, estudio crónico. Promedio del área lesionada \pm E.S. panel (A) y el promedio del número de lesiones que se observaron en cada uno de los estómagos \pm E.S. (panel B). Donde PEPTO= subsalicilato de bismuto, CIT=ácido cítrico y ZARZA=extracto acuoso de *Rubus fruticosus*. * $p < 0.05$

7.3.2 Resultados microscópicos estudio crónico

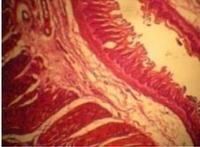
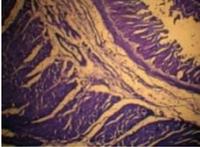
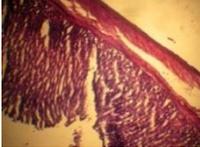
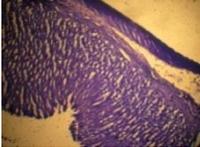
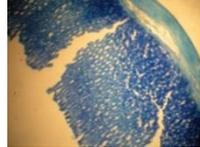
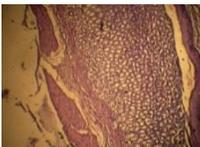
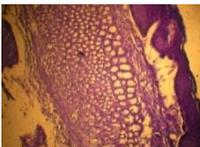
En la Tabla 7 se muestra en la primera columna la estructura macroscópica del estómago después de los tratamientos crónicos tras la previa administración de etanol en función del tiempo, en donde se observa que en todos los grupos las muestras iniciales independientemente del tratamiento muestran lesiones considerables en mayor o menor grado de acuerdo a la clasificación dada por la escala de medición por Morini G y Grandi D* (Ancheta y Guzmán, 2011), y en relación a el tiempo de administración las lesiones disminuyen observándose mejores efectos con el extracto de las hojas de zarzamora y ácido cítrico, en la columna tres se observa la clasificación. En las siguientes columnas se muestran las fotografías de los cortes histológicos que se realizaron a cada estómago y fueron teñidos con las tinciones de hematoxilina-eosina (HyE), violeta de cresilo y azul de toluidina respectivamente y en la última columna se encuentra la descripción de las lesiones de cada uno de los estómagos.

Tabla 7. Evaluación microscópica del efecto gastroprotector del extracto acuoso de las hojas de zarzamora, estudio crónico.

Tratamiento	Día	Estómago	Clasificación (Grado)	Cortes histológicos			Descripción
				Eosina	Violeta	Azul	
ETOH + SS	1		4				Las células de las tres capas del estómago se encuentran totalmente dañadas
	3		2				La submucosa presenta una regeneración celular pero las capas exteriores no
ETOH + PEPTO	1		2				Las células de la mucosa como del epitelio se encuentran dañadas
	2		1				Las células de la mucosa presentan una regeneración mientras que la del epitelio siguen dañadas
	3		1				Las células de la mucosa se encuentran en perfectas condiciones pero las del epitelio no

Continúa....



Tratamiento	Día	Estómago	Clasificación (Grado)	Cortes histológicos			Descripción
				Eosina	Violeta	Azul	
ETOH + CIT	1		3				Las células del epitelio, mucosa y submucosa se encuentran dañadas
	2		2				Las células del epitelio están dañadas pero las de la mucosa se están regenerando
ETOH + ZARZA	1		2				Las células del epitelio están dañadas y de la mucosa solo una parte
	2		1				Las células de la mucosa se están regenerando y las del epitelio están dañadas
	3		1				Las células del epitelio se encuentran levemente dañadas

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El parámetro de concentración letal media (251ppm) obtenida mediante el bioensayo con *Artemia salina* del extracto acuoso de las hojas de zarzamora (*Rubus fruticosus*) nos indica que es un compuesto bioactivo debido a que el resultado que se obtuvo fue menor a 1000 ppm o $\mu\text{g/mL}$, al saber esto se pudo seguir con el protocolo para evaluar el efecto gastroprotector (estudio agudo) como el estudio crónico, además el dato que se obtuvo también nos indica que es un compuesto que se considera moderadamente toxico debido a que se encuentra en el rango de 100-500 ppm según la clasificación de CYTED (Sanchez y Neira 2006).

Con base a los resultados macroscópicos obtenidos del efecto gastroprotector (estudio agudo) y del estudio crónico se encontró que existe una diferencia significativa entre los tres tratamientos (PEPTO, CIT Y ZARZA) con respecto al control que fue el ETOH en relación al número de lesiones como al área de las lesiones causadas por la inducción de la úlcera mediante un método químico, que fue la administración oral de ETOH absoluto.

En cuanto al área de las lesiones en el estudio agudo se puede ver que es menor el del tratamiento con CIT comparado con los otros dos tratamientos pero el número de las lesiones es menor con el tratamiento de la ZARZA. Por lo tanto ambos tratamiento (CIT y ZARZA) son una buena opción como un tratamiento alternativo para disminuir el número o área de las lesiones.

En lo que respecta al estudio crónico tenemos que con los tres tratamientos las áreas como el número de las lesiones disminuyen con el paso del tiempo, dicho cambio es significativo comparado con el control que es el ETOH, pero solo 2 tratamientos (CIT y ZARZA) son los más eficientes y eficaces, ya que al tercer día

no presentan ningún tipo de lesión, en cambio las ratas que fueron sometidas al tratamiento con PEPTO al tercer día todavía presentaban lesiones. Los tratamientos que dieron buenos resultados presentan una similitud, que es el ácido cítrico, ya que un tratamiento es solo ácido cítrico y el otro tratamiento fue con el extracto de las hojas de zarzamora en el cual uno de sus componentes es el ácido cítrico con la única diferencia que es que la proporción en la que se encuentra el componente, es menor en el extracto.

Sin embargo el estudio agudo a nivel microscópico según la clasificación de Morini G y Grandi D, el tratamiento de ZARZA y de PEPTO obtuvieron el grado más bajo debido a que solo presentaban daño el epitelio o superficie luminal. En lo que respecta al estudio crónico, se observó en los cortes histológicos que el mejor tratamiento fue con ZARZA, ya que los resultados del primer día obtuvieron una clasificación de grado dos debido a que presentaba daño severo la superficie luminal y de la mucosa pequeñas lesiones, al tercer día se le dio el grado de uno porque existían todavía pequeñas lesiones en la parte del epitelio. Por lo tanto el extracto de hojas de zarzamora presenta resultados relevantes por lo que pudiera ser una alternativa de uso como preventivo, teniendo mejor efecto gastroprotector el CIT, no obstante el extracto acuoso de las hojas de zarzamora protege considerablemente la mucosa gástrica mucho mejor que el PEPTO. Estas diferencias se deben principalmente a la composición y principios activos que presentan.

En el caso de PEPTO el principio activo es el subsalicilato de bismuto el cual presenta un efecto citoprotector debido a que cubre la base de la úlcera, absorbe la pepsina, aumenta la síntesis de prostaglandinas locales y estimula la secreción de bicarbonato. Además tiene acción sobre *H. pylori*, inhibiendo su adherencia a la mucosa y a sus enzimas proteolíticas (Ferrer, 2007).

Con respecto al CIT, este presenta un pH de 2.2 el cual al estar en contacto con las glándulas del sistema de regulación del pH se manda la señal de que no se produzca drásticamente una gran cantidad de HCl, por lo que de esta manera ya no se lesiona más el estómago y también se da la señal que se produzca el moco para la protección, dando como respuesta el efecto gastroprotector (Witchyl, 2004).

En cuanto a la ZARZA, dentro de los componentes principales que pudieran estar protegiendo la mucosa son el ácido cítrico e isocitrico, flavonoides, antocianinas, taninos. Debido a que los flavonoides actúan como protectores de úlceras gástricas e inflamación, ya que presentan una gran capacidad antioxidante, por eso es que el efecto gastroprotector aumento, comparado con los otros dos controles (PEPTO y CIT). En lo que respecta al estudio crónico, los flavonoides ayudaron debido a presentan un efecto antiinflamatorio y antihemorrágico, esto fue de gran ayuda ya que la mayoría de las úlceras se presenta hemorragia, por lo que este componente nos ayuda a controlar y/o evitarlas, además de que presentan la ventaja de ser hidro y liposolubles por lo que pueden atravesar fácilmente la membrana celular (Ancheta y Guzmán, 2011). Otro efecto farmacológico que tienen los flavonoides es que son vasodilatadores, entonces como consecuencia el flujo sanguíneo aumenta, por lo que constituye un importante mecanismo protector del estímulo ácido, ya que transporta la sangre rica en oxígeno y las sustancias, como las prostaglandinas y los otros componentes del extracto, impidiendo la perpetuación de la secreción ácida. Igualmente, impiden la hipoxia local que podría favorecer el mal funcionamiento de mecanismos defensores locales como, por ejemplo, la renovación celular (Rodríguez y otros 2010). Con respecto a las antocianinas estos son otros compuesto que presentan actividad antioxidante, por lo que genera un efecto terapéutico de antiinflamatorio, de esta manera ayuda a que el extracto tenga un mayor efecto gastroprotector y también es otro componente útil para el tratamiento, ya que se sabe que las persona que padecen de gastritis presentan

inflamación (Aguilera y Reza, 2011). Y por último los taninos, son metabolitos secundarios de las plantas, el cual presenta un efecto terapéutico como antiinflamatorio específico de la mucosa gástrica, por lo que es un componente del extracto que ayuda a evitar la inflamación además de que posee otro efecto el cual es antihemorrágico que como se mencionó anteriormente, se presentan hemorragias cuando se padece de gastritis o úlceras (Quiroz 2007). Debido a que los componentes que son agentes antioxidantes no los sintetiza el cuerpo humano, se debe de adquirir por medio de la dieta, el cual una decocción de las hojas de zarzamora nos proporcionará estos componentes por lo que nos ayudará a prevenir la gastritis y si ya se padece esta, entonces será una alternativa del tratamiento para mejorar esta enfermedad y posiblemente hasta curarla.

9. CONCLUSION

El extracto acuoso de las hojas de zarzamora (*Rubus fruticosus*) es un compuesto natural bioactivo, el cual presenta una concentración letal media de 251 ppm que fue obtenido por el método de Reed Muench. Este extracto acuoso (*Rubus fruticosus*) demuestra un efecto gastroprotector además de que se puede usar como tratamiento alterno para las personas que padecen de gastritis, debido a los componentes que se extrajeron.

10. BIBLIOGRAFIA

Aguilera , Miguel, y Maria del Carmen Reza. «Propiedades funcionales de las antocianinas.» *BIOtecnia* XIII, nº 2 (2011): 16-22.

Álvarez Sánchez, A., y M. Díaz Rubio. Trastornos motores del aparato digestivo. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2007.

Ancheta, Julio, y Maria Guzmán. Efecto citoprotector del extracto acuoso de hojas de *Bixa orellana* (*achiote*) en úlceras gástricas inducidas por indometacina en un modelo de ratones, Tesis para obtener el título de doctor en medicina. Universidad "DR. José Matías Delgado", Facultad de Ciencias de la Salud, 2011.

Araneda, Patricia, Andrea Avalos, Johana Bolados, y Osciel Olmos. Sistema digestivo. Facultad de Humanidades Universidad de La Serena. 7 de Julio de 2010. <http://digestivo-psicobiolo.blogspot.mx/2010/07/esquemas-secrecion.html> (último acceso: 18 de Junio de 2013).

Asociación Española para la Cultura, el Arte y la Educación. *Natureduca*. s.f. http://www.natureduca.com/med_espec_zarza.php (último acceso: 3 de Marzo de 2013).

Bustamante, Ruth. Cernimiento neurofarmacológico de dos análogos de la melatonina en ratón de la cepa *CD1*, tesis para obtener el grado de doctorado. México: Instituto Politécnico Nacional, 2012.

Casco Rosero, Jesica Pahola. Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto crudo de papa (*Solanum tuberosum*) en úlceras de estómago inducidas con etanol en ratas (*Rattus norvegicus*), tesis para obtener el título de Bioquímico Farmacéutico. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias , 2011.

Cilleruelo Pascual, María Luz, y Sonia Fernández Fernández. Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAEP. Madrid: Asociacion Española de pediatría, 2002.



Cordova Villalobos, José Ángel, y Antonio De la Torre Bravo. Procedimientos endoscópicos en gastroenterología. 2. México: Editorial Médica Panamericana, 2009.

Corpus Center. *Corpus Center*. s.f. <http://www.laparoscopia.com.br/fisiologia.htm> (último acceso: 18 de Junio de 2013).

Cortés Cabrera , Juriana. Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento de cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo, tesis para obtener el título de Licenciado en Biología. Pachuca de Soto, Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2005.

Delgado, Antonio, Cristina Minguillon, y Jesus Joglar . Introducción a la química terapéutica. 2. Madrid: Diaz de Santos, 2004.

Dr. Firman, Guillermo. «Medicalcriteria.» Editado por Facultad de Medicina Universidad Nacional del Noroeste. 16 de Diciembre de 2011. http://www.medicalcriteria.com/site/index.php?option=com_content&view=article&id=253%3Agassm&catid=54%3Agastroenterology&Itemid=80&lang=es (último acceso: 7 de Septiembre de 2013).

Dra. Almajano, María Pilar. «Determinación de la actividad antioxidante de las bayas de goji.» Editado por Consorci Escola Industrial de Barcelona. Septiembre de 2009.

Dra. Mata, Rachel. Manual de farmacognosia. México: UNAM, Facultad de Química, 2012.

EducaMadrid, Plataforma tecnológica. *Mediateca.educa.madrid.org*. s.f. http://mediateca.educa.madrid.org/imagen/ver.php?id_imagen=irec5f19aaf8f83f (último acceso: 7 de Septiembre de 2013).

El Dioscórides renovado. Plantas medicinales. México: Peninsula, 1999.



Facilísimo Interactive. Infecciones intestinales. s.f.
<http://salud.facilissimo.com/infecciones-intestinales> (último acceso: 7 de Septiembre de 2013).

Facultad de Biología, Universidad de Vigo. Atlas de histología vegetal y animal. 27 de Abril de 2009. <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/1-introduccion.php>.

Fernández, Pedro, Lorenzo Velázquez, Alfonso Moreno González, Ignacio Lizasoain Hernández, Juan Carlos Leza Cerro, y María Ángeles Moro Sánchez. Farmacología básica y clínica. 18. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2008.

Ferrer Martín, María José. Prescripción de antiulceros en Granada en el periodo de 2000-2005 y efecto de la autorización de especialidades farmacéuticas, de los precio de referencia y de los precios máximos en los medicamentos, tesis para obtener el título de doctor. Editado por Editorial de la Universidad de Granada. Granada: Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, 2007.

Finn Geneser. Atlas de color histología. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 1998.

Garnica, Yenny. Efecto de la infección por *H. Pylori* en los niveles de hierro, ghrelina y leptina, tesis para obter el título de Bacterióloga. Bogota: Pontifica Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, 2009.

González, Frank. Úlcera gástrica. 19 de Mayo de 2013.
<http://radiounavidadiferente.blogspot.mx/2013/05/que-es-la-ulcera-gastrica.html> (último acceso: 18 de Junio de 2013).

González, Georgina, y Cristina Herrera. Estudio preliminar para determinar el posible efecto gastroprotector del extracto acuoso de *Actinidia deliciosa* y *Citrus limonum* Risso en ratas hembra cepa *Wistar*, tesis para obtener el

título de Química Farmacéutica Bióloga. México: UNAM, Facultad de Química, 2006.

Gorriti, Arillmi, y Rosa Zárate. «Bioensayos en especies con actividad terapéutica.» *Ciencia e investigación* 1, nº 2 (Diciembre 1998).

Gutiérrez, María Esther. Genotipificación de los Polimorfismos +3954 (C/T) y -511(C/T) del gen IL1B, tesis para obtener el grado de maestría en Ciencia de la Salud. México: Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Medicina, 2011.

Guyton, Arhur C, y John Hall. *Fisiología Médica*. España: Elsevier, 2012.

Hernández Garcés, Héctor. *Manual de endoscopia digestiva superior diagnóstica*. Cuba: Ciencias Médicas, 2008.

Huamán, Oscar, Miguel Sandoval, Inés Arnao, y Elsa Béjar. «Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* (achiote) en ratas.» *Redalyc* (Anales de la Facultad de Medicina) 70, nº 2 (2009): 97-102.

Instituto de virología. «Curso de técnicas de diagnóstico en virología animal.» (Universidad el Salvador, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) 2013.

Jerry, L., y McLaughlin. «The use of biological assays to evaluate botanicals.» *Drug Information Journal* 32 (1998): 513-524.

Lars Olbe, Enar Carlsson, Per Lindberg. *Nature reviews, drug discovery*. Febrero de 2003. http://www.nature.com/nrd/journal/v2/n2/fig_tab/nrd1010_F2.html (último acceso: 18 de Junio de 2013).

Latarjet, Michel, y Alfredo Ruiz Liard. *Anatomía Humana*. 4. Vol. 2. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2008.

López Lizarraga, Miguel Ángel. Fisiología médica. Facultad de Medicina UAS, 2013.

Luis, Rodrigo. Tratamiento de las enfermedades digestivas. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2008.

Marín, Lucian. The Journalist . Editado por EC-JPR. 15 de Octubre de 2008. <http://perarduaadastra.eu/2008/10/cafeina/> (último acceso: 18 de Septiembre de 2013).

Martínez Domínguez, Maritza, Roberto Reyes Oliva , Gustavo Guerrero Jiménez, y Alfredo Arredondo Bruce . «Nuevos conceptos fisiológicos de la enfermedad ácido péptica.» Archivo Médico de Camagüey 14, nº 3 (Mayo-Junio 2010): 1-13.

Megías Pacheco, Manuel, Pilar Molist García, y Manuel Ángel Pombal Diego. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Facultad de Biología, España Universidad de Vigo. 2013. <http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html> (último acceso: 2013 de Septiembre de 7).

Méndez, Nahum, y Misael Uribe. Gastroenterología. McGraw Hill, 2005.

Merck millipore. *Merck millipore.* s.f. www.merckmillipore.com/.../ViewProductDocuments-File (último acceso: 19 de Junio de 2013).

Montalvo Arenas, Eduardo Cesar. Técnica histológica. México, D.F.: UNAM, Facultad de Medicina, 2010.

Muniz, Pablo, Ernesto Brugnoli, y Silvana Masciadri. «Base de datos de Invasiones Biológicas para Uruguay.» Editado por Facultad de Ciencias Universidad de la Republica. Abril de 2011. <http://inbuy.fcien.edu.uy> (último acceso: 24 de Marzo de 2013).

Navarro, Andrea. «Anatomía quirúrgica del estómago y duodeno.» Cirugía Digestiva, F. Galindo, 2009: 1-22.



Nelsbach, John. *RELIEF*. 2006. <http://vivirsinnicotina.es/curiosidades.html> (último acceso: 18 de Junio de 2013).

Perez Cifuentes , Karen . Comparación de la actividad biológica de 10 extractos vegetales y 5 fármacos utilizando tres bioensayos toxicológicos, tesis para obtener el título de Química Farmacéutica. Editado por Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala: Universida de San Carlos de Guatemala, 2003.

Plantas medicinales. Plantas que curan. 2010. <http://www.plantasquecuran.com/plantas-medicinales/zarzamora.html> (último acceso: 20 de Marzo de 2013).

Quezada, Abraham. Introducción al manejo de animales de laboratorio: roedores y pequeñas especies. México: Universidad Autonoma de Yucatan, 1997.

Quiroz, Jessica. Fenoles naturales. Ecuador: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, 2007.

Rodríguez Durán, Luis V., Blanca Valdivia Urdiales, Juan C. Contreras Esquivel, Raúl Rodríguez Herrera, y Cristobal N. Aguilar. «Química y Biotecnología de la Tanasa.» Editado por Universidad Autónoma de Coahuila. *AQM (Acta Química Mexicana)* 2, nº 4 (2010): 1-10.

Rodriguez Palomo, David. «Actualización de la fisiología gástrica.» *Medicina Legal de Costa Rica* 27, nº 2 (Septiembre 2010): 59-68.

Rodríguez, M.V., SH Guzmán, E Andrade, y D Hernández. «Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de jugo obtenido mediante tratamiento enzimático en zarzamora comercial (*Rubus spp*) del estado de Michoacán.» *XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de alimentos*. Guanajuato: Univesidad de Guanajuato y UANL, 2010.

Sánchez Garay, Martina. «Panorama epidemiológico de las úlceras, gastritis y duodenitis en México, periodo 2003-2008.» Anuario epidemiológico (Secretaría de Salud) 27, nº 28 (Mayo 2010): 1-4.

Sanchez, Lizbeth, y Adriana Neira. «Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanolico de *Psidium guajava* L. y *Psidium guineense*. SW.» Cultura científica (Fundación Universitaria Juan de Castellanos), 2006: 40-45.

Sistemas de nutrición. s.f.
http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/capitulo_12.htm (último acceso: 18 de Junio de 2013).

Soybel, David . «Anatomía y fisiología del estómago.» Clínicas Quirúrgicas de Norteamérica (Elsevier Saunders) 85 (2005): 875-894.

Toso, R.E., M.S. Toribio, P. Mengelle, y M.A. Boeris. «Plantas de la provincia de la Pampa, Argentina, con actividad gastroprotectora y antiespasmódica.» *Scielo* 9, nº 1 (Diciembre 2007).

Universidad catolica de CVYO. Fisiologia UCC, subcede San Luis, Argentina. s.f.
<https://sites.google.com/site/fisiologiaucc/%20aparato-digestivo> (último acceso: 31 de Marzo de 2013).

Universidad de Ciencias Veterinarias, FCV UBA. Atlas digital de anatomia para el bioterio. Editado por Veronica Risso, Aldana Ureña, & Miriam Mendoza. Junio de 2009. (último acceso: 18 de Noviembre de 2013).

Vanaclocha, Bernat, y Salvador Cañigüeral. Fitoterapia. Vademecum de prescripción. 4. Editado por Bernat Vanaclocha. Barcelona: Masson, 2006.

Waldman, Scott A, y Andre Terzic. Farmacologia y terapéutica. Principios para la práctica. México: El manual moderno, 2010.

Witchyl, Max. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. A Handbook for practice on a Scientific basic. 3. California: Medpharm scientific publishers Stuttgart, 2004.



ANEXO I

La técnica histológica es un conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico (animal o vegetal) con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través de los microscopios fotónicos y electrónicos (Montalvo Arenas, 2010).

Procedimientos mediatos o postvitales.

Tienen por finalidad preparar células, tejidos y órganos procedentes de seres en los que los procesos vitales se han detenido y es necesario conservar la estructura que tenían en vida. De manera general, para alcanzar este objetivo es necesario realizar los siguientes pasos:

- Toma de muestra
- Fijación: Detener la vida de las células e impedir las modificaciones post mortem que pueda sufrir la célula (procesos autolíticos), manteniendo la estructura morfológica de células y tejidos sin que ocurran cambios notables en ellos (Figura 19). Esto se consigue inmovilizando (por coagulación o precipitación) las moléculas proteínicas e inhibiendo principalmente las enzimáticas haciéndolas insolubles. Esta acción garantiza la integridad de las células y tejidos; se efectúa por mediante agentes químicos denominados fijadores. Los fijadores se clasifican en dos grandes grupos: a) Oxidantes: el tetraóxido de osmio (ácido ósmico), el bicromato de potasio, ácido crómico, bicloruro de mercurio o “sublimado corrosivo”, ácido pícrico, ácido acético. b) Reductores: el formaldehído, el glutaraldehído, el alcohol etílico, el alcohol metílico. La acción oxidante o reductora de los fijadores le confieren a las células ciertas condiciones que posibilitan una mejor aplicación de las sustancias colorantes, por ejemplo: el alcohol etílico absoluto conserva el glucógeno, el bicloruro de mercurio provoca que las anilinas colorean de manera más brillante a las fibras colágenas, el bicromato de potasio facilita la coloración de las mitocondrias,

el ácido acético permite una mejor tinción de los núcleos, el cloruro de calcio conserva e insolubiliza parcialmente a los lípidos.

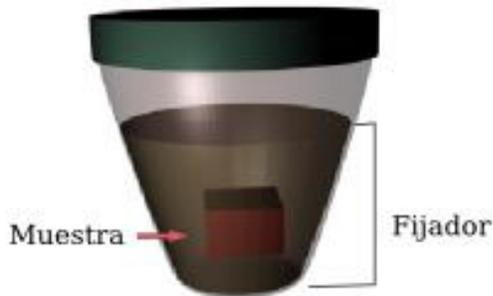


Figura 32. Fijación de muestra (Vigo, 2009).

- **Inclusión:** Los tejidos fijados adquieren cierta consistencia y dureza, pero no la suficiente para que, de ellos, se obtengan secciones delgadas. Estas secciones, del orden de algunas milésimas de milímetro (5 a 10 μm), se conseguirán cuando los tejidos se infiltren con sustancias denominadas “de inclusión” y adquieran tal dureza que sometidos al filo de una navaja produzcan secciones, cortes o láminas sumamente delgadas y transparentes (Figura 20). Las sustancias de inclusión tienen la propiedad de incorporarse e infiltrarse al interior de las células y tejidos con la finalidad de servirles de soporte. Así los tejidos y la sustancia de inclusión forman un bloque homogéneo en dureza y consistencia, a pesar que sus componentes tuvieron originalmente distinta dureza. Existen una serie de sustancias de inclusión que se han empleado o se utilizan actualmente. Unas son solubles en agua (gelatina, carbowax, glicol metacrilato) otras, solubles en solventes orgánicos (parafina, celoidina, resinas epóxicas) (Montalvo, 2010). **Inclusión en parafina.** Después de la fijación y el “lavado” de las muestras, éstas se encuentran embebidas en agua o en alcohol, por lo que resulta imposible que se infiltren con parafina, medio de inclusión insoluble en agua y alcohol. Por lo tanto, para que los tejidos puedan ser incluidos en parafina se requiere deshidratarlos e infiltrarlos con

el solvente de la sustancia de inclusión. Los pasos a seguir para la inclusión de las muestras en parafina son:

- a) Deshidratación,
- b) Impregnación en el solvente (a este paso también se le denomina aclaración o diafanización) y
- c) Inclusión y formación del bloque de parafina.



Figura 33. Inclusión en parafina

- Macrotomía (obtención de los cortes): En esta etapa, los tejidos y la parafina integran un solo bloque que, posee la dureza y la consistencia suficientes para obtener secciones delgadas y transparentes (Figura 21) (Montalvo, 2010).



Figura 34. Micrótopo para parafina.

- Tinción: El procedimiento de coloración o tinción consiste en que una estructura celular o tisular adquiere específicamente un color bajo la acción de una sustancia colorante. Se considera que una estructura se ha coloreado o teñido cuando al ser lavada con el líquido que disuelve al colorante, no se decolora. El proporcionar color a las estructuras que

constituyen un tejido o un órgano se hace con la finalidad de distinguirlas entre sí y facilitar su observación. Si se examina al microscopio una sección de tejido sin colorear, ya adherida al portaobjetos, se podrá constatar que no es fácil discernir sus componentes, pues lo delgado de los cortes y la diafanización producida en los tejidos igualan sus índices de refracción. La coloración proporciona diferencias evidentes entre las estructuras y al observar los cortes será fácil reconocerlas. Teoría de la coloración. Existen dos teorías que explican el procedimiento de la coloración:

a) Teoría física. Considera que la coloración es un proceso físico de adsorción. Así, las partículas de las sustancias colorantes disueltas penetran en los espacios intra e intercelulares en los que se mantienen adheridas en razón de la cohesión molecular.

b) Teoría química. El colorante se une a la sustancia coloreable combinándose con ella íntimamente debido a la presencia de agrupaciones moleculares ácidas o básicas en los componentes celulares o tisulares que se unen respectivamente a los cromógenos básicos y ácidos de los colorantes, formando sales insolubles. Una prueba de ello es el hecho de la casi imposibilidad de separar completamente el colorante de los componentes en donde ejerció su acción de tinción aun empleando sus líquidos solventes (Montalvo, 2010).

Coloración de hematoxilina-eosina (HyE)

La coloración de hematoxilina-eosina se considera como la técnica de tinción de uso más frecuente en el estudio de células y tejidos, a través del microscopio fotónico. Consiste en la tinción de:

a) los núcleos mediante una hematoxilina, previamente oxidada y transformada en hemateína a la que se le añade una sustancia mordiente para formar una laca (para tal fin se usan sales metálicas de aluminio, plomo o fierro). Los núcleos se colorean de azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro, dependiendo de los agentes oxidantes y mordientes que se utilizaron.

b) el citoplasma y material extracelular utilizando la eosina que les confiere diversos grados de color rosado (Montalvo, 2010).

Coloración de violeta de cresilo: El violeta de cresilo se usa especialmente para la tinción nuclear y visualización de los cuerpos de Nissl. Se usa como tinción estándar para identificación de Helicobacter y de cromatina del sexo (Xcromatina). Los núcleos se tiñen de azul y los cuerpos de Nissl de violeta (Merck millipore).

Coloración de azul de toluidina: colorean de azul a los núcleos y a otras estructuras basófilas pero, al mismo tiempo, ciertos componentes tisulares como la mucina, la matriz cartilaginosa o el ácido hialurónico se tiñen de violeta o rosado (Montalvo, 2010).



Figura 35. Tinción.

- Montaje: Concluido el proceso de la tinción de los cortes, éstos se deben colocar en condiciones de protección y de poderlos utilizar infinidad de veces sin que se deterioren (Montalvo, 2010).

Método de deshidratación

Día 1: La muestra es colocada sucesivamente en concentraciones crecientes de alcohol.

ETOH 30%

> 40%

> 50%

> 60%

> 70%

Dejar cada uno por una hora en agitación constante, cubriendo muy bien el tejido en tubos falcón o en frascos de vidrio.

Día 2:

ETOH 80%

> 90

>100

> 100% alcohol

Etanol/xilol

Xilol

Parafina

Día 3:

Parafina inclusión.

2da Parte

Para quitar la parafina 35 minutos después, poner en xilol 15 minutos.

Reactivo	Tiempo
Xilol	5 min.
ETOH absoluto	5 min.
ETOH absoluto	5 min.
ETOH 96%	5 min.
ETOH 70%	5 min.
ETOH 50%	5 min.
ETOH 30%	5 min.
PBS	3 min. → Laminillas.

Tinción.

Reactivo de tinción.



Hematoxilina y violeta de cresilo o azul de toluidina 5-8 min.
Lavar con agua corriente y dejar en PBS.

Reactivo	Tiempo
ETOH 30 %	30 s.
ETOH 50 %	30 s.
ETOH 70 %	30 s.
ETOH 96 %	30 s.
ETOH absoluto	
ETOH absoluto	
Montaje	

