



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Laboratorio de Inmunobiología

“Actividad terapéutica del extracto etanólico de *Juliania adstringens* en un modelo murino de colitis experimental”

Tesis para obtener el título de Biólogo

Presenta:

Rubén Jiménez Rivas

Director de Tesis:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Los Reyes Iztacala Tlalnepantla México 2016





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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

A los miembros del jurado:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

M. en C. Oscar Nieto Yáñez

Dra. Margarita Canales Martínez

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

M. en C. Ángel Duran

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyectos IN213713 y, IN211614 y por el proyecto 167799 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

A la Doctora Leticia Verdín Terán†

DEDICATORIAS

Quiero dedicarles especialmente este trabajo a mis padres **CALIXTO** y **GUADALUPE**, por todo su esfuerzo, la paciencia que me han tenido, por el gran apoyo incondicional de siempre y por todos los sacrificios que han tenido que realizar desde el día que nací. Por enseñarme a no darme por vencido, por siempre impulsarme a dar lo mejor de mí y luchar por lo que quiero sin importar lo difícil que parezcan las cosas, por ser el mejor ejemplo que puedo tener. En pocas palabras por TODO. Los quiero mucho.

A **ULISES**, por el apoyo que siempre me has demostrado, gracias por hacerme los días más alegres y mucho más a menos.

A **JUDITH** porque nunca creí encontrar a una persona tan maravillosa, por tu cariño, amistad, los buenos momentos que hemos pasado juntos (y por todos los venideros) porque cada momento que pasamos juntos son mágicos e inolvidables sin olvidar claro a los regalotes que me has dado. Te amo.

Al mi guru académico **Doc. MARCO** por confiar en mí y brindarme su apoyo, gracias por los consejos, de verdad es un privilegio y un placer poder trabajar a su lado pero más importante aún gracias por brindarme su amistad.

A **KARLA**, gracias por los buenos momentos compartidos a lo largo de toda la carrera, por las pláticas, la ayuda y sobre todo por tu amistad.

A amigos de la carrera **Rogelio, Fernando, Izamari Maggie Tania** y **Raúl** gracias por su amistad y apoyo.

Al sensei académico **OSCAR NIETO** muchas gracias por el apoyo y los consejos, te admiro eres un ejemplo.

A los compañeros de trabajo **Nelly, Mario, Miguelon, Daniela** y **Rebe**.

A la **Dra. Margarita**, por todos los consejos y apoyo brindados, por las explicaciones y paciencia.

“Actividad terapéutica del extracto etanólico de Juliania adstringens en un modelo murino de colitis experimental”

A los profesores de la carrera que a mi parecer fueron quienes influyeron gratamente en mi formación: Manuel Mandujano, a la Profa Monse, al Doc Ricardo Mejia y muy especialmente a la **DOCTORA LETICIA VERDÍN†** que aunque ya no está fue por usted que conocí a los compañeros del lab.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	V
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
La enfermedad inflamatoria intestinal	2
Síntomas, cuadro clínico	3
Colitis ulcerosa	4
La enfermedad de Crohn	4
Importancia del padecimiento	5
Tratamientos convencionales	6
Modelos biológicos	8
Dextrán Sulfato de Sodio DSS	8
Búsqueda de nuevas alternativas	11
Medicina tradicional	11
Plantas medicinales y metabolitos secundarios	12
Alcaloides	15
Terpenioides	15
Compuestos fenólicos	16
<i>Juliania adstringens</i>	17
ANTECEDENTES	18
JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVO GENERAL	19
Objetivos particulares	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Datos de los ratones	20
Obtención del extracto	20

Grupos experimentales	20
Determinación de la concentración óptima	20
Inducción de colitis por DSS a 4%.....	21
Administración de los extractos	21
Porcentaje de sobrevida.....	21
Índice de actividad de la enfermedad (DAI)	21
Obtención y longitud del intestino	22
Preparación para histología y obtención del homogeneizado	22
Índice de daño Histológico.....	23
Fenoles totales.....	24
Concentración de Flavonoides	24
Capacidad anti-oxidante.....	24
Determinación de la actividad enzimática de la SOD, GPX, y CAT	24
Caracterización química	24
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	26
Rendimiento del extracto	26
Concentración óptima para utilizar como tratamiento	27
Sobrevida.....	27
Índice de actividad de la enfermedad (DAI)	28
Longitud del colon	29
Daño a la integridad de las crestas intestinales	31
Fenoles, Flavonoides y Capacidad anti-oxidante del extracto	35
Niveles de la actividad enzimática de la SOD, GPX y CAT.	36
Caracterización química del extracto por HPLC y (CG-EM).....	40
HPLC.....	40
CG-EM	40
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES	58

APÉNDICE 1	59
<i>Juliania adstringens</i> Schltdl.....	59
Clasificación taxonómica	59
Sinónimos.....	59
Nombre común.....	59
Descripción.....	59
Distribución.....	60
APÉNDICE 2	61
Contenido de Fenoles Totales (CFT)	61
APÉNDICE 3	62
Concentración de Flavonoides	62
APÉNDICE 4	64
Actividad anti-oxidante	64
APÉNDICE 5	65
Glutación peroxidasa	65
Superóxido Dismutasa.....	66
Catalasa	67
REFERENCIAS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores que contribuyen a la inflamación crónica intestinal en individuos susceptibles.	3
Figura 2. Diferentes sintomatologías que se presentan en la colitis ulcerosa y en la enfermedad de Crohn.	5
Figura 3. Estructura molecular del Dextrán Sulfato de Sodio (DSS).	9
Figura 4. Elementos básicos del metabolismo primario	13
Figura 5. Origen de algunos metabolitos secundarios en el metabolismo primario.	14
Figura 6. Colchicina, ejemplo de alcaloide.	15
Figura 7 Estructura base de los terpenoides-isopreno.....	16
Figura 8. Estructura general de los flavonoides.	16
Figura 9. Curvas de sobrevida.....	27

Figura 10. Índice de actividad de la enfermedad	28
Figura 11. Longitudes de los intestinos gruesos	29
Figura 12. Longitud de los intestinos gruesos al día 10.....	30
Figura 13. Histología de los colon H&E	32
Figura 14. Histología de los colon Azul de Alcian	33
Figura 15. Índice histopatológico.....	34
Figura 16. Niveles de actividad de la enzima Superóxido dismutasa (SOD)	37
Figura 17. Niveles de actividad de la enzima Glutación peroxidasa (GPx)	38
Figura 18. Niveles de actividad de la enzima Catalasa (CAT)	39
Figura 19. Cromatograma de <i>J. adstringens</i> en HPLC.....	41
Figura 20. Cromatograma de <i>J. adstringens</i> de una extracción hexánica.....	44
Figura 21. Cromatograma de <i>J. adstringens</i> de una extracción con cloroformo.....	45
Figura 22. Corteza de <i>Juliania adstringens</i> Schltdl.....	59
Figura 23. <i>Juliania adstringens</i> Schltdl; hojas; árbol y corteza seca.....	60
Figura 25. Actividad de Glutación Peroxidasa.....	65
Figura 26. Esquema del ensayo de Superóxido dismutasa.....	67
Figura 27. Actividad de la Catalasa.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rendimiento del extracto de la corteza de <i>J. adstringens</i> en gramos y porcentaje.....	26
Tabla 2. Determinación fitoquímica del extracto.....	35
Tabla 3. Curva patrón para determinar la concentración de fenoles totales.....	62
Tabla 4. Concentraciones utilizadas para la curva de Quercetina.....	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales síntomas de la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.	4
Cuadro 2. Principales fármacos utilizados en el tratamiento de la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.	7
Cuadro 3. Diferentes químicos utilizados en la inducción de la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.	9
Cuadro 4. Modelos para inducir la enfermedad inflamatoria intestinal.....	10
Cuadro 5. Compuestos identificados mediante HPLC en el extracto etanólico de <i>J. adstringens</i>	42
Cuadro 6. Compuestos identificados mediante CG-EM en el extracto etanólico de <i>J. adstringens</i>	46
Cuadro 7. Actividades biológicas reportadas para los compuestos identificados.	50

RESUMEN

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad de creciente morbilidad, de la cual se desconoce su etiología y que se caracteriza por la inflamación crónica de la parte final del tracto digestivo, específicamente intestino grueso y colon. Los medicamentos existentes para el tratamiento de esta enfermedad, presentan múltiples efectos secundarios como son: deterioro de la función renal, mayor predisposición al herpes zoster, deterioro de la función hepática, anemia y en casos donde los tratamientos son muy prolongados, se puede desarrollar un cáncer de colon. Por ello, es que se requieren estudios encaminados a encontrar nuevas alternativas al tratamiento de la enfermedad.

Juliania adstringens es una planta utilizada en la medicina tradicional para tratar úlceras, cáncer de estómago, gastritis algunas lesiones cutáneas, para el tratamiento de fiebres intermitentes, paludismo, calentura, caída del cabello, afecciones respiratorias, como anti-inflamatorios, entre otras por lo que es un buen candidato para ser evaluado como una alternativa para el tratamiento de la colitis ulcerosa.

En el presente trabajo se utilizó un modelo de colitis aguda inducido mediante la administración de Dextran sulfato de sodio (DSS) donde se encontró que el extracto etanólico de *Juliania adstringens* a una concentración de 200 mg/Kg aumentó la sobrevivencia de los animales, presentó diferencias significativas respecto al índice de la actividad de la enfermedad (DAI), en la longitud del colon, generó una protección a los cambios histológicos inducidos por el DSS, presenta un aumento en la actividad de la Superóxido dismutasa, Glutación peroxidasa y no presentó cambios respecto a la Catalasa. Dentro de los compuestos presentes en el extracto etanólico de *J. adstringens* a los que se les podría atribuir dichos efectos se encuentran: Catecol, Catequina, Naringenina, Pinocembrina, Ácido palmítico, Éster metílico del ácido palmítico, Ácido palmítico, Ácido oleico éster metílico, Ácido esteárico y Monoleato gliceril.

Palabras clave: Dextran sulfato de sodio, colitis aguda, medicina tradicional, *J. adstringens*.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un trastorno que incluye la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU); la EC provoca inflamación en la pared intestinal llegando a comprometer todo el tracto digestivo mientras que la CU presenta inflamación sólo en ciertas partes del tracto digestivo (el colon) [1].

La etiología de la EII no está determinada con exactitud, sin embargo, se ha sugerido como principales componentes patológicos los siguientes aspectos:

- a) Factores ambientales tales como la dieta, deficiencias nutricionales, el tabaquismo, los anti-conceptivos orales, el estrés, la apendicitis, higiene, el uso de anti-bióticos y los diferentes estilos de vida están directamente asociados como un factor de riesgo [1, 2].
- b) Factores genéticos ya que se estima que del 2-14% de los pacientes con EC reportan un historial familiar con este padecimiento. De manera similar entre el 8-14% de los pacientes con CU reportan un historial familiar similar [2].
- c) El sistema inmunológico, presentando una elevada producción de citocinas pro-inflamatorias, como IL-1 β , IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), TL1A, siendo el TNF- α el sello característico de la colitis ulcerativa [3].
- d) Los niveles anormalmente elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés y especies reactivas de nitrógeno (RNS por sus siglas en inglés) como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el anión superóxido (O₂⁻), radical perhidroxilo (OH⁻²), radical hidroxilo (OH) seguidos de la modulación redox por anti-oxidantes como la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD) [4].
- e) La relación entre la respuesta inmunitaria innata y la inmunidad adquirida que genera un cambio en la función de la barrera del epitelio intestinal; lo cual interviene en el desarrollo de una respuesta inmune local inapropiada frente a antígenos luminales de la microbiota intestinal [2].

Esto da como resultado la teoría más aceptada que sugiere una desregulación del sistema inmunológico del huésped frente a la microbiota que reside y a otros agentes dentro de la luz del tracto digestivo. Por otro lado, se ha observado en modelos animales que estos factores producen un aumento en el desarrollo de estas patologías, sin embargo, no existe un criterio patognomónico por lo cual su diagnóstico está basado en una serie de criterios clínicos, endoscópicos e histológicos (**Figura 1**) [1, 2].

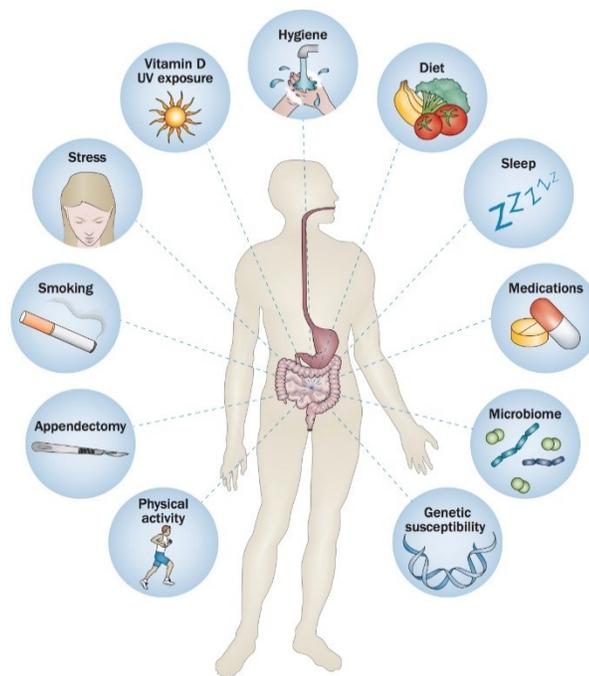


Figura 1. Factores que contribuyen a la inflamación crónica intestinal en individuos susceptibles.

Síntomas, cuadro clínico

Aunque los síntomas tienden a variar en la EII, la CU y la EC causan síntomas muy parecidos. De manera general se presenta el cansancio, adelgazamiento, fiebre, anemia, dolor abdominal, sangrado rectal, diarrea, pérdida de apetito, artritis, úlceras, alteraciones en el hígado e inflamación de la columna (**Cuadro 1**) [5], sin embargo, existen signos característicos de cada una de las enfermedades los cuales se describen a continuación:

Cuadro 1. Principales síntomas de la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

Signos	CU	EC
Localización	Recto y/o colon	Desde la boca hasta el ano
Úlceras	Sólo mucosas	Toda la pared intestinal
Fiebre	Si	Si
Diarrea	Líquida con sangre, moco y pus	Pastosa con sangre
Fístulas	No	Si
Anemia	Frecuente	En pocos casos
Pérdida de peso	Si	Si
Dolor abdominal	Si	Si
Abscesos	Raros	Frecuente
Afectación	Sólo mucosas	Transmural

Colitis ulcerosa

Se caracteriza por el desarrollo de una prolongada inflamación en algunas partes del revestimiento epitelial del intestino (sobre todo al colon), afectando principalmente la parte inferior izquierda del intestino llegando a propagarse parcial o totalmente por el intestino grueso (**Figura 2 A**). Aquellas personas afectadas por la enfermedad, presentan los siguientes síntomas: pérdida de peso, sangre en heces, diarrea, formación de úlceras, producción de pus, moco y hemorragia [1, 5].

La enfermedad de Crohn

Se caracteriza por el desarrollo de una inflamación crónica de la pared intestinal llegando en algunos casos a producir obstrucción intestinal y transmural que puede comprometer a todo el tracto digestivo afectando preferentemente el íleon terminal, colon y región perianal (**Figura 2 B**). Las personas afectadas por esta enfermedad presentan los siguientes síntomas: problemas de desnutrición, pérdida de peso, dolor en el abdomen inferior derecho, pérdida de apetito, fiebre, náuseas, vómitos, diarrea crónica y leves hemorragias rectales [1, 5].

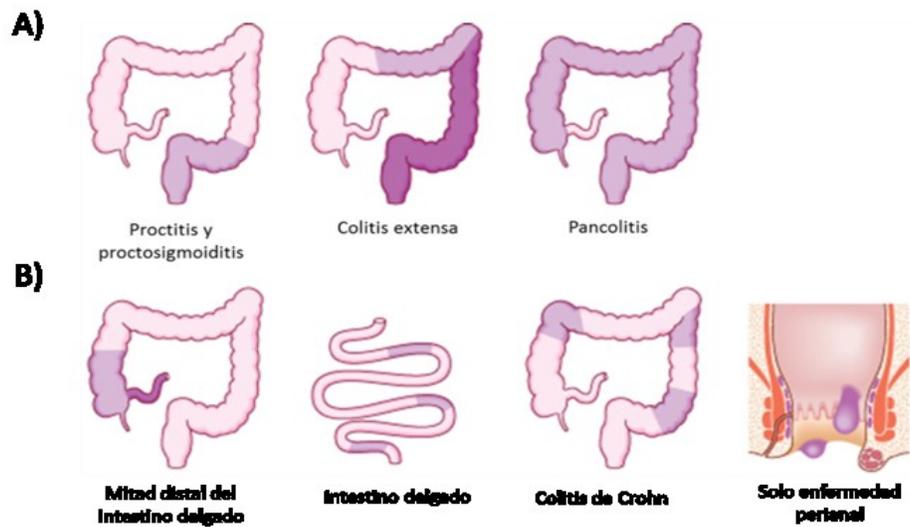


Figura 2. Diferentes sintomatologías que se presentan en la colitis ulcerosa (A) y en la enfermedad de Crohn (B).

Importancia del padecimiento

La EII es considerada de gran importancia en la clínica contemporánea debido al severo deterioro de la calidad de vida de quienes las padecen y al riesgo de desarrollar cáncer de colon. De igual manera, la EII se puede ver significativamente modificada por algunas variables como la edad, el sexo y las regiones geográficas, se ha reportado que existe una mayor incidencia en las áreas urbanas de países industrializados [6].

La prevalencia de la EII es relativamente alta en el norte de Europa, Reino Unido y Estados Unidos (los países altamente industrializados). Sin embargo, recientemente se ha identificado un aumento en la incidencia y prevalencia en otras áreas del mundo como son: Europa central, Europa del sur, Asia, África y Latinoamérica [1].

La colitis ulcerosa, tiene una incidencia anual de 0.6-19.2 por cada 100,000 habitantes en Norte América y de 0.6-24.3 por cada 100,000 personas en Europa, lo cual corresponde a una prevalencia del 37.5-248.6 habitantes en América del Norte y de 4.9-505 personas en Europa respectivamente [1, 7, 8].

En México existe una menor incidencia de la EII, aunque no existen estudios epidemiológicos que lo comprueben ya que sólo se cuenta con la prevalencia en admisiones hospitalarias las cuales arrojan que existen 2.6 casos por 1000 admisiones hospitalarias y 74 casos por cada 1000 en un servicio de gastroenterología [7, 9].

Tratamientos convencionales

Los tratamientos para la EII implican el uso de medicamentos anti-inflamatorios, los cuales provocan una producción de citocinas anti-inflamatorias tales como: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que inhiben la producción de citocinas pro-inflamatorias, por tanto, reducen significativamente los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, los medicamentos presentan limitaciones, por ejemplo los medicamentos esteroideos cuando se administran en altas concentraciones provocan múltiples efectos secundarios (**Cuadro 2**) [1, 6].

Se ha observado en algunos casos que la EII tiene un curso crónico y evolucionan con frecuentes recaídas, por lo cual se considera que los tratamientos deben ser de por vida o hasta que los pacientes se someten a cirugías, esto último en el caso de la CU. Sin embargo, otros estudios mencionan que no existe una cura médica o quirúrgica para la EII [6].

Modelos biológicos

Los modelos fiables para la reproducción clínica, morfológica e histológica de las enfermedades son necesarios para identificar los eventos moleculares asociados con la progresión de la enfermedad. Con base en esto, se sabe que para la medicina experimental los modelos animales juegan un papel de suma importancia en el desarrollo de nuevas drogas que tengan como fin la búsqueda de una posible cura y la descripción del mecanismo de acción de dichas drogas. Ante esto, el ratón es un modelo que ofrece muchas ventajas con respecto a otros modelos genéticos como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* e inclusive la rata [3, 10, 11], dichas ventajas que presenta el ratón son:

- a) Al tratarse de un mamífero, gran parte de sus procesos bioquímicos son similares a los del humano.
- b) Tienen un tiempo generacional muy corto, lo que permite controlar las variables ambientales en las experimentaciones.
- c) Tiene el privilegio desde el punto de vista genético de que el primer borrador de su genoma está completo.

Dextrán Sulfato de Sodio DSS

El Dextrán Sulfato de Sodio (DSS) (**Figura 3**) es un polisacárido sulfatado utilizado para inducir colitis aguda y crónica en animales, ya que reproduce morfológicamente y sintomatológicamente la colitis humana que, como muchos otros químicos es tóxico y afecta la función protectora de la barrera epitelial de la mucosa (**Cuadro 3 y 4**). Este expone la mucosa local a los estímulos de la microbiota intestinal, por lo tanto, es particularmente útil para estudiar la contribución de los mecanismos de la inmunidad innata de la colitis [12, 13].

El modelo de DSS fue descrito por primera vez por Ohkusa en 1985 en un modelo de hámster que posteriormente adaptó a ratones, encontrando que con un peso molecular de 50 mil Da, causa deformidad en la integridad del epitelio y permeabilidad en la mucosa del colon. Por lo tanto, el DSS causa en particular colitis aguda que es morfológicamente y macroscópicamente caracterizada por hiperemia, ulceraciones, edema de la submucosa de moderado a severo, lesiones acompañadas por cambios histopatológicos que incluyen infiltración de granulocitos en las criptas y pérdida de

la arquitectura tisular. Síntomas que en última instancia se manifiestan en forma de diarrea sanguinolenta [3, 5, 13, 14].

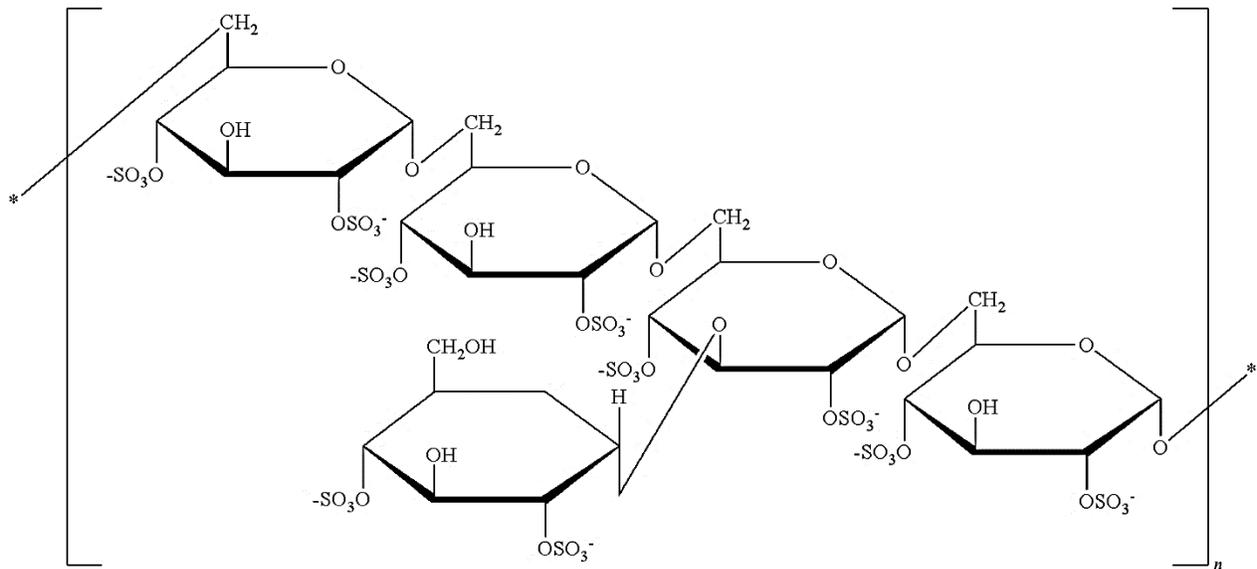


Figura 3. Estructura molecular del Dextrán Sulfato de Sodio (DSS).

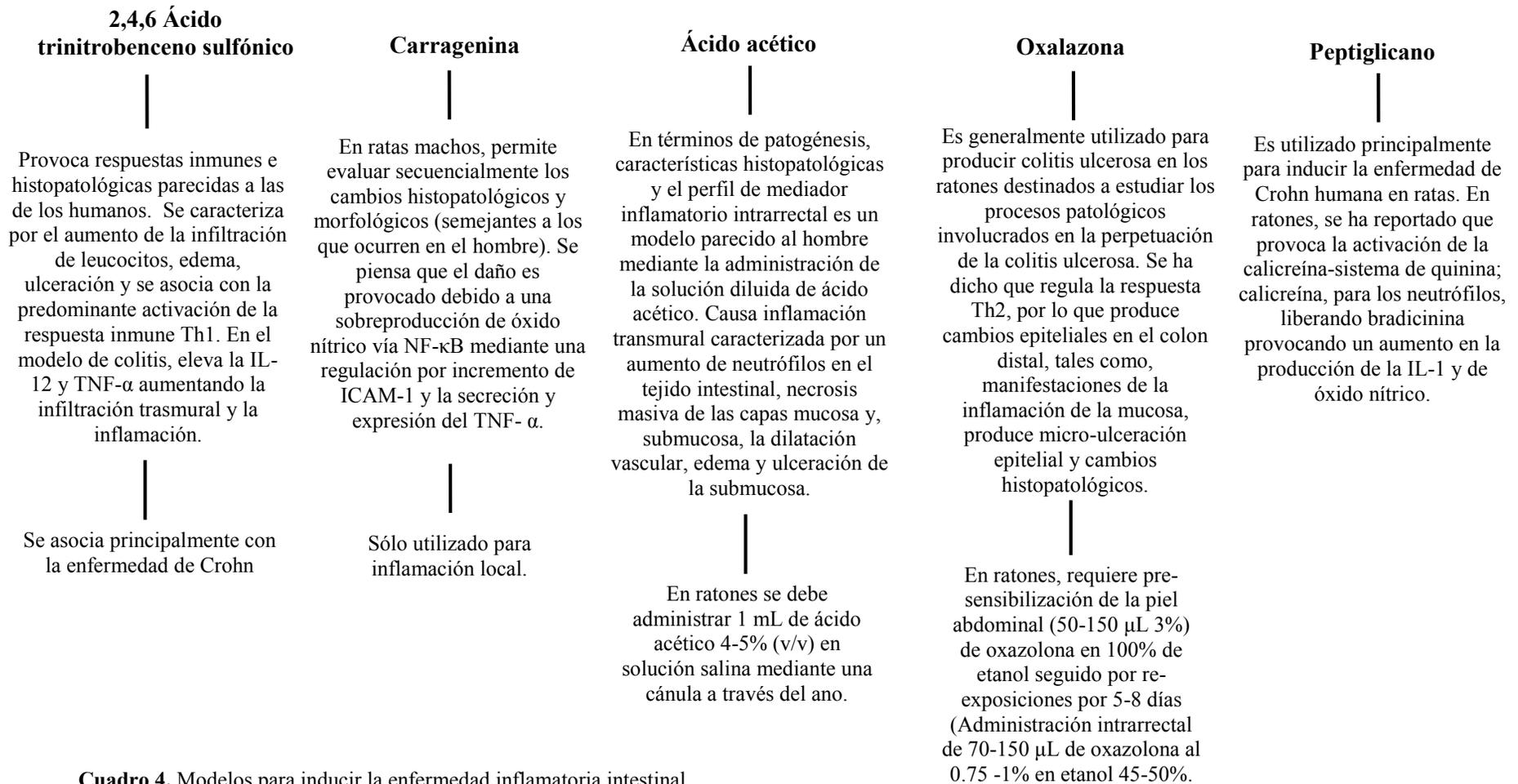
Uno de los modelos más utilizados para inducir colitis ulcerosa aguda en ratones machos y hembras consiste en la administración de DSS en solución acuosa en concentraciones que van del 3% al 5% (peso/volumen), específicamente para las cepas C57BL/6NTac, C57BL/6 y BALB/c [14, 15]. Al final del tratamiento los ratones muestran daño en la integridad histológica del colon, así como, cambios en los niveles de las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, cambios en la actividad de la α -mieloperoxidasa (MPO), (CAT), (GPx), (SOD) entre otras debido a un aumento de las ROS [3, 4, 16].

Cuadro 3. Diferentes químicos utilizados en la inducción de la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

Fármaco	Área afectada	Inflamación	Similitudes
TNBS/Etanol	Colon	Aguda/Crónica	EC-CU
DSS	Colon	Aguda/Crónica	CU
Oxazolona	Colon descendente	Aguda/Crónica	CU
Ácido acético	Colon descendente	Aguda	CU

Modelos experimentales para inducir la EII en roedores

Fármacos utilizados



Cuadro 4. Modelos para inducir la enfermedad inflamatoria intestinal.

Búsqueda de nuevas alternativas

Debido a los efectos secundarios ya mencionados, surge el interés por conocer las propiedades de productos naturales que puedan ser útiles para aliviar esta enfermedad y otras complicaciones similares. Debido a esto y para lograr la integración de la medicina tradicional, se ha recurrido a la investigación de las plantas medicinales con lo cual se busca validar su uso científico, ya que, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contenga sustancias que puedan ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos en forma de extractos, puedan servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos [17].

Medicina tradicional

El estudio etnobotánico representa una actividad de suma importancia en la investigación y desarrollo de fármacos ya que según estadísticas de la OMS, las plantas son utilizadas aproximadamente por el 80% de la población mundial con el objetivo de satisfacer sus necesidades médicas y se cree que un 40% de los productos farmacéuticos que se consumen en el mundo proceden de productos naturales, principalmente de las plantas. Sin embargo, este conocimiento está basado en la eficacia, es decir, si se utiliza una planta medicinal y se observa que sirve para el tratamiento de un padecimiento, se acepta, si no cae en desuso [17, 18].

En México, el uso de las plantas medicinales se ha dado desde tiempos prehispánicos y de manera tradicional. Gracias a los actuales grupos étnicos que conservan este conocimiento, es que México posee la tradición en su empleo. El Instituto Nacional Indigenista estima que el territorio nacional cuenta con cerca de tres a cinco mil especies de plantas que tienen uso terapéutico, lo cual representa cerca del 10% de la riqueza floral del país. Se ha reportado que aproximadamente sólo el 1% ha sido estudiado a fondo respecto a sus propiedades medicinales. Aunque los reportes indican que existe una gran cantidad de plantas medicinales, las más nombradas por sus usos son: gordolobo, eucalipto, hierbabuena, manzanilla, nopal, árnica, epazote, sábila, ruda, romero, tomillo, hinojo, etc., [18, 19]

Plantas medicinales y metabolitos secundarios

Dentro de los organismos, al conjunto de reacciones bioquímicas se le conoce como metabolismo primario, el cual consta de aminoácidos, nucleótidos, azúcares, lípidos y proteínas (**Figura 4**) y están presentes en todas las plantas. Sin embargo, en la actualidad, se sabe que muchos de los compuestos derivados de las plantas medicinales son producidos mediante vías metabólicas adicionales al metabolismo primario, conocido como metabolismo secundario, por tanto, son denominados metabolitos secundarios (MS) también conocidos como productos secundarios o productos naturales (**Figura 5**). Estos MS son constitutivos como consecuencia del ataque de patógenos, daños ocasionados por insectos, o como protección de las especies reactivas del oxígeno. Recientes trabajos han logrado determinar que ciertos MS poseen actividades farmacológicas para el tratamiento del cáncer, enfermedades gastrointestinales, dérmicas, del sistema nervioso central, cardiovasculares, diabetes entre otras [17, 18, 20].

Una de las principales diferencias que presentan los MS con relación a los primarios es su distribución, ya que los metabolitos primarios se encuentran en todos organismos y, los MS dependen del desarrollo y de los elementos ambientales en los que se desarrolle la planta (estrés biótico y abiótico). Los MS son compuestos de bajo peso molecular de los cuales se conocen aproximadamente 20 mil estructuras que por su composición química son clasificados en dos grupos principales, nitrogenados y no nitrogenados [20, 21]

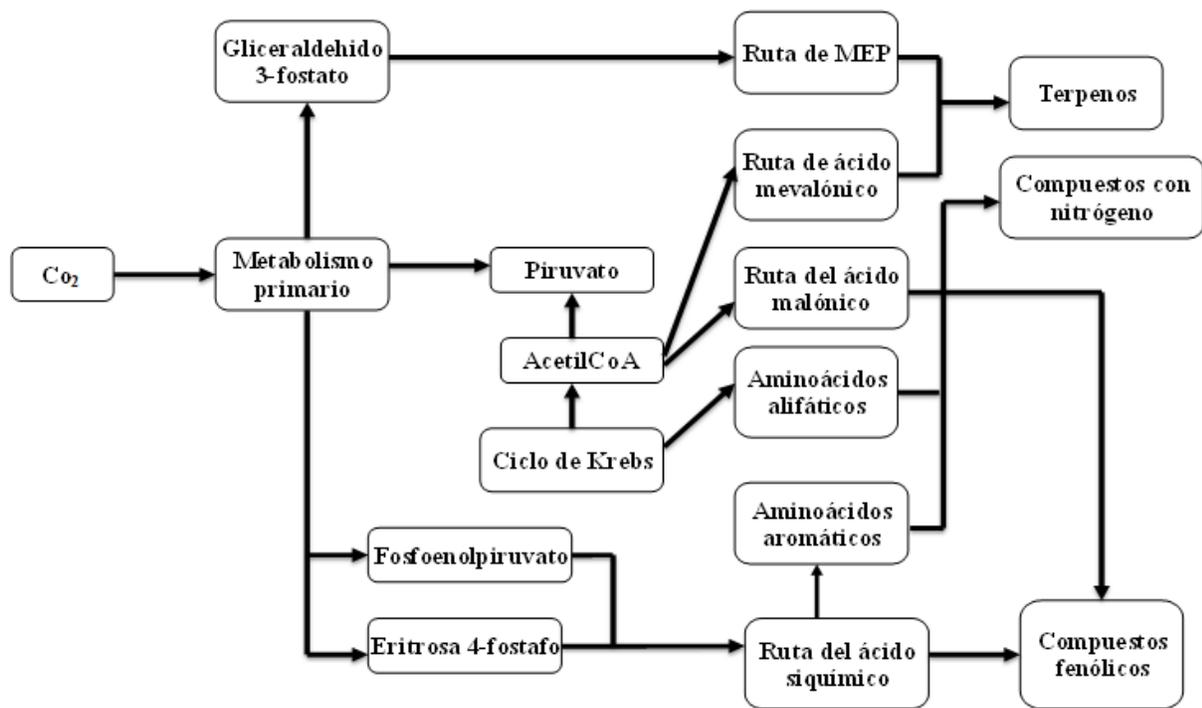


Figura 4. Elementos básicos del metabolismo primario en relación con el metabolismo secundario [22].

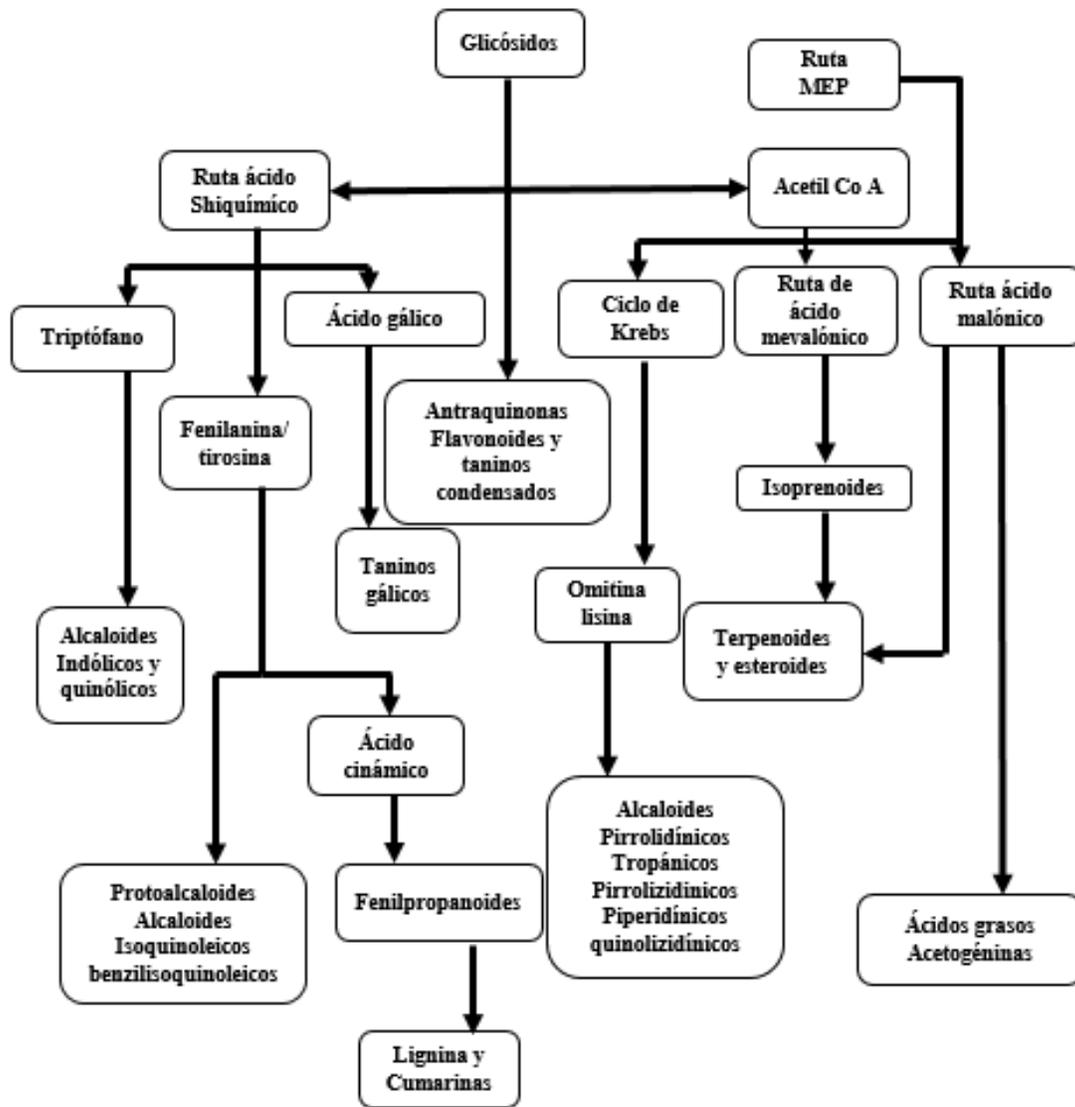


Figura 5. Origen de algunos metabolitos secundarios (alcaloides, fenilpropanoides y terpenos) en el metabolismo primario [22].

Los principales MS con uso terapéutico son:

Alcaloides

El término alcaloide significa semejante a los álcalis y se aplica a compuestos naturales básicos nitrogenados de origen vegetal (**Figura 6**). Son compuestos heterocíclicos que generalmente se sintetizan a partir de los aminoácidos: triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina. Se encuentran en las semillas, raíces, corteza y hojas; en estado libre o como glucósidos, o forman sales con ácidos orgánicos. La función de los alcaloides en las plantas aún no es muy conocida, aunque se reporta que algunos intervienen como reguladores del crecimiento, o como repelentes o atrayentes de insectos [20, 23]

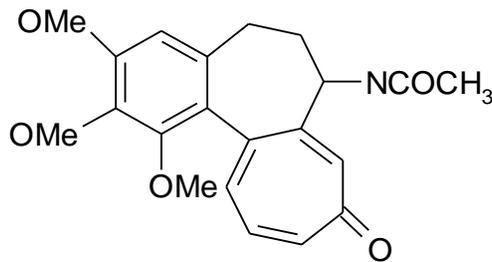


Figura 6. Colchicina, ejemplo de alcaloide.

Terpenoides

Los terpenoides son el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40 mil moléculas diferentes), insolubles en agua y están formados por repeticiones de una molécula de 5 carbonos llamada isopreno (**Figura 7**); estos se clasifican según el número de isoprenos que contengan: a) Isopreno: es el más simple y es sintetizado por los tejidos fotosintéticos. Se piensa, que este MS es producido por las plantas que tienen que hacer frente a las altas temperaturas; b) Monoterpenos: (formado por dos moléculas de isoprenos) suelen ser componentes de las esencias volátiles de las flores y de los aceites esenciales de las hierbas. Son utilizadas en la producción de perfumes y saborizantes; c) Sesquiterpenos: (formados por tres moléculas de isopreno) al igual que los monoterpenos, muchos sesquiterpenos se presentan en los aceites esenciales. Por otro lado, muchos sesquiterpenos son utilizados como antibióticos (fitoalexina) y como agentes repelentes de herbívoros; d) Diterpenos: están compuestos por 20 átomos de carbonos que pueden presentarse

en forma de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, lactonas y ácidos carboxílicos. Algunos han mostrado actividad anti-tumoral, actividad anti-inflamatoria, edulcorantes y e) Triterpenos: poseen un esqueleto de seis isoprenos derivado del escualeno. Muchos de ellos se encuentran glicosilados formando las llamadas saponinas. Se ha reportado que las saponinas presentan actividades farmacéuticas, entre ellas: cortisona, anticonceptivos, estrógenos, testosterona [18, 24-26].

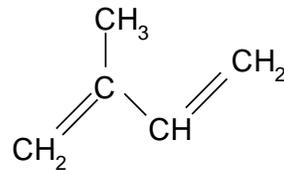


Figura 7 Estructura base de los terpenoides-isopreno.

Compuestos fenólicos

Se caracterizan por tener en su estructura un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos (**Figura 8**). Se sintetizan a partir del ácido cinámico y hasta la fecha se tiene un registro aproximado de más de 40 mil fenilpropanoides diferentes. Se piensa que su principal función en las plantas es establecer barreras físicas que detengan la expansión de los patógenos y ejerzan una acción protectora ante la generación de especies reactivas del oxígeno. Farmacológicamente presentan características anti-bacterianas, anti-virales, anti-inflamatorias, espasmolíticas, vasodilatadoras, citotóxicas [18, 20, 25, 26].

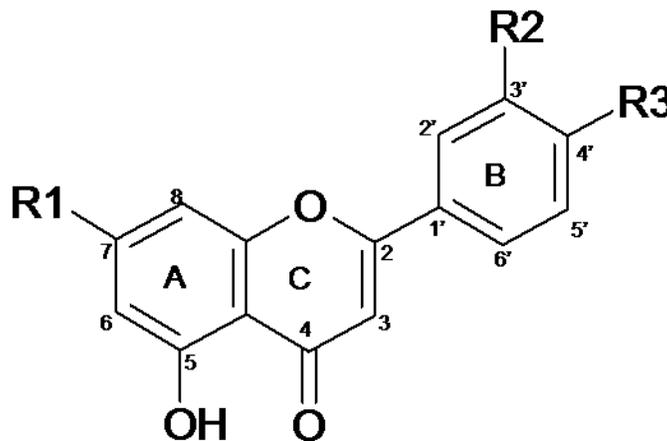


Figura 8. Estructura general de los flavonoides.

Juliania adstringens

Es una planta de uso antiguo, comúnmente conocida como Cuachalalate (**Apéndice 1**) de la cual se ha confirmado una actividad anti-bacteriana, anti-tumoral y anti-cancerígena. En varios estados de la República Mexicana se ha reportado el uso de *J. adstringens* para tratar úlceras, como anti-inflamatorios, cáncer de estómago, gastritis algunas lesiones cutáneas, para el tratamiento de fiebres intermitentes, paludismo, calentura, caída del cabello, afecciones respiratorias entre otras. La forma de empleo depende del tipo de afección, por ejemplo, las picaduras de mosquitos se curan mediante la ingestión o aplicación de la resina de la corteza. Algunas infecciones tales como las cutáneas o vaginales, se alivian mediante lavados con infusiones de la corteza [27-29].

ANTECEDENTES

Se ha reportado que la resina de los árboles femeninos de *J. adstringens* presentan altas concentraciones de ácidos masticadenónicos los cuales poseen actividad anti-inflamatoria [30].

En otros estudios se demostró que el extracto acuoso de *J. adstringens* presenta actividad anti-inflamatoria en un modelo de inflamación aguda causado por carragenina. Mientras que el extracto hexánico de *J. adstringens* posee actividad anti-inflamatoria en un modelo de inflamación aguda inducida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) [31].

Hay reportes que mencionan que los flavonoides presentes en las plantas figuran entre los metabolitos secundarios capaces de inhibir el proceso inflamatorio en las EII [25].

También se ha descrito que el extracto de la corteza de *J. adstringens* posee actividad antibacteriana sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, actividad anti-oxidante y presencia de fenilpropanoides [29].

Tras realizar una revisión bibliográfica se reportó que *J. adstringens* posee actividad anti-ulcerogénica, así como actividad anti-inflamatoria ante un modelo de colitis humana [32].

JUSTIFICACIÓN

Las EII representan un serio problema clínico ya que las personas que las padecen tienen un grave deterioro en su calidad de vida y un alto riesgo de desarrollar cáncer colon-rectal, pues se ha observado que los diferentes tratamientos comúnmente utilizados no son capaces de curar completamente los padecimientos y por encima de eso, presentan una serie de efectos secundarios adversos. Por esta razón y por todo lo anterior es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos que sean efectivos y menos dañinos para la salud del hombre.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad terapéutica del extracto etanólico de *Juliania adstringens* en un modelo murino de colitis experimental.

Objetivos particulares

Previamente se obtuvo el extracto etanólico de *Juliania adstringens* por el método de maceración y se determinó el rendimiento.

- a) Determinar la concentración óptima del extracto para utilizar como tratamiento.
- b) Determinar la sobrevida de los ratones tratados con el extracto de *Juliania adstringens*.
- c) Cuantificar el índice de actividad de la enfermedad (DAI) de ratones enfermos de colitis.
- d) Evaluar el efecto de *Juliania adstringens* sobre la longitud de los intestinos.
- e) Determinar el efecto de *Juliania adstringens* sobre el tamaño e integridad de las crestas intestinales mediante la técnica histológica convencional y la tinción Azul de Alcian.
- f) Cuantificar los niveles de la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa (SOD), Glutatión Peroxidasa (GPX) y Catalasa (CAT).
- g) Cuantificar la concentración de Fenoles totales del extracto.
- h) Cuantificar la concentración de Flavonoides en el extracto.
- i) Determinar la capacidad anti-oxidante del extracto.
- j) Caracterizar químicamente del extracto por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

MATERIALES Y MÉTODOS

Datos de los ratones

Se adquirieron ratones hembras *Mus musculus* cepa BALB/c del distribuidor Harlan de seis semanas de edad con un peso de $17.5\text{g} \pm 1\text{ g}$, los cuales se mantuvieron en condiciones estériles estándar de 12 h de luz/oscuridad a temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

Obtención del extracto

La colecta del material vegetal se realizó a finales del año 2012 y principios de 2013 en San Rafael Coxcatlán Puebla, que se localiza dentro de la región de Tehuacán-Cuicatlán, Reserva de la Biosfera.

La obtención del extracto se llevó a cabo por el método de maceración descrito por Domínguez, (1973). El material (corteza) fue pesado y colocado en trozos en un matraz con etanol durante dos días, para posteriormente obtener el extracto etanólico crudo que fue filtrado y destilado a presión reducida en un rotavapor marca IKA modelo HM10 digital.

Posteriormente, el extracto obtenido se colocó en charolas de vidrio para completar la evaporación del solvente y calcular el rendimiento total por diferencia de peso. Una vez que se obtuvo el extracto, se determinó el porcentaje de rendimiento.

Grupos experimentales

Los grupos experimentales fueron determinados aleatoriamente con una n de seis; Grupo control, ratones suministrados con agua potable estéril; Grupo DSS, ratones a los que se les administró diariamente DSS al 4% disuelto en agua potable estéril y Grupo DSS/Extracto, ratones a los que se les administró diariamente DSS al 4% disuelto en agua potable estéril y 100 μL de extracto de *J. adstringens* mediante una cánula gástrica metálica.

Determinación de la concentración óptima

Se establecieron grupos de seis animales a los que se les administró 100 μL de extracto a las concentraciones de 500, 250, 200, 150, 100 y 50 mg/Kg de peso diluyendo el extracto etanólico de *J. adstringens* en etanol al 50% y se llevó registro diariamente de la pérdida de peso durante 10

días y finalmente se sacrificaron los animales para obtener los intestinos gruesos y medirlos con un Vernier digital marca Mitutoyo modelo CD-12 [33].

Inducción de colitis por DSS a 4%

En los grupos DSS y grupo DSS/Extracto ($n=6$), se indujo la colitis mediante la administración de una disolución de DSS al 4% en agua potable estéril “ad-libitum” (peso/volumen) durante 10 días, monitoreando diariamente la supervivencia, pérdida de peso, sangrado rectal y la consistencia de las heces [15].

Administración de los extractos

Una vez determinada la concentración óptima se establecieron nuevamente los grupos experimentales ($n=6$) colitis a la par que se administraron vía oral 100 μ L del extracto mediante una cánula gástrica. A estos animales se les determinó diariamente el DAI [15].

Porcentaje de sobrevida

Una vez establecidos los grupos, se monitoreó diariamente el progreso de la enfermedad, para determinar si el tratamiento con el extracto prolongaba la sobrevida en el grupo experimental.

Índice de actividad de la enfermedad (DAI)

El índice de la actividad de la enfermedad que se utilizó incluye los siguientes parámetros [15]:

Valor	Peso	Diarrea	Sangrado
0	No hay pérdida de peso	Sin diarrea	Sin sangrado
1	Pérdida entre 1-5%	-----	-----
2	Pérdida entre 6-10%	Pérdida de la consistencia pero no de la forma	Sangrado ligero
3	Pérdida entre 11-15%	-----	-----
4	Pérdida mayor al 15%	Pérdida de la consistencia y forma	Sangrado abundante

Para el registro de la pérdida de peso se utilizó una balanza digital marca Velab modelo ES-1000.

Obtención y longitud del intestino

Los ratones fueron sacrificados al décimo día mediante dislocación cervical. Se expuso el lado ventral de los ratones, asegurando las patas para evitar la obstrucción al acceso del abdomen. Se limpió perfectamente el abdomen del animal con alcohol etílico al 70%. Después de esto, se realizó un corte en la base del abdomen, se extendió la piel hasta descubrir por completo el contenido abdominal, se identificó el ciego gástrico, el intestino delgado e intestino grueso cuidando de no dañar los tejidos, y una vez identificados se extrajeron haciendo una incisión en la base del ciego y en la base del ano. Finalmente se extendió el tejido sobre un vidrio y se midió con un Vernier marca Mitutoyo modelo CD-12, ya que esta medida también es indicador de la gravedad de la lesión dado que la colitis aumenta el edema y reduce la longitud total del colon [34, 35].

Preparación para histología y obtención del homogeneizado

Para evaluar el efecto del extracto etanólico de *J. adstringens*, con una jeringa para insulina, se intubó una cánula en el colon y se procedió a lavar con una solución tamponada con fosfato (PBS) frío hasta que el efluente salió limpio de heces, para los análisis histológicos del colon se realizó la técnica descrita por Whitem [35]. Se utilizó la técnica convencional histología descrita por García [36] para analizar el daño causado al tejido. Para el homogeneizado, los intestinos gruesos fueron lavados perfectamente con PBS frío. Se agregaron perlas de óxido de zirconio (0.5 mm de diámetro, Next Advance, Cambridge, MA) lavadas y esterilizadas en un volumen igual al del tejido. Posteriormente se agregó buffer de lisis isotónico (1 mM EDTA, 50 mM HEPES-NaOH, pH 7.9, 250 mM NaCl, 20 mM β -glicerofosfato, 1 mM ortovanadato, 1% NP-40, 1 mM DTT) al tejido y a las perlas en un volumen igual al del tejido. Esto fue homogeneizado mecánicamente con el Bullet Blender (Next Advance, Cambridge, MA) a 4°C por rotación a 4°C durante 9 minutos. Los tejidos homogeneizados fueron centrifugados 20 min a 4°C; los sobrenadantes se almacenaron a -70°C [37].

Índice de daño Histológico

Una vez obtenidos los cortes histológicos, la puntuación para evaluar el daño histológico fue dividida en dos categorías: infiltrado inflamatorio y ulceración. El infiltrado inflamatorio fue evaluado en cada capa del colon, incluyendo el epitelio superficial, criptas, estroma, submucosa y la capa transmural. Se asignaron valores en una escala de 0 a 3, quedando los parámetros de la siguiente forma:

Valor	Infiltrado inflamatorio
0	No hay
1	Leve
2	Moderado
3	Severo

A la extensión del daño se le asignaron los siguientes valores:

Valor	Extensión del daño
0	No hay
1	En la capa mucosal
2	En la capa de la submucosa
3	En la capa transmural

Al daño en las criptas se les asignó una escala de 0 a 4, quedando de la siguiente manera:

Valor	Daño de la cripta
0	No hay
1	Primer tercio basal dañado
2	Dos tercios dañados
3	Pérdida total de la cripta

Al final, la suma de las puntuaciones arroja valores mínimos y máximos entre 0 y 9 puntos, siendo los valores más altos los que representan el daño más severo. Se analizaron cinco laminillas de cada colon [38].

Fenoles totales

La concentración de fenoles totales (CFT) se midió por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción por medio del reactivo de Folin-Ciocalteu. El extracto de referencia fue ácido gálico por su estabilidad y estructura fenólica. El extracto estándar de *J. adstringens* se preparó a una concentración de (0.2 mg/mL) (**Apéndice 2**). El ensayo fue realizado por triplicado.

Concentración de Flavonoides

La concentración de flavonoides totales se midió por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción tal como describe Tumalan-Gil [39] (**Apéndice 3**).

Capacidad anti-oxidante

La evaluación de la capacidad anti-oxidante se llevó a cabo mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) método modificado de Murillo [40] (**Apéndice 4**), para determinar la CA_{50} del extracto de *J. adstringens*.

Determinación de la actividad enzimática de la SOD, GPX, y CAT

Para determinar los niveles de enzimas, se siguieron las especificaciones de los kits del distribuidor CAYMAN (**Apéndice 5**).

Caracterización química

Del extracto etanólico se realizó una caracterización química por medio de un análisis de HPLC, posteriormente del extracto etanólico se realizaron dos particiones, una hexánica y una con cloroformo las cuales fueron analizadas mediante un CG-EM con un Cromatógrafo de Gases Modelo 6850 y un Espectrómetro de Masas Modelo 5975 C. Columna RTX 30 m. de largo por 0.25 mm de diámetro interno por 25 micras de película [41].

Condiciones de corrida:

- a) Temperatura del inyector: 250°C
- b) Modo de inyección: Split
- c) Radio: 33.5:1
- d) Flujo del Split: 29.9 mL/mn
- e) Flujo de corrida: 35 cm/s

Horno:

- a) Temperatura inicial: 70°C
- b) Rampa de calentamiento: 8°C por minuto hasta 270°C., segunda rampa: 10°C por minuto hasta 290°C, se mantiene 6 min.
- c) Tiempo de corrida total: 35 min.
- d) Línea de transferencia: 290°C.

Análisis estadístico

Para determinar si existía o no diferencia significativa entre los grupos, la sobrevida se analizó mediante la prueba de Mantel-Cox con una $P < 0.0001$, las pruebas cuantitativas (longitud de intestino y actividad enzimática) se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) con un valor de $P < 0.05$. Las pruebas cualitativas (DAI e índice histológico) se analizaron mediante la técnica de Kruskal-Wallis con un valor de $P < 0.05$. Los análisis fueron realizados con el software GraphPad Prism 6.

RESULTADOS

Rendimiento del extracto

La corteza de *J. adstringens* (Cuachalalate) fue recolectada a finales del año 2012 y principios de 2013 en la región de Tehuacán-Cuicatlán, Reserva de la Biosfera, en la localidad de San Rafael Coxcatlán, Puebla. El rendimiento del extracto etanólico crudo de la corteza de *J. adstringens* (Cuachalalate) es el que se observa en la **Tabla 1**.

Especie	Rendimiento en gramos	Rendimiento en %
<i>J. adstringens</i>	218.71	39.41%

Tabla 1. Rendimiento del extracto de la corteza de *J. adstringens* en gramos y porcentaje.

Concentración óptima para utilizar como tratamiento

Tras evaluar las diferentes concentraciones (50,100, 150, 200, 250 y 500 mg/Kg) del extracto, se observó que a la concentración de 200 mg/Kg se mantiene más estable el peso en los diferentes grupos a lo largo del experimento, así como, la mayor longitud del intestino, que es de gran importancia debido a que la longitud del colon se relaciona directamente con la gravedad de la colitis inducida por DSS, debido a esto es que para los experimentos posteriores se utilizó esta concentración.

Sobrevida

La mortalidad comenzaron a observarse al día 13, sin embargo, el grupo DSS alcanzó el 100% de mortalidad al día 16, mientras que el grupo DSS/Extracto, registraba un 15% de mortalidad para el mismo día (**Figura 9**).

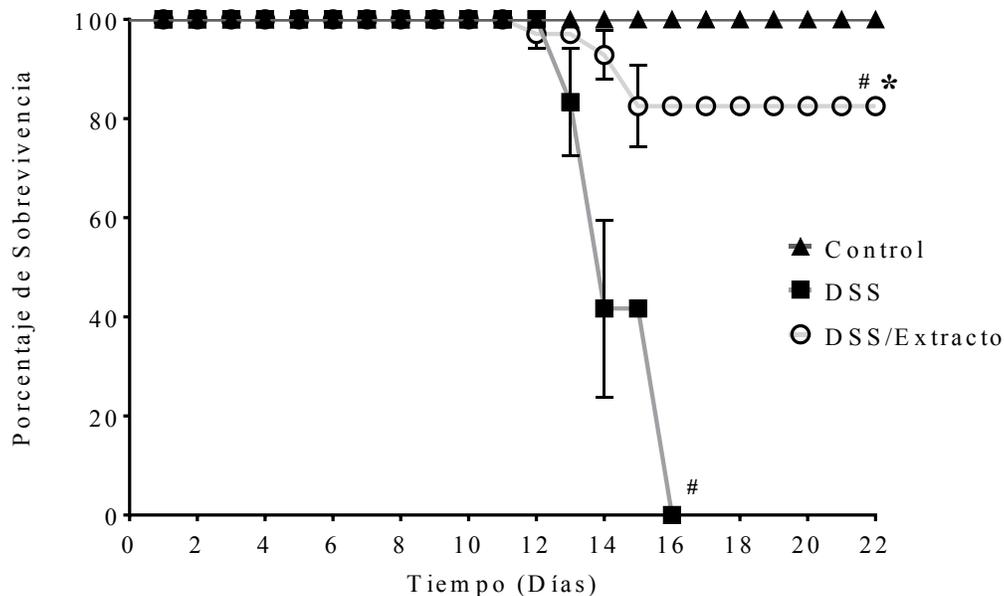


Figura 9. Curvas de sobrevida de los grupos control (tratados con agua potable), DSS (4% peso/volumen) y DSS/Extracto (DSS al 4% peso/volumen y 100 mL a una concentración de 200 mg/Kg), todos los grupos con una n=6. Donde se puede apreciar que el extracto disminuye la mortalidad. #: Diferencia significativa respecto al control; *: Diferencia significativa respecto al grupo DSS (Mantel-Cox $P<0.0001$).

Índice de actividad de la enfermedad (DAI)

Durante los 10 días de tratamiento con DSS, de los grupos control, DSS y DSS/Extracto, se registró la pérdida de peso, la presencia-ausencia de sangre en las heces y la presencia-ausencia de diarrea, siendo 12 el valor máximo de la enfermedad. A partir del segundo día los animales pertenecientes a los grupos DSS y DSS/Extracto comenzaron a presentar los signos de la enfermedad y mantuvieron un comportamiento similar hasta el día siete, ya que para el día ocho los animales del grupo DSS comenzaron a aumentar drásticamente el DAI alcanzando tres animales el valor máximo de 12, mientras que los animales tratados con 200 mg/Kg de extracto presentaron un menor índice, alcanzando una media de tres. En la **Figura 10** se muestran los valores medios por grupo a lo largo del experimento.

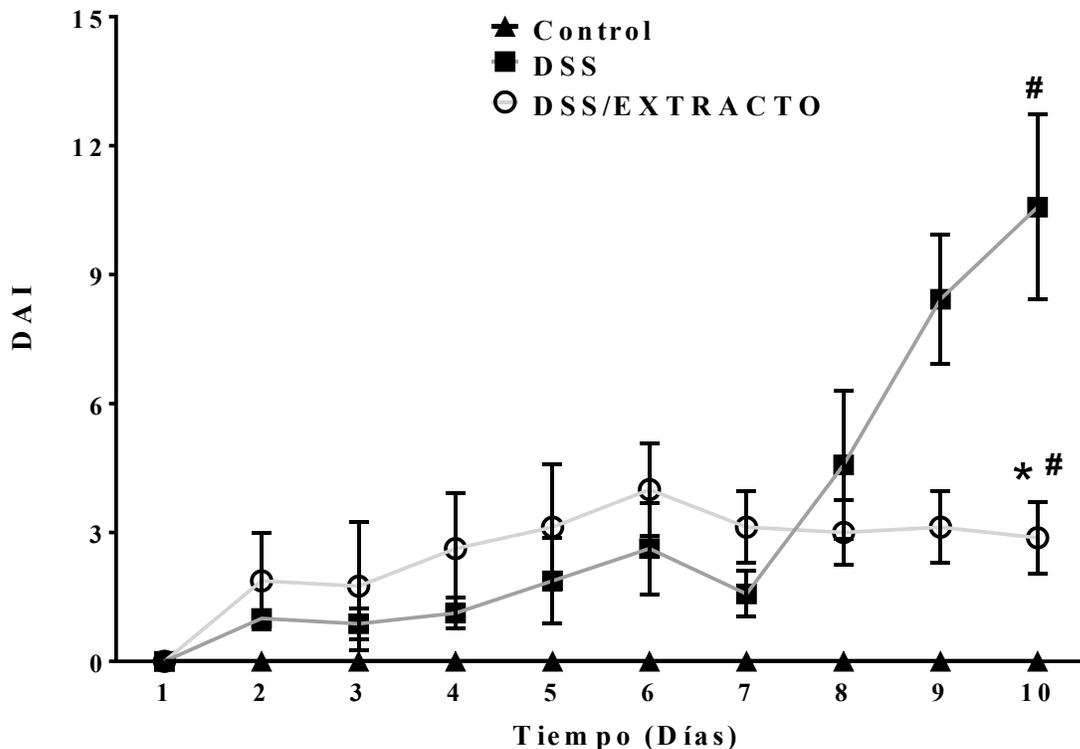


Figura 10. Índice de actividad de la enfermedad de los grupos control (tratados con agua potable), DSS (4% peso/volumen) y DSS/Extracto (DSS al 4% peso/volumen y 100 mL a una concentración de 200 mg/Kg), todos los grupos con una n=6. Se puede apreciar que el extracto disminuye los síntomas de la colitis entre los grupos. #: Diferencia significativa respecto al control; *: Diferencia significativa respecto al grupo DSS (Kruskal-Wallis $P < 0.05$).

Longitud del colon

Una característica de la colitis ulcerativa inducida por DSS, es que la longitud del colon se relaciona directamente con la gravedad de la colitis inducida. Por esto, es que al día 10, los animales de los tres grupos fueron sacrificados y los intestinos gruesos fueron extraídos y medidos (**Figura 11**). Se encontró que existe una diferencia significativa de la longitud de los intestinos gruesos entre el grupo control y el DSS/Extracto, así como, entre el grupo DSS/Extracto y el grupo DSS a una concentración de 200 mg/Kg (**Figura 12**).

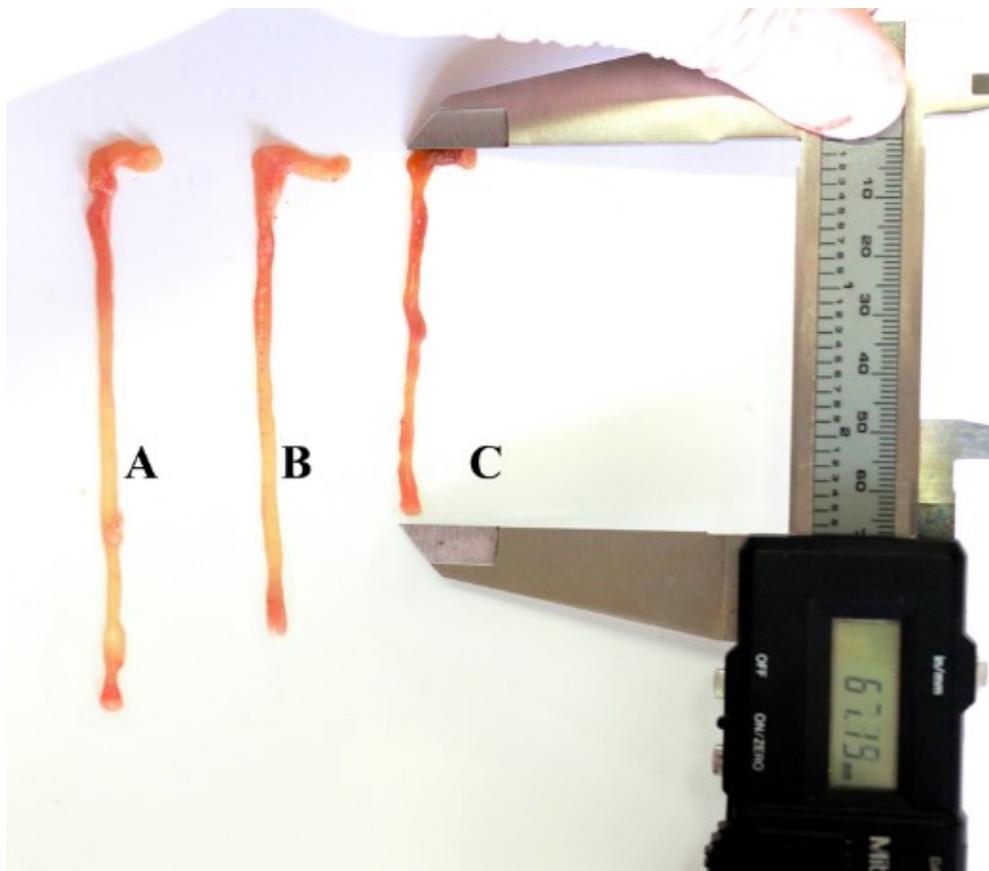


Figura 11. Longitudes de los intestinos gruesos obtenidos al día del sacrificio (A) Grupo control, (B) Grupo DSS/Experimental y (C) Grupo DSS.

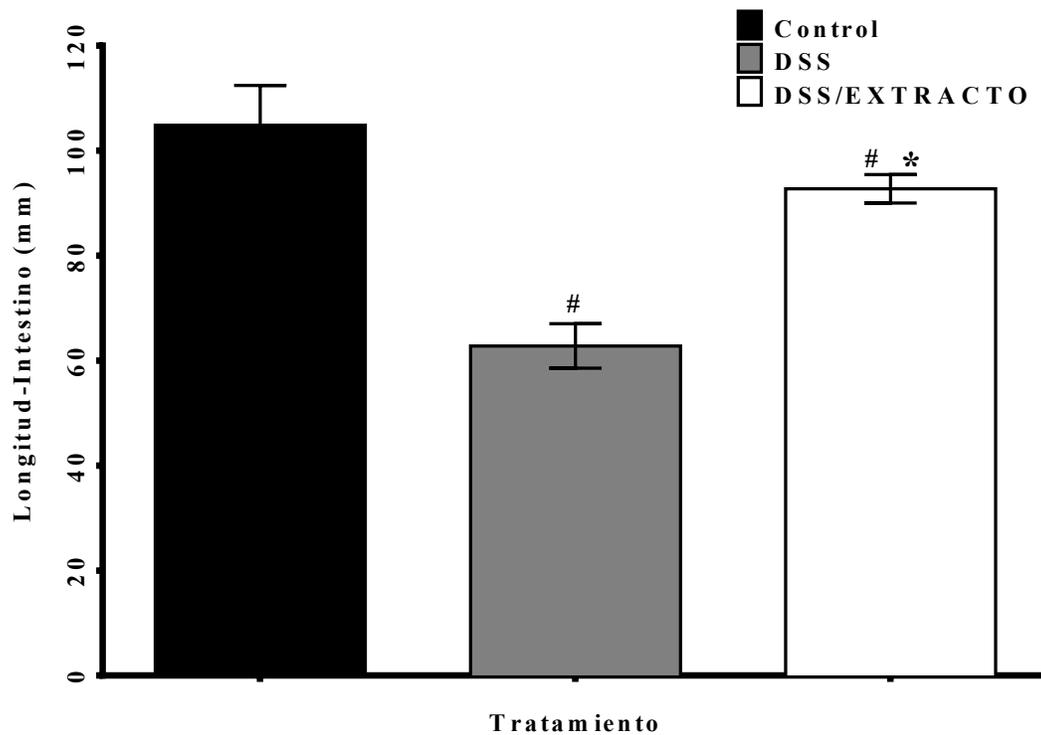


Figura 12. Longitud de los intestinos gruesos al día 10 de los grupos control (tratados con agua potable), DSS (4% peso/volumen) y DSS/Extracto (DSS al 4% peso/volumen y 100 mL a una concentración de 200 mg/Kg), todos los grupos con una n=6. Se puede apreciar que el grupo tratado con el extracto mantiene una mayor longitud que el grupo DSS. #: Diferencia significativa respecto al control; *: Diferencia significativa respecto al grupo DSS (ANOVA de una vía $P<0.05$).

Daño a la integridad de las crestas intestinales

Para determinar si la estructura morfológica del colon de los diferentes grupos experimentales (tratados con DSS) se ve afectada o comprometida, se realizaron cortes histológicos los cuales fueron teñidos con H&E. El análisis histológico reveló que los ratones del grupo DSS mostraron cambios típicos de inflamación en la arquitectura del tejido del colon, tales como pérdida de la integridad del tejido, daño en las criptas y pérdida de las células caliciformes así como un elevado infiltrado celular. Sin embargo, el colon de los ratones del grupo DSS/Extracto, mostraron una reducción significativa del infiltrado inflamatorio, así como, un menor daño de la mucosa y las criptas **Figura 13 y 14**. Los resultados demuestran que la administración del extracto etanólico de *J. adstringens* (200 mg/Kg) disminuye el daño histológico ocasionado por el DSS y esta disminución es estadísticamente significativa ($P < 0.0001$) (**Figura 15**).

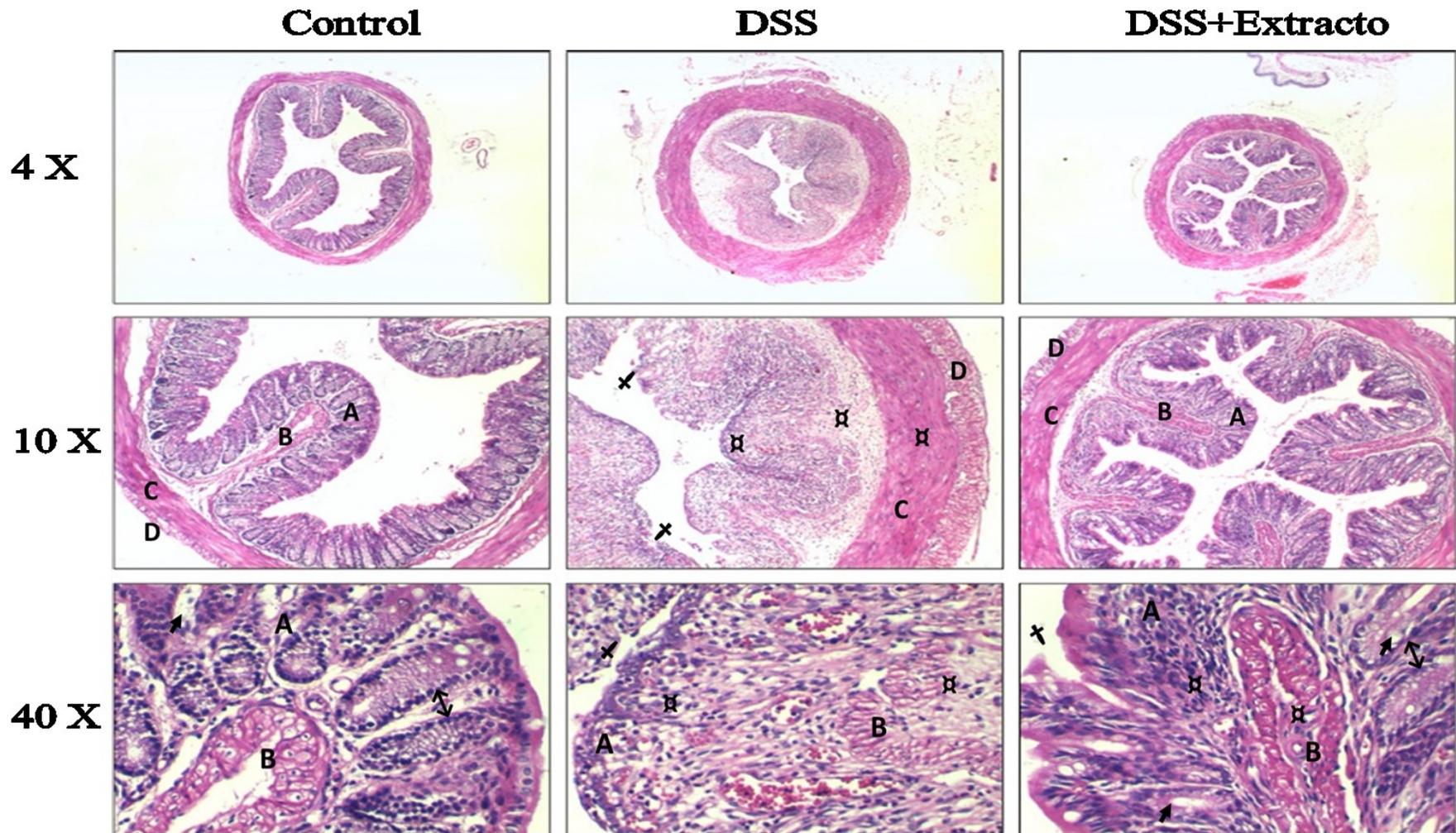


Figura 13. Histología de los colon H&E de los grupos control (tratados con agua potable), DSS (4% peso/volumen) y DSS/Extracto (DSS al 4% peso/volumen y 100 mL a una concentración de 200 mg/Kg), todos los grupos con una n=6. Se puede apreciar que el grupo tratado con el extracto mantiene una arquitectura más íntegra que el grupo DSS, sin embargo si se muestran daños en el epitelio, así como, infiltrado inflamatorio. **A:** Mucosa; **B:** Submucosa; **C:** Músculo; **D:** Serosa; ↕: Cripta; †: Presencia de infiltrado inflamatorio; †: Erosión del epitelio; →: Células caliciformes.

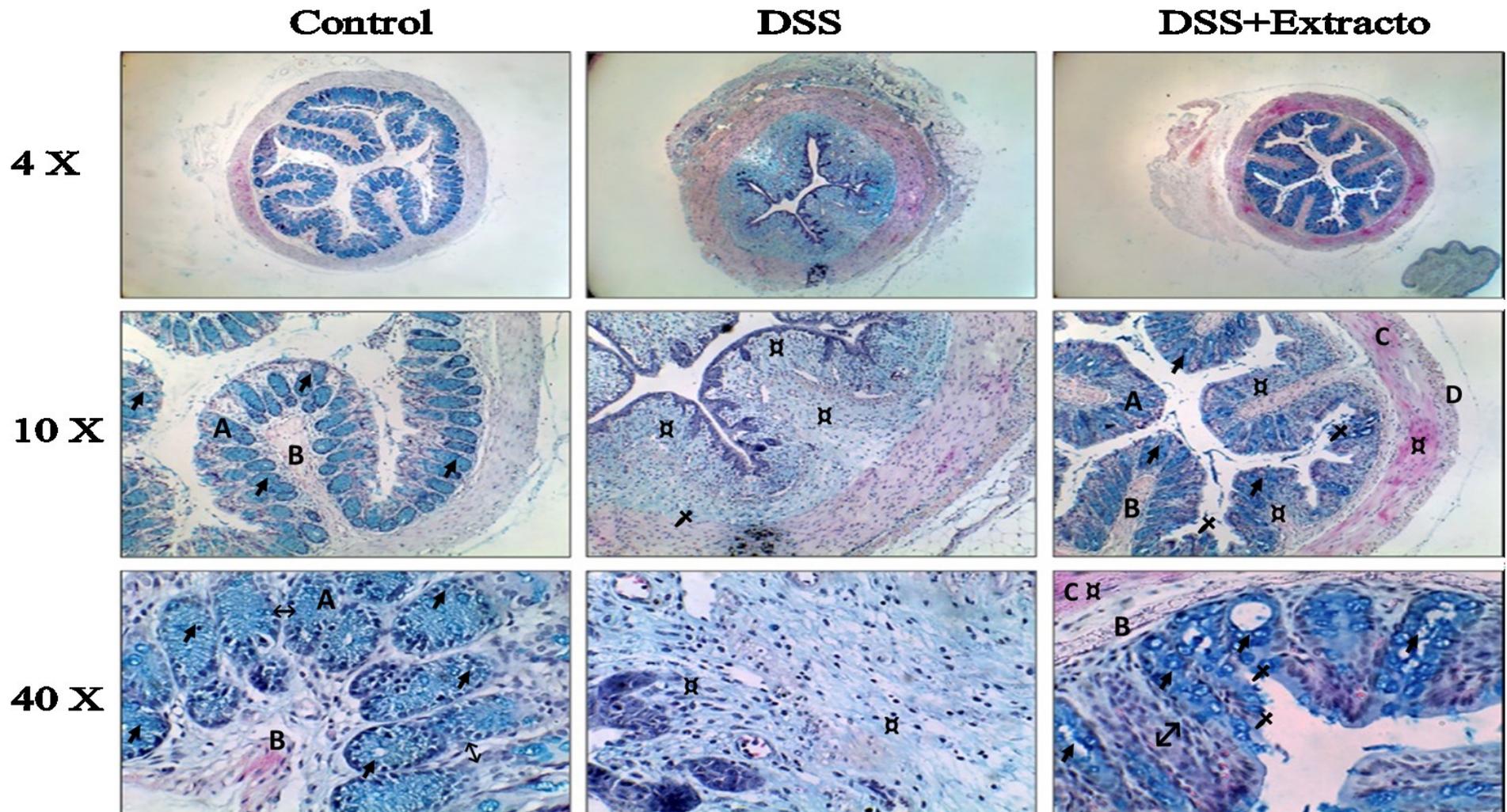


Figura 14. Histología de los colon Azul de Alcian de los grupos control (tratados con agua potable), DSS (4% peso/volumen) y DSS/Extracto (DSS al 4% peso/volumen y 100 mL a una concentración de 200 mg/Kg), todos los grupos con una n=6. Se puede apreciar que el grupo tratado con el extracto presenta un mayor número de células caliciformes que el grupo DSS, sin embargo si se muestran daños en el epitelio, así como, infiltrado inflamatorio. A: Mucosa; B: Submucosa; C: Músculo; D: Serosa; ↑: Cripta; □: Presencia de infiltrado inflamatorio; †: Erosión del epitelio; →: Células caliciformes.

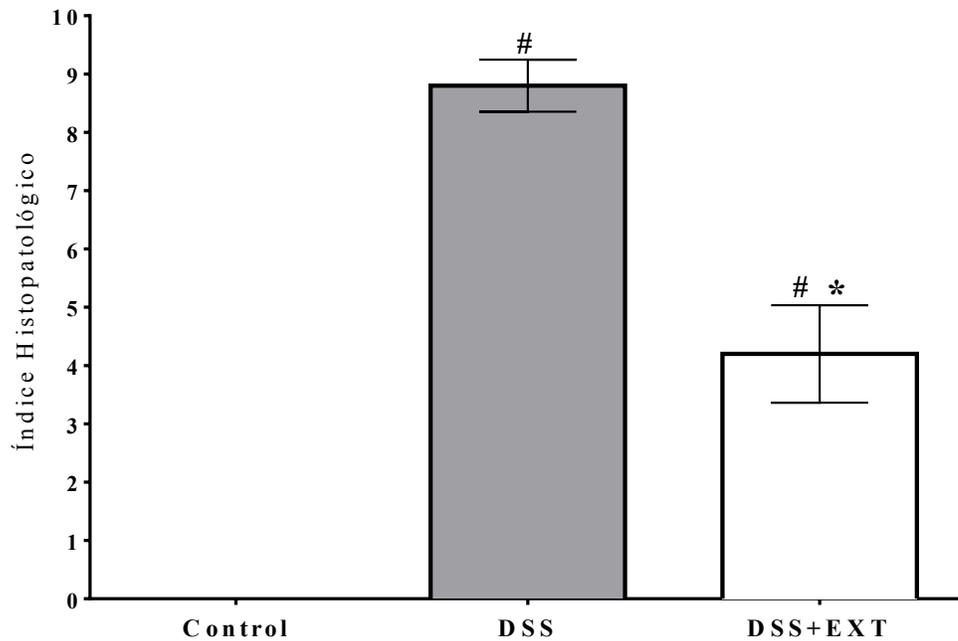


Figura 15. Índice histopatológico de los grupos control (tratados con agua potable), DSS (4% peso/volumen) y DSS/Extracto (DSS al 4% peso/volumen y 100 mL a una concentración de 200 mg/Kg), todos los grupos con una n=6. Se pudo observar que el grupo DSS/Extracto presenta un menor daño en la integridad de los intestinos gruesos respecto al grupo DSS. #: Diferencia significativa respecto al control; *: Diferencia significativa respecto al grupo DSS (Kruskal-Wallis $P < 0.05$, se analizaron 5 laminillas por animal).

Fenoles, Flavonoides y Capacidad anti-oxidante del extracto

Teniendo el antecedente que dentro de los metabolitos secundarios, a los fenoles se les atribuyen muchas de las propiedades medicinales que poseen los productos naturales, es que se determinó la concentración de fenoles totales, encontrando una concentración de 276 mgeAG/g de extracto lo cual corresponde al 27.6% del extracto. Así dentro de la familia de los fenoles, los flavonoides son los compuestos que se encuentran reportados por poseer una buena actividad anti-oxidante al igual que una buena actividad anti-inflamatoria, por ello es que se determinó la concentración de flavonoides presentes en el extracto, encontrando una concentración de 10.37 mg/mL. Finalmente, se determinó la capacidad anti-oxidante (CA) mediante la prueba de DPPH, utilizando a la Quercetina como control positivo donde el extracto de *J. adstringens* mostró una CA₅₀ de 36.040 µg/mL (**Tabla 2**).

Parámetros estudiados	Valores encontrados
Fenoles	276 mgeAG/g
Flavonoides	10.37 mgeQ/g
Capacidad anti-oxidante CA ₅₀ del Quercetina	4 µg/mL
Capacidad anti-oxidante CA ₅₀ del extracto	36.040 µg/mL

Tabla 2. Determinación fitoquímica del extracto.

Niveles de la actividad enzimática de la SOD, GPX y CAT.

Se sabe que en la colitis, las especies reactivas de oxígeno son a las que se les atribuye en buena parte el daño a la mucosa y al comprobar que el extracto posee una buena capacidad anti-oxidante se decidió cuantificar la actividad de las enzimas anti-oxidantes: Superóxido dismutasa, Glutación peroxidasa y Catalasa en el colon un homogenizado de este tejido.

Al administrar el extracto etanólico de *J. adstringens* y cuantificar la actividad de la SOD, se pudo observar que la actividad de la enzima se incrementó respecto al grupo control y al grupo DSS, la función principal de esta enzima es formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y O_2 , a O_2^- y agua (**Figura 16**). El siguiente paso de la protección anti-oxidante del cuerpo es la participación de la GPx la cual consiste en eliminar los hidroperóxidos orgánicos e inorgánicos como el H_2O_2 a O_2 y agua, en ésta se pudo observar que la actividad de las enzimas fue igual en el grupo DSS/Extracto que en el grupo control **Figura 17**. Finalmente la Catalasa en la que no se observó una diferencia significativa entre los diferentes grupos observados y que tiene como función transformar el H_2O_2 en agua **Figura 18**.

Las diferencias significativas se determinaron mediante un ANOVA de una vía con una $P < 0.05$.

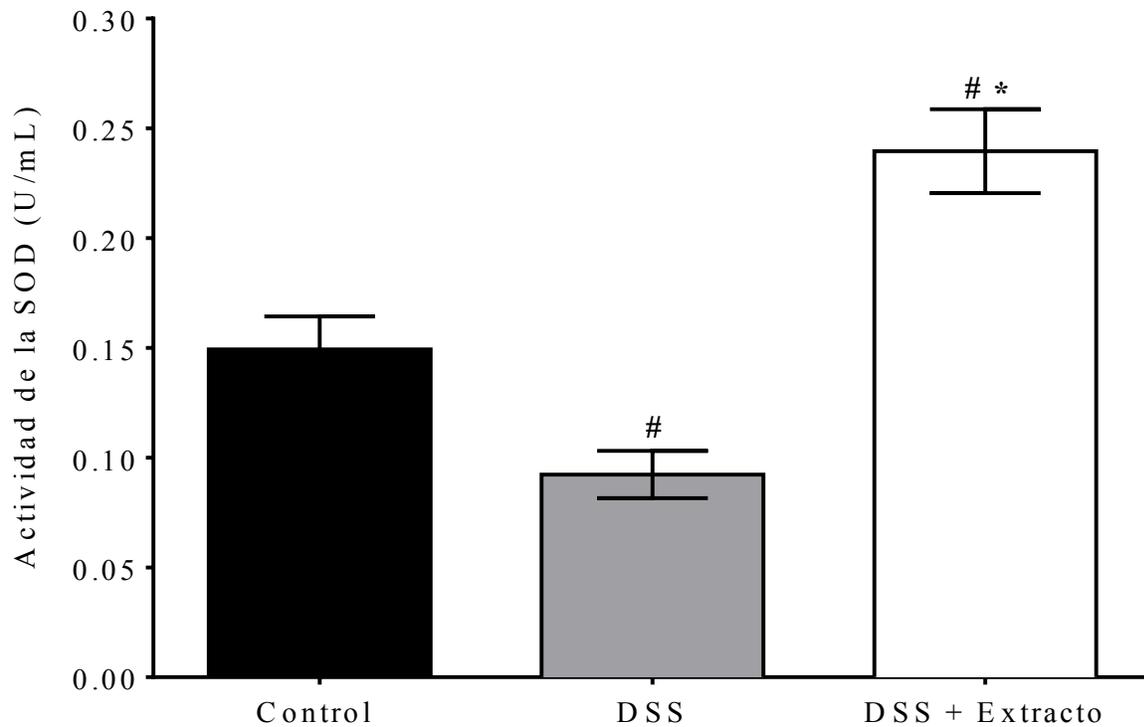


Figura 16. Niveles de actividad de la enzima Superóxido dismutasa (SOD) en el tejido (U/mL) de los grupos control (tratados con agua potable), DSS (4% peso/volumen) y DSS/Extracto (DSS al 4% peso/volumen y 100 mL a una concentración de 200 mg/Kg), todos los grupos con una n=6. Se pudo observar que el grupo DSS/Extracto presenta una mayor actividad inclusive respecto al grupo control. #: Diferencia significativa respecto al control; *: Diferencia significativa respecto al grupo DSS (ANOVA de una vía $P<0.05$).

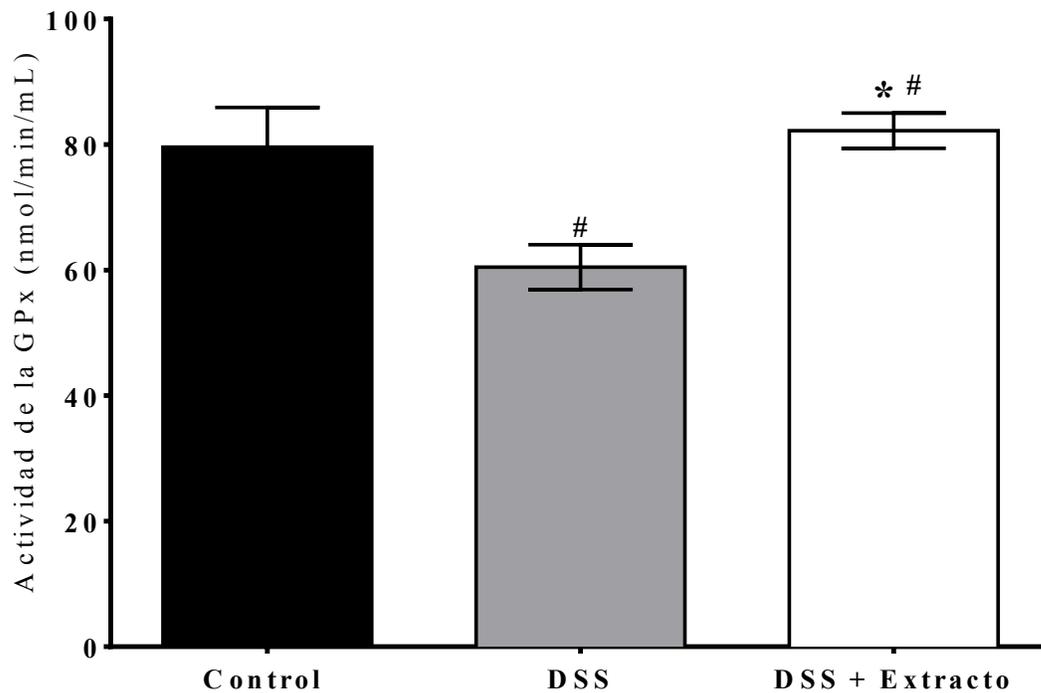


Figura 17. Niveles de actividad de la enzima Glutathión peroxidasa (GPx) en el tejido (nmol/min/mL) de los grupos control (tratados con agua potable), DSS (4% peso/volumen) y DSS/Extracto (DSS al 4% peso/volumen y 100 mL a una concentración de 200 mg/Kg), todos los grupos con una n=6. Se pudo observar que el grupo DSS/Extracto presenta una actividad semejante a la del grupo control pero no así al grupo DSS. #: Diferencia significativa respecto al control; *: Diferencia significativa respecto al grupo DSS (ANOVA de una vía $P < 0.05$).

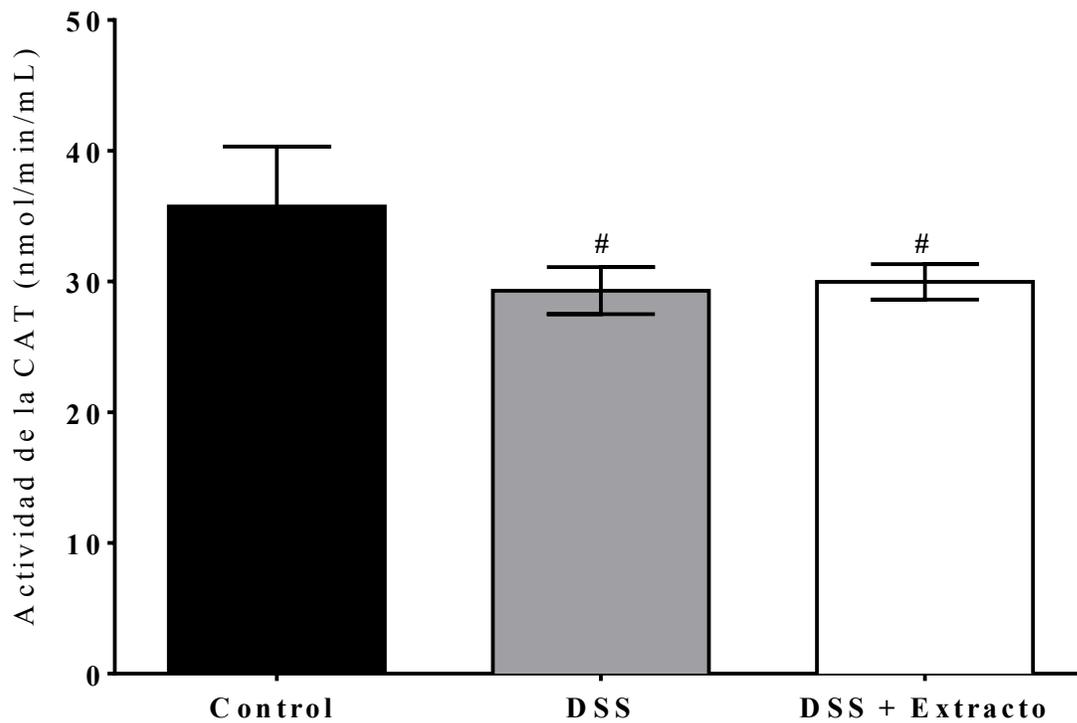


Figura 18. Niveles de actividad de la enzima Catalasa (CAT) en el tejido (nmol/min/mL) de los grupos control (tratados con agua potable), DSS (4% peso/volumen) y DSS/Extracto (DSS al 4% peso/volumen y 100 mL a una concentración de 200 mg/Kg), todos los grupos con una n=6. Se pudo observar que el grupo DSS/Extracto presenta una actividad semejante al grupo DSS. #: Diferencia significativa respecto al control (ANOVA de una vía $P < 0.05$).

Caracterización química del extracto por HPLC y (CG-EM)

HPLC

Mediante la cromatografía líquida de alta resolución se logró identificar y, cuantificar los compuestos polares y de mediana polaridad presentes en *J. adstringens* a través de su tiempo de retención y a sus espectros de UV, los cuales se observan en el cromatograma se pueden observar 11 picos (**Figura 19**), los datos de éstos se muestran en el **Cuadro 5**.

CG-EM

A través de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se logró separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles de los compuestos presentes en *J. adstringens*. Cada uno de los compuestos presentes en el extracto, se registra en forma de pico cromatográfico teniendo como base su tiempo de retención y la abundancia (**Figura 20 extracción hexánica y Figura 21 extracción con cloroformo**). Se identifican mediante su espectro de masas obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados cuando pasan al espectrómetro de masas. Cabe mencionar que no todos los compuestos fueron identificados debido a que la base de datos no cuenta con todos los metabolitos secundarios que poseen las plantas, por lo que se analizan con respecto a los patrones conocidos hasta el momento. Sin embargo, abre la posibilidad de encontrar compuestos dentro de este extracto que no se hayan descrito anteriormente al aislar cada uno de los metabolitos secundarios presentes dentro del mismo (**Cuadro 6**)

Las actividades biológicas de los compuestos encontrados, se reportan en el **Cuadro 7**.

Comatograma del extracto por HPLC

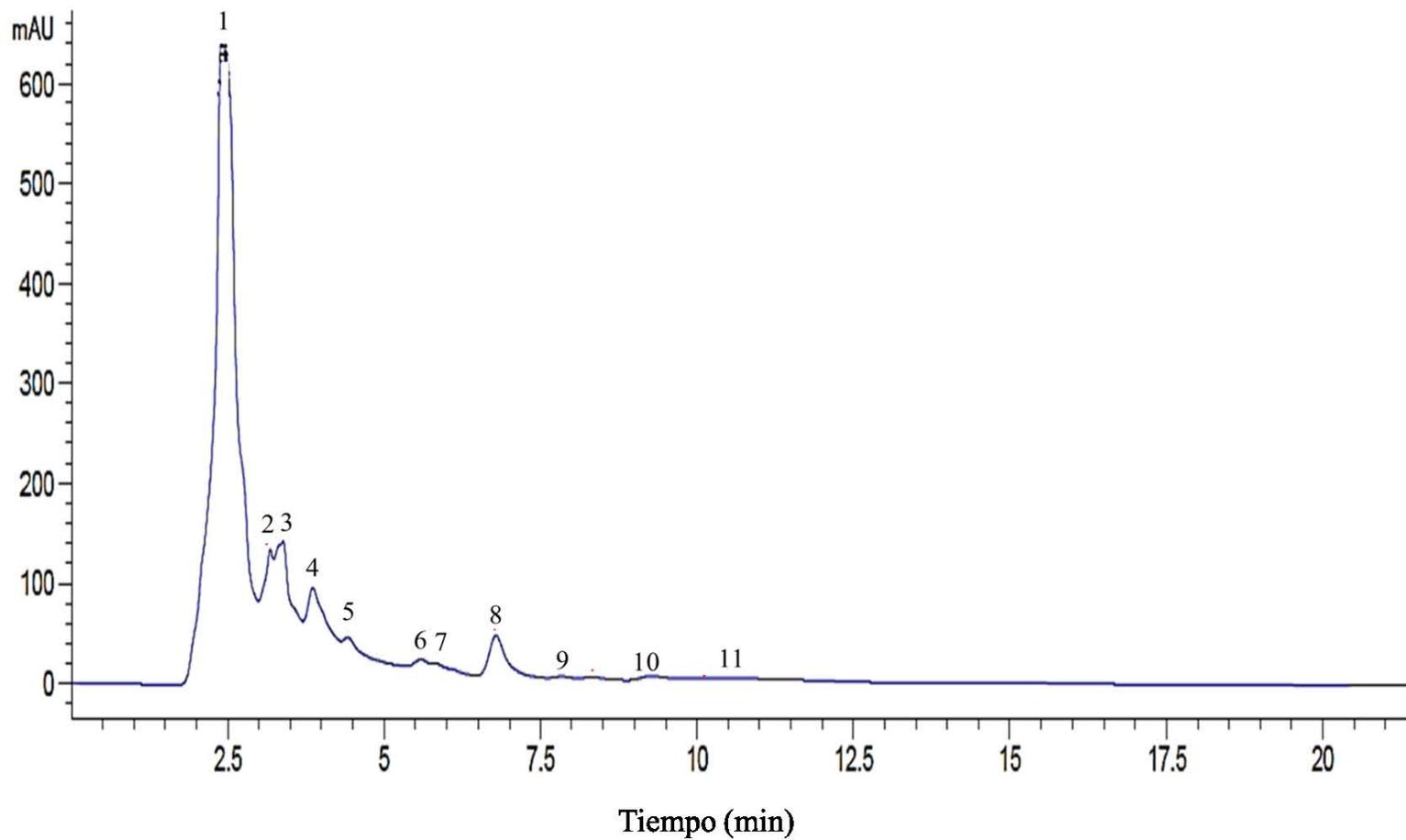


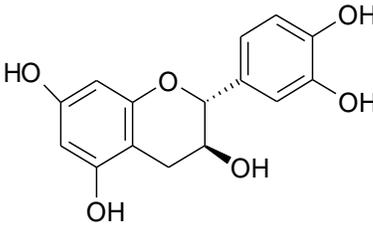
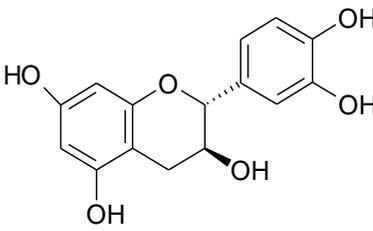
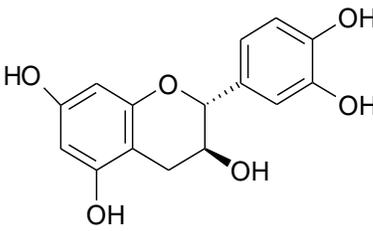
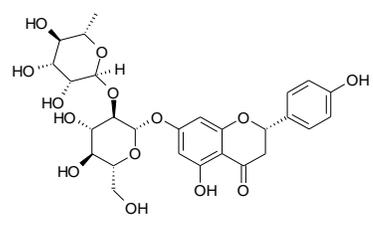
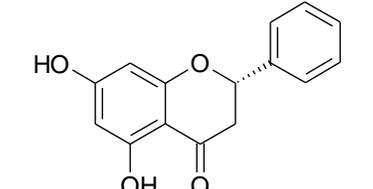
Figura 19. Cromatograma de *J. adstringens* en HPLC.

“Actividad terapéutica del extracto etanólico de *Juliania adstringens* en un modelo murino de colitis experimental”

Cuadro 5. Compuestos identificados mediante HPLC en el extracto etanólico de *J. adstringens*.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	% de abundancia	UV λ_{max} (nm)	Tipo de compuesto	Estructura química
1	2.4	32.98	280	Catequina	
2	3.2	3.05	202, 278	Catequina	
3	3.37	5.37	280	Catequina	
4	3.87	4.72	280	Catequina	
5	4.42	3.39	275	Catecol	

“Actividad terapéutica del extracto etanólico de *Juliania adstringens* en un modelo murino de colitis experimental”

6	5.59	1.02	280	Catequina	
7	5.81	1.21	280	Catequina	
8	6.79	2.48	285, 305	NI	NI
9	7.83	0.42	275	Catequina	
10	9.28	0.78	295,370	Naringenina	
11	10.11	2,26	290	Pinocembrina	

Cromatograma del extracto por (CG-EM)

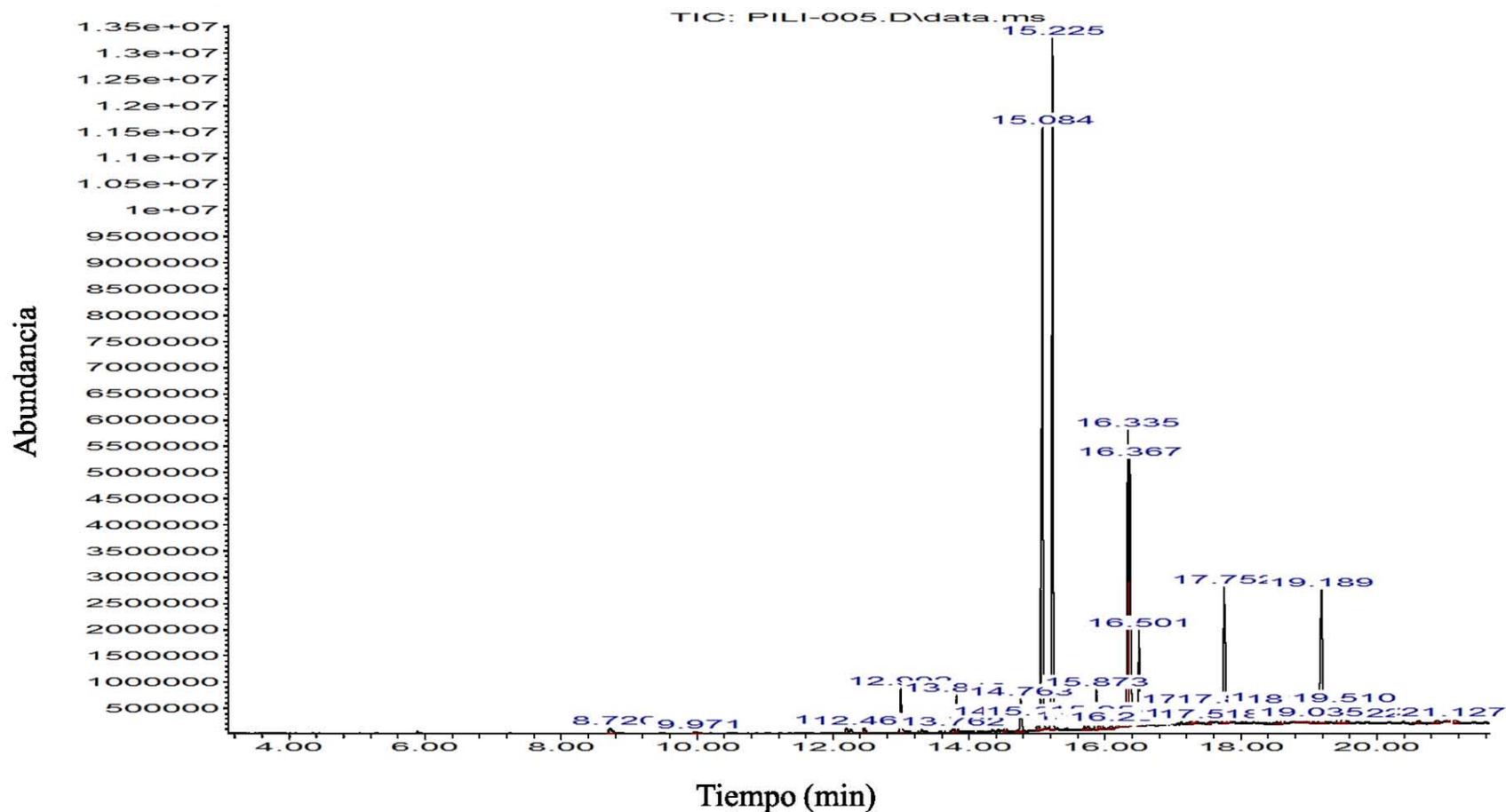
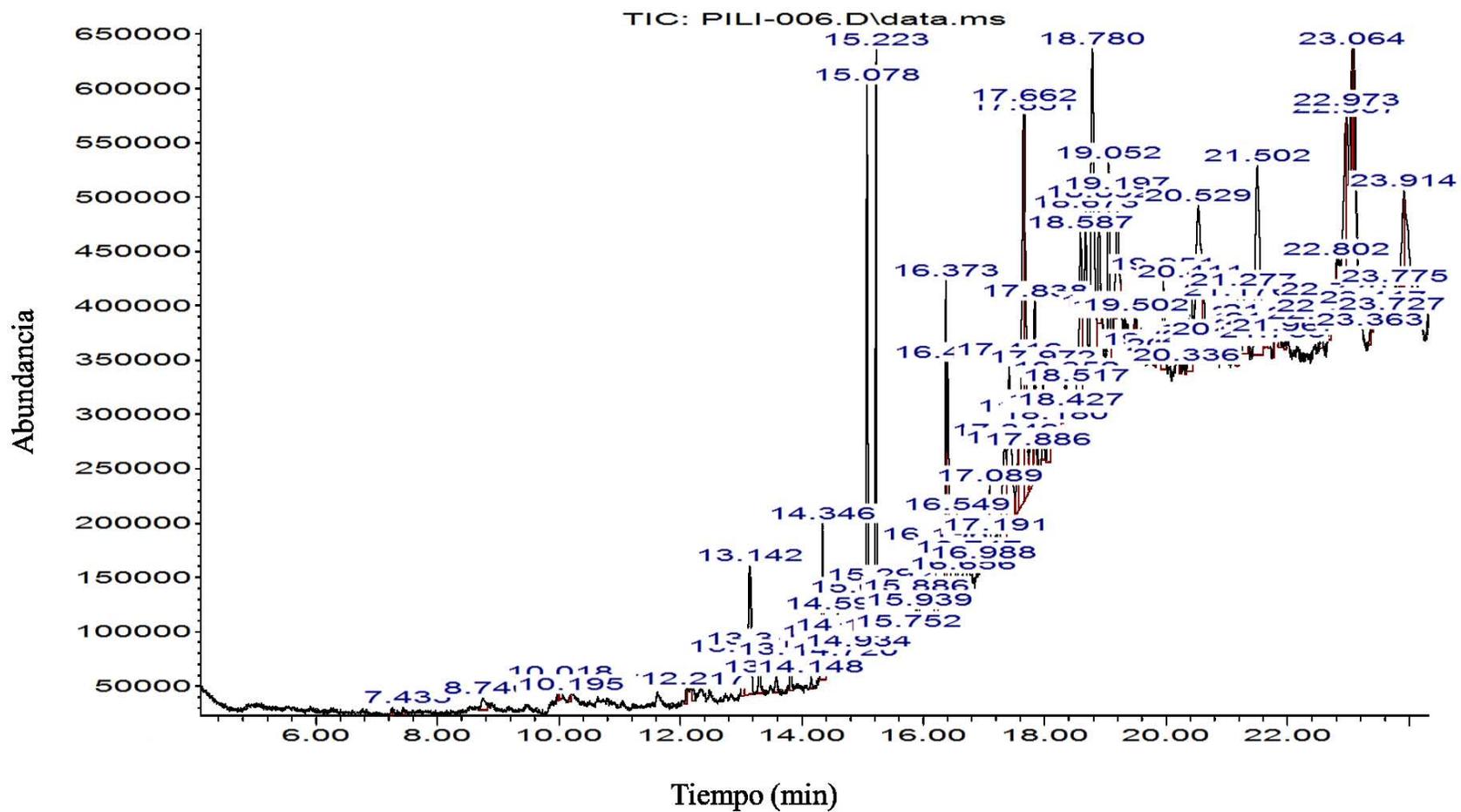
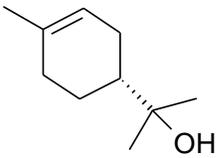
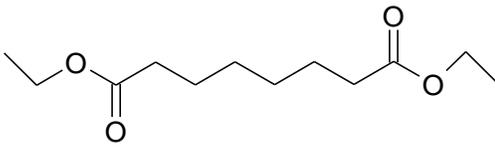
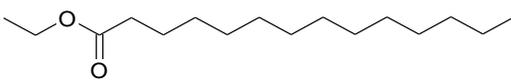
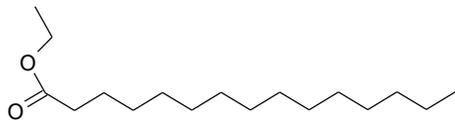
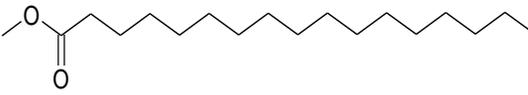
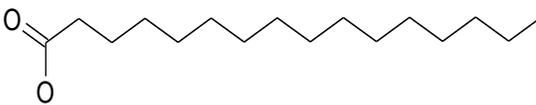
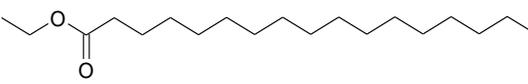


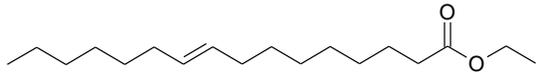
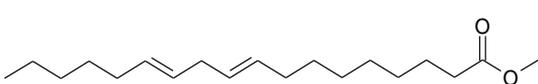
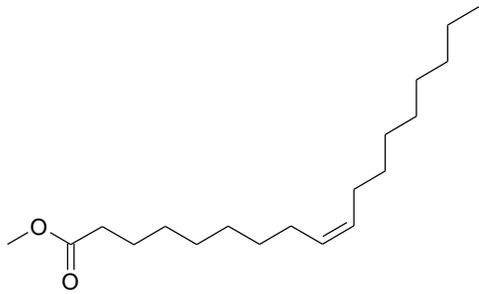
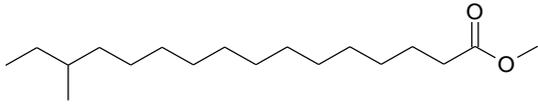
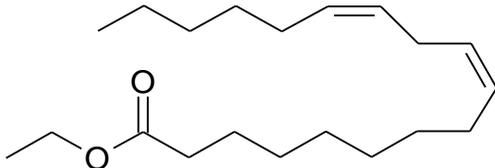
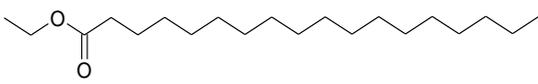
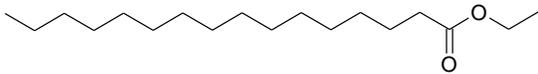
Figura 20. Cromatograma de *J. adstringens* de una extracción hexánica.



Cuadro 6. Compuestos identificados mediante CG-EM en el extracto etanólico de *J. adstringens*.

Compuesto	Tiempo de retención	(%) Abundancia	Nombre	Formula
Hexano				
12	8.720	0.441	α -Terpineol	
13	9.971	0.247	NI	NI
14	12.190	0.346	Dietil suberato	
15	12.460	0.287	NI	NI
16	12.992	1.999	NI	NI
17	13.762	0.126	NI	NI
18	13.813	0.197	Éster etílico del ácido mirístico	
19	14.532	0.404	Éster metílico del ácido pentadecanoico	
20	14.763	1.266	Éster metílico del ácido palmítico	
21	15.013	0.432	Ácido palmítico	
22	15.225	24.943	Éster metílico del ácido margárico	
23	15.699	0.157	NI	NI

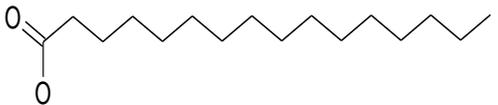
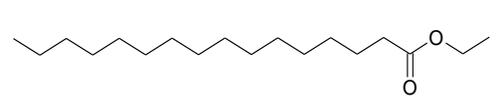
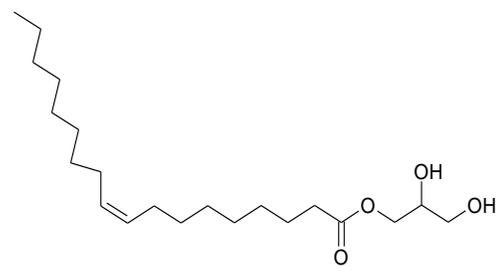
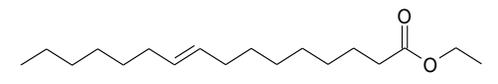
“Actividad terapéutica del extracto etanólico de *Juliania adstringens* en un modelo murino de colitis experimental”

24	15.744	0.255	Éster etílico del ácido palmítico	
25	15.918	0.451	Éster metílico del ácido linoléico	
26	15.956	0.442	Éster metílico del ácido oleico	
27	16.091	0.340	Éster metílico, 14-metil del ácido palmítico	
28	16.334	11.488	Éster etílico del ácido linoleico	
29	16.367	9.182	Éster etílico del ácido oleico	
30	16.501	3.147	Éster etílico del ácido esteárico	
31	17.303	0.732	NI	NI
32	17.752	5.454	Ácido palmítico	

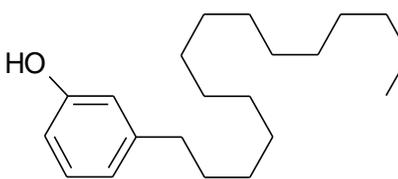
*“Actividad terapéutica del extracto etanólico de *Juliania adstringens* en un modelo murino de colitis experimental”*

33	18.836	1.352	NI	NI
34	19.189	7.601	NI	NI
35	19.440	1.023	NI	NI
36	19.510	1.104	NI	NI
37	20.889	0.285	NI	NI
38	21.063	0.128	NI	NI
39	21.127	0.281	NI	NI
Cloroformo				
40	7.259	0.082	NI	NI
41	7.435	0.074	NI	NI
42	8.740	0.319	NI	NI
43	9.986	0.127	NI	NI
44	10.018	0.196	NI	NI
45	10.195	0.077	NI	NI
46	12.104	0.134	NI	NI
47	12.217	0.174	NI	NI
48	13.008	0.483	NI	NI
49	13.142	2.774	NI	NI
50	13.821	0.297	NI	NI
51	14.148	0.103	NI	NI
52	14.345	2.203	NI	NI
53	14.431	0.126	NI	NI
54	14.458	0.099	NI	NI
55	14.597	0.856	NI	NI
56	14.768	0.291	NI	NI
57	15.009	0.809	NI	NI

“Actividad terapéutica del extracto etanólico de *Juliania adstringens* en un modelo murino de colitis experimental”

58	15.078	5.531	Ácido palmítico	
59	15.223	5.129	Éster etílico del ácido palmítico	
60	15.458	0.071	NI	NI
61	16.373	3.018	Monooleato gliceril	
62	16.405	2.742	Éster etílico del ácido palmítico	
63	16.549	0.737	NI	NI
64	16.659	0.092	NI	NI
65	16.988	0.090	NI	NI
66	17.571	0.997	NI	NI
67	17.651	6.224	NI	NI
68	17.662	4.670	NI	NI
69	17.886	0.210	NI	NI
70	18.073	0.827	NI	NI
71	18.180	0.074	NI	NI
72	18.277	0.087	NI	NI
73	18.427	0.068	NI	NI
74	18.517	0.161	NI	NI
75	18.887	3.237	NI	NI

“Actividad terapéutica del extracto etanólico de *Juliania adstringens* en un modelo murino de colitis experimental”

76	18.780	6.226	Fenol, 3-pentadecil	
77	19.052	2.627	NI	NI
78	20.411	1.852	NI	NI
79	20.529	3.445	NI	NI
80	20.817	0.106	NI	NI
81	21.277	1.167	NI	NI
82	21.502	5.799	NI	NI
83	21.769	0.081	NI	NI
84	22.802	0.413	NI	NI
85	22.973	0.675	NI	NI
86	23.064	1.617	NI	NI

NI: Compuestos no identificaos

Cuadro 7. Actividades biológicas reportadas para los compuestos identificados.

Compuestos	Actividad biológica
Catequina	Actividad anti-bacteriana, anti-viral, anti-inflamatoria en la colitis, espasmolítica, anti-ulcerosa, inhibe la lipoperoxidación vasodilatadora, citotóxica, anti-cancerígena, inhibitoria plaquetaria, anti-diabética, anti-alérgica y neuroprotectora [34, 42, 43].
Catecol	Presenta actividad anti-inflamatoria, anti-oxidante y anti-bacteriana [43, 44].
Naringenina	Presenta actividad anti-inflamatoria, anti-oxidante, anti-bacteriana, anti-parasitaria, anti-diabética, anti-aterogénica, anti-depresiva, hipolipemiente y, mejora la colitis inducida por DSS mediante la restauración de la expresión de las proteínas de unión estrecha como la ocludina y la adhesión de la molécula –A y clavina. [43-45]

*“Actividad terapéutica del extracto etanólico de *Juliania adstringens* en un modelo murino de colitis experimental”*

Pinocebrina	Presenta actividad anti-inflamatoria, anti-oxidante, anti-cancerígeno, anti-bacteriana, anti-tumoral, anti-protozoaria, anti-artritis [44].
α -Terpineol	Inhibe la contracción del íleon y actividad anti-espasmódica [46].
Dietil suberato	NR
Éster etílico del ácido mirístico	Fue reportado en la fracción de un extracto con capacidad anti-artralgia reumática, para tratar la hemi-parálisis, las convulsiones y las fracturas [47]. Fue reportado como una fracción de un extracto con capacidad inmonomoduladora y anti-oxidante [48]
Éster metílico del ácido pentacadenóico	NR
Éster metílico del ácido palmítico	Reduce la deposición de colágeno, actividad anti-inflamatoria, anti-oxidante, regula los efectos de las citocinas, en la endotoxemia inducida por lipopolisacáridos, reduce los niveles en plasma de TNF α y de IL-6 [49]. Daña la viabilidad celular e incrementa la apoptosis en las “neural stem cells (células neurales stem)”, regula la función de las células progenitoras del endotelio; produce apoptosis en las células progenitoras del endotelio por la vía p38 y por las rutas JNK y MAPKS [50].
Ácido palmítico	Reduce la deposición de colágeno, actividad anti-inflamatoria, anti-oxidante, regula los efectos de las citocinas, en la endotoxemia inducida por lipopolisacáridos, reduce los niveles en plasma de TNF α y de IL-6 [49]. Daña la viabilidad celular e incrementa la apoptosis en las “neural stem cells”, regular la función de las células progenitoras del endotelio; produce apoptosis en las células progenitoras del endotelio por la vía p38 y por las rutas JNK y MAPKS [50].
Ácido heptacadenóico	Actividad anti-leishmánica [51].
Éster etílico del ácido palmítico	NR
Éster metílico del ácido linoléico	Inhibe la proliferación de células cancerígenas de colon e induce la apoptosis y la diferenciación en células de cáncer de colon como inhibidor de histona de acetilasa [52].
Éster metílico del oleico ácido	Inhibe la proliferación de células cancerígenas de colon e induce la apoptosis y la diferenciación en células de cáncer de colon como inhibidor de histona de acetilasa [52]

*“Actividad terapéutica del extracto etanólico de *Juliania adstringens* en un modelo murino de colitis experimental”*

Éster metílico, 14-metil del ácido palmítico	NR
Éster etílico del ácido linoleico	NR
Éster etílico del ácido linoleico	NR
Ácido esteárico	Actividad pro-inflamatoria, apoptótica y, necrótica en macrófagos J774 [53].
Éster etílico del ácido hexadecenoico	Fue reportado en la fracción de un extracto con capacidad anti-artralgia reumática, para tratar la hemi-parálisis, las convulsiones y las fracturas [47]. Fue reportado como una fracción de un extracto con capacidad inmonomoduladora y anti-oxidante [48] Reduce la deposición de colágeno, actividad anti-inflamatoria, anti-oxidante, regula los efectos de las citocinas, en la endotoxemia inducida por lipopolisacáridos, reduce los niveles en plasma de TNF α y de IL-6 [49]. Daña la viabilidad celular e incrementa la apoptosis en las “neural stem cells”, regular la función de las células progenitoras del endotelio; produce apoptosis en las células progenitoras del endotelio por la vía p38 y por las rutas JNK y MAPKS [50].
Ácido palmítico	
Monoleato gliceril	Es un aditivo alimentario y emulsionante, es un tenso activo no iónico promotor en la absorción de fármacos lipófilos, hidrófilos y macromoleculares [54].
Fenol-3-pentadecil	NR

NR: Compuestos no reportados.

DISCUSIÓN

En la medicina tradicional la corteza de *J. adstringens* es utilizada para resolver afecciones gastrointestinales, úlceras gástricas y ciertas lesiones cutáneas. Sin embargo, el presente estudio es uno de los pocos en el cual se reporta el efecto del Cuachalalate como una alternativa para el tratamiento de la colitis ulcerosa, que es una enfermedad inflamatoria no específica, que se caracteriza por el desarrollo de una prolongada inflamación del revestimiento epitelial del intestino (sobre todo del colon), afectando principalmente la parte inferior izquierda del intestino llegando a propagarse parcial o totalmente por el intestino grueso. Es considerada como una enfermedad de creciente morbilidad, en la que se utilizan medicamentos anti-inflamatorios esteroideos e inmunosupresores para controlarla, los cuales presentan múltiples efectos secundarios como diarrea, dolor abdominal, problemas renales, deterioro de la función hepática, mayor predisposición al cáncer, etc. [1, 28, 31].

Con referencia al rendimiento del extracto, los datos obtenidos fueron semejantes a lo reportado por Jaury [28] los cuales mostraron un rendimiento del 39.41%, esto considerando que el solvente mediante el que se obtuvo el extracto fue otro, ya que en el caso de Jaury se utilizó metanol y en el presente estudio se trabajó con etanol, sin embargo, al realizarse una extracción exhaustiva y considerando que se trata de solventes polares, nos aseguramos de extraer todos los compuestos presentes en la corteza.

Se han hecho estudios *in vivo* en los que se han utilizado fracciones de extractos hexánicos de Cuachalalate, a donde se reporta que a una concentración de 100 mg/Kg en un modelo de edema inducido por carragenina a las tres horas, alcanza el 100% de su actividad anti-inflamatoria [31]. Con este antecedente es que las concentraciones a probar en el presente estudio fueron de los 50 a los 500 mg/Kg, debido a que en este caso se utilizó un extracto etanólico el cual contenía todos los compuestos presentes en la corteza y por otro lado que es la forma en cómo se utiliza en la medicina tradicional, a diferencia del extracto de Oviedo-Chávez pues su extracto sólo contenía los compuestos de baja polaridad, entre ellos los ácidos masticadenónicos, específicamente: 3-alfa-hidroxi-masticadienónico y ácido 3-epi-oleanólico, los cuales han sido reportados como

compuestos con capacidad anti-inflamatoria [30]. La dosis de 200 mg/Kg que se utilizó en este estudio, se determinó mediante los criterios de: la menor pérdida de peso y la menor reducción en la longitud de los intestinos de los grupos establecidos para dicho experimento.

Referente al porcentaje de sobrevivencia, como se muestra en la **Figura 9**, se observa que el grupo DSS al día 16 alcanza el 100% de mortalidad mientras que el grupo experimental sólo llegó a presentar un 20%, lo cual se relaciona directamente con el DAI (**Figura 10**) pues los animales del grupo DSS al día 8 comenzaron a aumentar drásticamente el DAI en cada uno de los valores medidos (pérdida de peso, diarrea y sangrado), la pérdida de peso producida por la diarrea y la disminución en la longitud de los intestinos gruesos **Figura 11 y 12**, son resultados que coinciden con lo reportado por Song [55] donde se utilizó un extracto etanólico de *Phellinus linteus* que es un hongo utilizado en la medicina tradicional coreana y una solución de DSS al 3.5% debido a que los compuestos presentes en este extracto tales como p-hidroxibenzaldehído, ácido elágico y ácido cafeico, se caracterizan por tener una buena capacidad anti-oxidante, anti-inflamatorios, anti-cáncer, y propiedades anti-alérgicas, mismas propiedades a las presentadas en los compuestos encontrados en el extracto de *J. adstringens*. Xiao [56] trabajó con una dieta a base de arándanos y una solución de DSS al 1%, mostrando semejanzas en los resultados durante la primer exposición al DSS y finalmente por Azuma [15] en donde se utilizó DSS al 2% y un tratamiento de Wy-14643.

Entre las alteraciones del sistema inmunológico se producen altos niveles de ROS, los cuales pueden contribuir a la iniciación o propagación de la CU. Por esto es que los términos estrés oxidativo, radicales libres, capacidad anti-oxidante, se han convertido recientemente, en un lenguaje común entre la comunidad científica ya que poseen una gran importancia en la clínica actual [4, 57].

Las ROS son indispensables como mediadores en muchos procesos celulares bajo condiciones fisiológicas adecuadas ya que su generación es controlada por un gran número de sistemas anti-oxidantes. Pero cuando estas moléculas se producen sin control, pueden causar múltiples afecciones en los organismos dañando las proteínas, al DNA, lípidos y tejidos. La evidencia sugiere que la inflamación se asocia con una mayor producción de ROS ya que los macrófagos y neutrófilos que son las células presentes en los infiltrados inflamatorios se caracterizan entre otros aspectos

por la producción de estas moléculas, tal es el caso de la CU donde estas células son el sello fisiopatológico de la enfermedad, tal como se observa en el grupo DSS (**Figura 13**), donde se aprecia una gran cantidad de neutrófilos y macrófagos, así como, la pérdida de la integridad total de las crestas y la ausencia total de las criptas intestinales donde se encuentran las células caliciformes, que son las encargadas de generar moco para la protección, la lubricación y el transporte en el revestimiento del colon ante la presencia de la microbiota, por lo que una disminución en el número de las criptas está asociada directamente con el desarrollo de la CU (**Figura 14**) [58, 59]. Se puede observar daño en la integridad de las crestas y una disminución en la presencia de las criptas, sin embargo, el daño observable del grupo DSS/Extracto causado por el DSS es menor respecto al grupo DSS, debido posiblemente a los compuestos presentes en el extracto de *J. adstringens* ya que estos resultados coinciden con lo que reporta Kaur [59] donde se indujo colitis con DSS al 2% y se reporta que en los grupos con un menor número de células caliciformes hay mayor daño respecto al DAI, mayor pérdida de peso y de arquitectura histológica.

Por lo antes mencionado se determinó la capacidad anti-oxidante del extracto, encontrando una concentración de 36.040 $\mu\text{g/mL}$ en el extracto de *J. adstringens*, mientras que la Quercetina presenta un valor de 4 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo, hay que mencionar que en el caso de la Quercetina se trata de un compuesto puro y que a pesar de esto, según lo reportado por Al-Fatimi el extracto de *J. adstringens* posee una buena capacidad anti-oxidante pues éste menciona que aquellos extractos con capacidad anti-oxidante menor a 96.6 $\mu\text{g/mL}$, poseen una buena capacidad [60]. Ballester [25] y Somani [43] reportan que dentro de los metabolitos secundarios la familia de los fenoles poseen capacidad anti-oxidante, por ello es que en el presente estudio se determinó la concentración de fenoles totales, encontrando que en el extracto etanólico de *J. adstringens* posee una concentración del 276 mgeAC .

Específicamente los flavonoides, son los compuestos a los que se les atribuyen una amplia gama de actividades farmacológicas, incluyendo anti-oxidante, anti-inflamatorio, anti-cancerígena, cardioprotectora, neuroprotectora, antialérgico y antidiabético. Destacando su capacidad anti-oxidante debido a que retiran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones O_2^- , radicales OH, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos (ROO). De esta manera, bloquean la acción tóxica de dichas sustancias sobre las células [43, 61]. Debido a esto es que se determinó la concentración de

flavonoides, encontrando un valor de 10.37 mgEQ/g. Además, aumentan la concentración de SOD la cual es una enzima encargada de transformar las ROS en una especie de menor toxicidad, tal es el caso del O_2^- y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que posteriormente son transformados en agua por otras enzimas [43, 61] tal como se observa en la **Figura 16** donde la concentración de SOD presenta una diferencia significativa con el grupo control. Estos resultados son semejantes a lo reportado por Kanodia [62] donde indujeron la EII con un modelo de ácido acético utilizando como tratamiento 500 mg/Kg de extracto etanólico de *Fragaria vesca* en el que se ha reportado la Catequina y la Naringenina, metabolitos también presentes en el extracto de *J. adstringens* [63]. Aunado a esto, tenemos entre los compuestos identificados al Catecol, que ha sido reportado como un compuesto que mejora la inhibición de la peroxidación lipídica evitando en parte la formación de ROS y aumentando la concentración de SOD aminorando con esto la inflamación de la mucosa al inhibir la producción de TNF- α , sello característico de la colitis ulcerosa [43, 44, 62].

La GPx es una enzima que se activa en conjunto con la SOD, la cual requiere de un tripéptido de bajo peso molecular, llamado glutatión reducido (GSH) para reducir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua y a O_2 al igual que la SOD se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos (**Figura 17**), de igual manera se ha reportado que esta es la enzima del sistema de defensa anti-oxidante más importante en este sitio, inhibiendo la actividad de la CAT (**Figura 18**), razón por la cual probablemente no se encontró una diferencia significativa entre grupo DSS y el grupo DSS/Extracto [61, 64].

Sumado a todo lo anterior, muchos de los compuestos encontrados en el extracto, tales como; Catequina, Catecol, Naringenina, Pinocembrina, Éster etílico del ácido mirístico, Éster metílico del ácido palmítico, Ácido palmítico, Éster etílico del ácido hexacadenico y el Ácido palmítico (**Cuadro 7**) han sido reportados como compuestos con actividad anti-oxidante, ya que estos tienen la capacidad de donar un electrón y estabilizar las moléculas reactivas. Con capacidad anti-inflamatoria destaca la Naringenina la cual ha demostrado tener capacidad anti-inflamatoria en un modelo de DSS [45]. El ácido oleico éster metílico se ha reportado como inhibidor de la proliferación las células cancerosas del colon. En su conjunto estos compuestos también han sido reportados por tener una buena capacidad anti-microbiana, lo cual es muy importante debido a que cuando las bacterias alcanzan la superficie del epitelio, el sistema inmune se activa y el proceso inflamatorio también [2, 28, 42-45, 50, 65]. Entre las bacterias que destacan como agentes

“Actividad terapéutica del extracto etanólico de *Juliania adstringens* en un modelo murino de colitis experimental”

infecciosos en el 22% de los pacientes de la EII se encuentran: *Eubacterium aerofaciens*, *Enterococcus faecalis*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium leptum*, *Clostridium coccooides*, *Clostridium septicum*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides prevotella*, *Fusobacterium nucleatum* y *Escherichia coli* [2, 65].

La CU es una enfermedad crónica que puede condicionar a los pacientes a tomar medicamentos durante toda su vida para prevenir recaídas, reducir el riesgo de cáncer colorrectal y mejorar su calidad de vida. El uso de remedios a base de plantas medicinales son capaces de tratar una amplia gama de trastornos gastrointestinales tanto agudos como crónicos, incluyendo la CU. Sin embargo, no basta con los estudios etnobotánicos que tengan como meta rescatar el conocimiento tradicional, al mismo tiempo, se necesitan estudios que avalen científicamente las terapias alternativas más utilizadas. De esta manera, estos medicamentos a base de productos naturales a menudo han sido probados en su contexto tradicional y también se ha encontrado que pueden útiles en nuevas aplicaciones y en diferentes padecimientos, abriendo de este modo nuevas vías para el tratamiento de enfermedades. Los resultados presentados aquí pueden, por lo tanto, proporcionar una base científica para el uso de fitopreparados de *J. adstringens* contra la CU y otros padecimientos inflamatorios.

CONCLUSIONES

El extracto etanólico de *Juliania adstringens*:

- a) Aumenta la sobrevida y reduce los síntomas de los ratones con colitis ulcerosa.
- b) Aminora el daño a nivel intestinal tanto en longitud del intestino, como en la integridad de las crestas y criptas.
- c) Tiene actividad anti-oxidante y regula la actividad de las enzimas encargadas de contrarrestar las ROS.
- d) Algunos de los principales compuestos presentes en el extracto son; Catecol, Catequina, Naringenina y Pinocembrina, Ácido palmítico, Éster metílico del ácido palmítico, Ácido palmítico, Éster metílico del ácido oleico, Ácido esteárico y Monoleato gliceril.

APÉNDICE 1

Juliania adstringens Schltl

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Burserales

Familia: Julianiaceae

Género: *Juliania*

Especie: *Juliania adstringens* Schltl



Figura 22. Corteza de *Juliania adstringens* Schltl

Sinónimos

Amphipterygium adstringens Standl, *Hypopterygium adstringens* Schltl [66].

Nombre común

Cuachalalate, cuachalala, matixeran, pacueco, palo santo, cuachinala volador, maceran y cuachinala [18, 66].

Descripción

Juliania adstringens Schltl es un árbol dioico de 10 m con hojas dispuestas en espiral aglomeradas en las puntas de color verde opaco en el haz y verde grisáceo en el envés. Las flores se pueden observar solitarias o en ramilletes. Los frutos son nueces abultadas que están en ramas de color verde pálido. Su corteza externa es de color grisáceo con grandes escamas mientras que la corteza interna presenta un color rosado [66].

Distribución

La especie habita en climas cálidos, semicálidos y templados desde los 100 hasta los 3000 m.s.n.m. Es una especie de origen mexicano común en el bosque tropical caducifolio que se encuentra restringida a la vertiente del Pacífico desde Nayarit, sureste de Zacatecas y noreste de Jalisco hasta el Estado de México, Distrito Federal, Michoacán, Oaxaca, Guanajuato, Guerrero, y Puebla [30, 66].



Figura 23. *Juliania adstringens* Schltldl; hojas; árbol y corteza seca.

APÉNDICE 2

Contenido de Fenoles Totales (CFT)

(Método modificado de Singleton *et al.*, 1999 [69])

La concentración de fenoles totales (CFT) se midió por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utilizó es el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo consiste en una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato (coloración amarilla), en el cual el molibdeno y el tungsteno se encuentran en estado de oxidación 6⁺. La reducción con ciertos agentes reductores genera la formación de molibdeno y tungsteno con un promedio de estado de oxidación entre 5⁺ y 6⁺, formando una solución azul.

Se preparó una curva de calibración con ácido gálico, el cual es una pequeña molécula que por su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo -OH. Esto, se utiliza para evaluar la cuantificación de fenoles totales.

Se utilizó una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL), a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL. (**Tabla 3**).

Para el análisis de fenoles totales del extracto, se preparó una solución estándar (0.2 mg/mL), se tomó una alícuota de 250 µL de esta y se agregaron 750 µL de agua destilada, para obtener un volumen final de 1 mL a una concentración de 0.05 mg/mL.

Se tomó 1 mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se transfirieron a un tubo de ensayo con 6mL de agua destilada a continuación se adicionaron 500 µL de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añadieron 1.5 mL de una solución de Na₂CO₃ (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10mL.

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 760nm. Cada concentración se determina por triplicado.

Finalmente se graficó la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realizó un análisis de regresión lineal y se interpolaron la absorbancia de la muestra a evaluar. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o bien en porcentaje.

Curva patrón

Tubo B (blanco)	[Ácido gálico] mg/ mL	μL patrón	μL agua destilada	mL Agua destilada
1	0.00625	31.25 (31)	968.75 (968.5)	7
2	0.0125	62.5	937.5	7
3	0.025	125	875	7
4	0.05	250	750	7
5	0.1	500	500	7
6	0.2	1000	0	7
P (problema)	-	250	750	7

Tabla 3. Curva patrón para determinar la concentración de fenoles totales.

APÉNDICE 3

Concentración de Flavonoides

Se pesaron 2 mg de Quercetina y se disolvieron en 2 mL de MeOH grado HPLC (stock). De esta solución se tomaron las alícuotas para la preparación de la curva patrón de Quercetina como se muestra en el (Tabla 4).

Se pesó 1 mg de extracto etanólico de *J. adstringens* y se disolverá en 5 mL de MeOH grado HPLC (problema). De esta solución problema se tomó 1 mL (se realizó por triplicado).

A todas las soluciones de la curva de calibración y a la muestra problema se le agregaron 1 mL de AlCl₃ al 2%. Se cargaron 200 μL de las soluciones preparadas a partir del stock y del problema en una placa de 96 pozos para ELISA, por triplicado. Después de 10 minutos de reacción en reposo a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 415 nm. Como blanco se utilizó una mezcla de 3 mL de stock y 3 mL de MeOH grado HPLC.

Tabla 4. Concentraciones utilizadas para la curva de Quercetina.

[ppm] μ L stock	μ L stock	μ L MeOH
1	1	999
2	2	998
3	3	997
4	4	996
5	5	995
6	6	994
7	7	993
8	8	992
9	9	991
10	10	990
20	20	980
30	30	970
40	40	960
50	50	950
60	60	940
70	70	930
80	80	920
90	90	910
100	100	900

APÉNDICE 4

Actividad anti-oxidante

(Murillo, 2006 [68]).

La actividad anti-oxidante se evaluó midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (1-100 ppm), por medio de espectrometría UV-VIS. En una placa de ELISA se adicionaron 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (1-100ppm) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionaron 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final fue de 100 g/mL; inmediatamente se protege de la luz y se mantuvo en agitación constante durante 30 min a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA SLT Spetra; el control negativo fue aplicando 200 µL de metanol en los pozos y como control positivo se usó Quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

Interpretación de Resultados

Los resultados fueron reportados obteniendo el porcentaje de reducción y se calcularán con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C - E / C) * 100$$

En donde:

C= Absorbancia del control (DPPH con metanol)

E= Absorbancia del experimental

(Mezcla DPPH + compuesto problema).

APÉNDICE 5

Glutación peroxidasa

La glutación peroxidasa (GPx) cataliza la reducción de hidroperóxidos, incluyendo peróxido de hidrógeno, por el glutación reducido y las funciones para proteger a la célula del daño oxidativo. Con la excepción de fosfolípido hidroperóxido de GPx, un monómero, todas las enzimas GPx son tetrámeros de cuatro subunidades idénticas. Cada subunidad contiene una selenocisteína en el sitio activo que participa directamente en la reducción de dos electrones del sustrato de peróxido. La enzima utiliza glutación como el donador de electrones final para regenerar la forma reducida de la selenocisteína.

El ensayo de GPx de Cayman mide la actividad de GPx indirectamente por una reacción acoplada con la glutación reductasa (GR). El Glutación oxidado (GSSG), producido por reducción de hidroperóxido de GPx, se recicla a su estado reducido por GR y NADPH: La oxidación de NADPH a NADP⁺ se acompaña de una disminución en la absorbancia a 340 nm. En condiciones en que la actividad GPx es limitante de la velocidad, la tasa de disminución de la A₃₄₀ es directamente proporcional a la actividad de GPx en la muestra. El kit de GPx de Cayman se puede utilizar para medir todas las glutación peroxidasa dependientes en plasma, eritrocitos lisados, tejidos homogeneizados y lisados celulares (**Figura 25**).

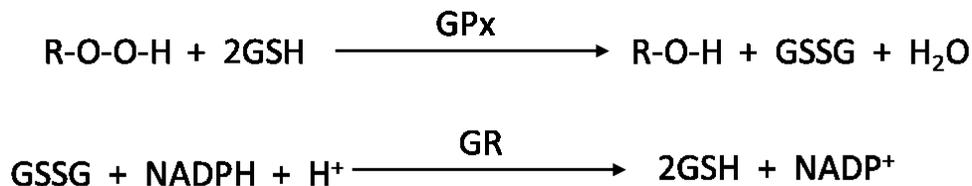


Figura 24. Actividad de Glutación Peroxidasa.

Superóxido Dismutasa

Las Superóxido dismutasas (SODs) son metaloenzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno y por lo tanto forman una parte crucial del mecanismo de defensa antioxidante celular.

Tres tipos de SOD se han caracterizado de acuerdo con su contenido de metales: cobre/zinc (Cu/Zn), manganeso (Mn) y el hierro (Fe). SOD se encuentra ampliamente distribuida en las plantas y los animales. Se presenta en altas concentraciones en el cerebro, el hígado, el corazón, los eritrocitos, y el riñón. En los seres humanos, hay tres formas de SOD: Cu/Zn-SOD citosólica, MnSOD mitocondrial y SOD extracelular. SOD extracelular se encuentra en los espacios intersticiales de los tejidos y también en los fluidos extracelulares, lo que representa la mayoría de la actividad de SOD en el plasma, linfa y el líquido sinovial.

La cantidad de SOD presente en entornos celulares y extracelulares es crucial para la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Las mutaciones en SOD se pueden considerar en aproximadamente el 20% de los casos familiares de esclerosis lateral amiotrófica (ELA). SOD también parece ser importante en la prevención de otros desordenes neurodegenerativos como en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington. La reacción catalizada por SOD es extremadamente rápida, que tiene una constante de velocidad de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ y la presencia de cantidades suficientes de la enzima en células y tejidos normalmente mantiene la concentración de superóxido (O_2^-) muy bajo. Sin embargo, en una reacción competitiva, el óxido nítrico (NO) reacciona con el O_2^- con una constante de velocidad de $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ para formar el oxidante potente y agente de nitración, peroxinitrito. En condiciones en que la actividad SOD es baja o ausente (mutación SOD) o que favorecen la síntesis de concentraciones μM de NO (isquemia/reperfusión, la regulación positiva de iNOS, etc.), NO compite fuera de SOD para superóxido, lo que resulta en la formación de peroxinitrito. La presencia de nitrotirosina como una "huella" de peroxinitrito, y por lo tanto la coexistencia previa de tanto O_2^- y NO, se ha observado en una variedad de condiciones médicas, incluyendo la aterosclerosis, sepsis y ALS.

El Kit de Superóxido Dismutasa de Cayman utiliza una sal de tetrazolio para la detección de los radicales superóxido generados por la Xantina oxidasa y la hipoxantina (**Figura 26**). Una unidad de

SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para exhibir el 50% de dismutación del radical superóxido. El ensayo de SOD mide los tres tipos de SOD (Cu/Zn, Mn y FeSOD).

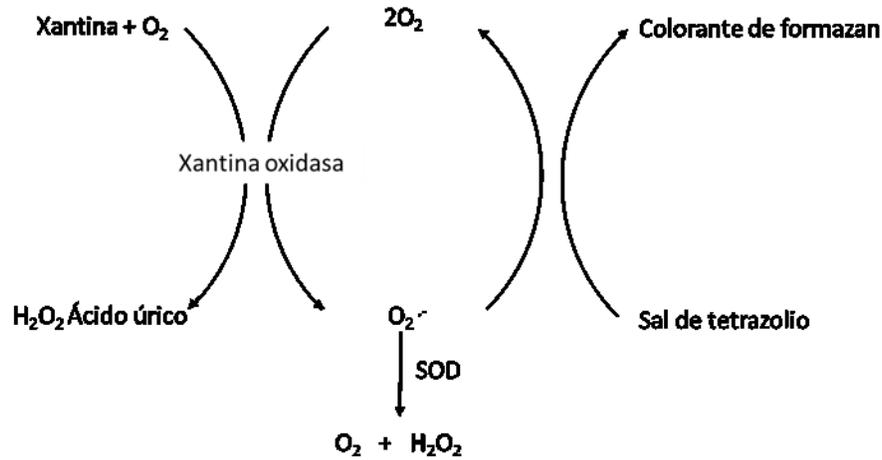


Figura 25. Esquema del ensayo de Superóxido dismutasa.

Catalasa

La catalasa es una enzima antioxidante ubicua que está presente en la mayoría de las células aeróbicas. La catalasa (CAT) está implicada en la detoxificación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂), una especie reactiva de oxígeno (ROS), que es un producto tóxico tanto del metabolismo aeróbico normal y la producción de ROS patógena. Esta enzima cataliza la conversión de dos moléculas de H₂O₂ al oxígeno molecular y dos moléculas de agua (actividad catalítica). CAT también demuestra la actividad peroxidativa, en la que los alcoholes de bajo peso molecular pueden servir como donadores de electrones. Mientras alcoholes alifáticos sirven como sustratos específicos para CAT, otras enzimas con actividad peroxidativa no utilizan estos sustratos (Figura 27).

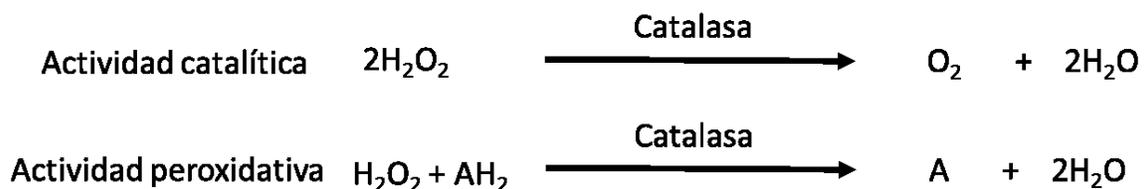


Figura 26. Actividad de la Catalasa.

En los seres humanos, los más altos niveles de CAT se encuentran en el hígado, los riñones y los eritrocitos, donde se cree que representan la mayoría de la descomposición de H_2O_2 .

El ensayo “Kit de catalasa” de Cayman utiliza la función peroxidativa de CAT para la determinación de la actividad enzimática. El método se basa en la reacción de la enzima con metanol en presencia de una concentración óptima de H_2O_2 . El formaldehído producido se mide colorimétricamente con 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald) como cromógeno. Purpald forma específicamente un heterociclo bicíclico con aldehídos, que en los cambios de oxidación de incoloro a un color púrpura. El ensayo se puede usar para medir la actividad CAT en el plasma, suero, lisados de eritrocitos, homogeneizados de tejido, y los lisados celulares.

REFERENCIAS

1. Fakhoury M, Negrulj R, Mooranian A, Al-Salami H: **Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments.** *Journal of inflammation research* 2014, **7**:113-120.
2. Ananthakrishnan AN: **Epidemiology and risk factors for IBD.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2015, **12**(4):205-217.
3. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS: **A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents.** *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 2014, **18**(4):279-288.
4. Bouzid D, Gargouri B, Mansour RB, Amouri A, Tahri N, Lassoued S, Masmoudi H: **Oxidative stress markers in intestinal mucosa of Tunisian inflammatory bowel disease patients.** *Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association* 2013, **19**(3):131-135.
5. Espitia-Prada Y: **Evaluación de la actividad antiinflamatoria de las plantas medicinales *Critoniella acuminata* y *Salvia rubescens* en un modelo de colitis ulcerativa experimental.** *Tesis de Maestría.* Bogotá: Universidad Nacional Colombiana; 2010.
6. Palma R, Quera R: **Enfermedades inflamatorias intestinales: colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.** *Rev Med Clin Condes* 2008, **19**:342-351.
7. Bosques-Padilla F, Sandoval-García E, Martínez-Vázquez E, Garza-González E, Maldonado-Garza H: **Epidemiología y características clínicas de la colitis ulcerosa crónica idiopática en el noreste de México.** *Rev Gastroenterol Mex* 2011, **76**:34-38.
8. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW *et al*: **Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review.** *Gastroenterology* 2012, **142**(1):46-54.
9. Vergara Fernández O, Takahashi Monroy T, González Contreras Q: **Conceptos actuales en colitis ulcerativa crónica inespecífica.** *Cirujano General* 2006, **28**:42-49.
10. Charúa-Guindic L, Lagunes-Gasca A, Villanueva-Herrero J, Jiménez-Bobadilla B, Avendaño-Espinosa O, Charúa-Levy E: **Comportamiento epidemiológico del cáncer de colon y recto en el Hospital General de México. Análisis de 20 años: 1988-2007.** *Rev Gastroenterol Mex* 2009, **74**:1-6.
11. Neufert C, Becker C, Neurath MF: **An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression.** *Nature protocols* 2007, **2**(8):1998-2004.
12. Benavides F, Guenet J: **Modelos murinos de enfermedades humanas.** *Medicina (Buenos Aires)* 2000, **61**:215-231.
13. Clapper ML, Cooper HS, Chang WC: **Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions.** *Acta pharmacologica Sinica* 2007, **28**(9):1450-1459.
14. Perse M, Cerar A: **Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, **2012**:1-13.

15. Azuma YT, Nishiyama K, Matsuo Y, Kuwamura M, Morioka A, Nakajima H, Takeuchi T: **PPARalpha contributes to colonic protection in mice with DSS-induced colitis.** *International immunopharmacology* 2010, **10**(10):1261-1267.
16. Rana SV, Sharma S, Prasad KK, Sinha SK, Singh K: **Role of oxidative stress & antioxidant defence in ulcerative colitis patients from north India.** *The Indian journal of medical research* 2014, **139**(4):568-571.
17. Esquivel-Gutiérrez E, Noriega-Cisneros R, Bello-González M, Saavedra-Molina A, Salgado-Garciglia R: **Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas.** *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias* 2012, **14**:45-52.
18. Muñoz-Casares N: **Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad inhibitoria del sistema de censado quórum bacteriano de las cortezas de *Amphipterygium adstringens* Standl y *Ceiba spp.*** *Tesis de Maestría.* México: Institución de Enseñanza e Investigación de Ciencias Agrícolas; 2013.
19. Schlaepfer L, Mendoz J: **Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México.** *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 2010, **41**:18-27.
20. Sepúlveda-Jiménez G, Porta-Ducoing H, Rocha-Sosa M: **La participación de los metabolitos en la defensa de las plantas.** *Revista Mexicana de Fitopatología* 2003, **21**:355-363.
21. Gracia D: **Los metabolitos secundarios de las especies vegetales.** *Pastos y Forrajes* 2004, **1-12**:1-12.
22. Mota-Celis M: **Flavonoides: Características y algunas propiedades biológicas, una revisión.** *Tesina.* México: Facultad de Estudios Superiores Iztacala; 2010.
23. Zacarés L: **Nuevas aportaciones al metabolismo secundario del tomate. Identificación y estudio de moléculas implicadas en la respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato.*** *Tesis de licenciatura.* España: Universidad Politécnica de València; 2008.
24. Ávalos García A, Pérez-Urria E: **Metabolismo secundario.** *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal* 2009, **2**:119-145.
25. Ballester I, Camudescio D, Gálvez J, Sánchez de Medina F, Zarzuelo A: **Flavonoides and Inflammatory bowel disease.** *Ars Pharm* 2006, **47**:5-21.
26. Lorente-Lamarca M: **Estudio Farmacológico de *Euphorbia hirta* L.** *Tesis de Doctorado.* España: Universidad de Granada; 2003.
27. Argueta A, Cano L, Rodarte M: **Metabolismo secundario de plantas.** *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal* 2009, **2**:119-145.
28. Jaury-Castillo A: **Estudio Preliminar de la Actividad Antimicrobiana de *Juliania adstringens* (Schldl.) Schldl (Cuachalalate).** *Tesis de Licenciatura.* México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.
29. Orozco-Martínez J: **Estudio comparativo de algunas actividades biológicas de las cortezas de *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*, *Juliania adstringens* y *Cyrtocarpa procera* de San Rafael, Coxcatlán, Puebla.** *Tesis de Maestría.* México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2010.

30. Olivera Ortega AG, Soto Hernandez M, Martinez Vazquez M, Terrazas Salgado T, Solares Arenas F: **Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht)**. *Journal of ethnopharmacology* 1999, **68**(1-3):109-113.
31. Oviedo-Chavez I, Ramirez-Apan T, Soto-Hernandez M, Martinez-Vazquez M: **Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity**. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 2004, **11**(5):436-445.
32. S. A, M. R, A. G: **Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer**. *Journal of Saudi Chemical Society* 2013, **17**(1):101–124.
33. Cho EJ, Shin JS, Noh YS, Cho YW, Hong SJ, Park JH, Lee JY, Lee JY, Lee KT: **Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Patrinia scabiosaefolia* in mice with ulcerative colitis**. *Journal of ethnopharmacology* 2011, **136**(3):428-435.
34. Park DK, Park HJ: **Ethanol extract of *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans attenuates dextran-sodium-sulfate- (DSS-) induced colitis by suppressing the expression of matrix metalloproteinases and inflammatory mediators**. *BioMed research international* 2013, **2013**:102918.
35. Whittam CG, Williams AD, Williams CS: **Murine Colitis modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS)**. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2010(35).
36. García-López J: **Caracterización del efecto del extracto metanólico de la corteza de *Bursera morelensis* sobre *Leishmania mexicana***. *Tesis de licenciatura*. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
37. Lowe EL, Crother TR, Rabizadeh S, Hu B, Wang H, Chen S, Shimada K, Wong MH, Michelsen KS, Arditi M: **Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer**. *PloS one* 2010, **5**(9):e13027.
38. Davaatseren M, Hwang JT, Park JH, Kim MS, Wang S, Sung MJ: **Poly-gamma-glutamic acid attenuates angiogenesis and inflammation in experimental colitis**. *Mediators of inflammation* 2013, **2013**:982383.
39. TUMALAN-GIL D: **Determinación fitoquímica y evaluación de las actividades antiinflamatoria y analgésica de *Viguiera dentata***. *Tesis de licenciatura*. Universidad de la Cañada; 2014.
40. Murillo F: **Actividad antioxidante in vitro de las bebidas de frutas**. *Revista Tecnológica Alfa* 2006:27.
41. Rivera-Yáñez N: **Comparación de las propiedades biológicas del propoleo de diferentes estados de la Republica Mexicana**. *Tesis de maestría*. Instituto Politécnico Nacional 2013.
42. M DP: **Medicinal Natural Products**, Second edn. British; 2002.
43. Somani SJ, Modi KP, Majumdar AS, Sadarani BN: **Phytochemicals and their potential usefulness in inflammatory bowel disease**. *Phytotherapy research : PTR* 2015, **29**(3):339-350.
44. Rasul A, Millimouno FM, Ali Eltayb W, Ali M, Li J, Li X: **Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities**. *BioMed research international* 2013, **2013**:379850.
45. Azuma T, Shigeshiro M, Kodama M, Tanabe S, Suzuki T: **Supplemental naringenin prevents intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice**. *The Journal of nutrition* 2013, **143**(6):827-834.

46. Sadraei H, Asghari G, Kasiri F: **Comparison of antispasmodic effects of *Dracocephalum kotschyi* essential oil, limonene and alpha-terpineol.** *Research in pharmaceutical sciences* 2015, **10**(2):109-116.
47. Wei JF, Yin ZH, Kang WY: **Volatiles of *Lysimachia paridiformis* Var. *Stenophylla*, *Lysimachia fortunei* and *Lysimachia chikungensis* by HS-SPME-GC-MS.** *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines* 2014, **11**(3):70-75.
48. Mawa S, Jantan I, Husain K: **Isolation of Terpenoids from the Stem of *Ficus aurantiaca* Griff and their Effects on Reactive Oxygen Species Production and Chemotactic Activity of Neutrophils.** *Molecules* 2016, **21**:1-14.
49. Saeed NM, El-Demerdash E, Abdel-Rahman HM, Algendaby MM, Al-Abbasi FA, Abdel-Naim AB: **Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models.** *Toxicology and applied pharmacology* 2012, **264**(1):84-93.
50. Jiang H, Liang C, Liu X, Jiang Q, He Z, Wu J, Pan X, Ren Y, Fan M, Li M *et al*: **Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways.** *Atherosclerosis* 2010, **210**(1):71-77.
51. Carballeira NM, Montano N, Cintron GA, Marquez C, Rubio CF, Prada CF, Balana-Fouce R: **First total synthesis and antileishmanial activity of (Z)-16-methyl-11-heptadecenoic acid, a new marine fatty acid from the sponge *Dragmaxia undata*.** *Chemistry and physics of lipids* 2011, **164**(2):113-117.
52. Schlormann W, Birringer M, Lochner A, Lorkowski S, Richter I, Rohrer C, Gleis M: **In vitro fermentation of nuts results in the formation of butyrate and c9,t11 conjugated linoleic acid as chemopreventive metabolites.** *European journal of nutrition* 2015.
53. Martins de Lima T, Cury-Boaventura MF, Giannocco G, Nunes MT, Curi R: **Comparative toxicity of fatty acids on a macrophage cell line (J774).** *Clinical science* 2006, **111**(5):307-317.
54. Pluhackova K, Morhenn H, Lautner L, Lohstroh W, Nemkovski KS, Unruh T, Bockmann RA: **Extension of the LOPLS-AA Force Field for Alcohols, Esters, and Monoolein Bilayers and its Validation by Neutron Scattering Experiments.** *The journal of physical chemistry B* 2015, **119**(49):15287-15299.
55. Song M, Park HJ: **Anti-inflammatory effect of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice on dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and LPS-activated macrophages.** *Journal of ethnopharmacology* 2014, **154**(2):311-318.
56. Xiao X, Kim J, Sun Q, Kim D, Park CS, Lu TS, Park Y: **Preventive effects of cranberry products on experimental colitis induced by dextran sulphate sodium in mice.** *Food chemistry* 2015, **167**:438-446.
57. Kohen R, Nyska A: **Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification.** *Toxicologic pathology* 2002, **30**(6):620-650.
58. Zhu H, Li YR: **Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence.** *Experimental biology and medicine* 2012, **237**(5):474-480.

59. Kaur K, Saxena A, Larsen B, Truman S, Biyani N, Fletcher E, Baliga MS, Ponemone V, Hegde S, Chanda A *et al*: **Mucus mediated protection against acute colitis in adiponectin deficient mice.** *Journal of inflammation* 2015, **12**:35.
60. Al-Fatimi M, Wurster M, Schroder G, Lindequist U: **Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen.** *Journal of ethnopharmacology* 2007, **111**(3):657-666.
61. Konigsberg M (ed.): **Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.** México; 2008.
62. Kanodia L, Borgohain M, Das S: **Effect of fruit extract of *Fragaria vesca* L. on experimentally induced inflammatory bowel disease in albino rats.** *Indian journal of pharmacology* 2011, **43**(1):18-21.
63. Urrutia M, Schwab W, Hoffmann T, Monfort A: **Genetic dissection of the (poly)phenol profile of diploid strawberry (*Fragaria vesca*) fruits using a NIL collection.** *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 2016, **242**:151-168.
64. Cisneros E: **La glutatión reductasa y su importancia biomédica.** In., vol. 14. Cuba: Rev Cubana Invest Biomed.
65. Papineni R, Umar S: **Spot light on intestinal microbiota.** *Transl Cancer Res* 2013, **2**:359-369.
66. Argueta V, Cano AJ: **Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana.** In., Instituto Nacional Indigenista edn. México; 1994: 1193.
67. Canales-Martínez M, Hernández-Delgado T, Caballero-Nieto J, Romo de Vivar A, Durán-Díaz Á, Lira-Saade R: **Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México.** *Acta Botánica Mexicana* 2006:21-43.
68. Murillo F: **Actividad antioxidante in vitro de las bebidas de frutas.** *Revista Tecnológica Alfa editores técnicos* 2006:27.
69. Singleton V, Orthofer R, Lamuela-Reventós R: **Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent.** *Methods in Enzymology* 1999, **299**:152-178.