



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DEL POTENCIAL GASTROPROTECTOR DEL MUCÍLAGO DEL  
QUELITE *Anoda cristata* EN UN MODELO DE ÚLCERA GÁSTRICA  
INDUCIDA POR ETANOL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ALEJANDRO MIRANDA BERMÚDEZ**



**CDMX**

**2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Bertha Julieta Sandoval Guillén

**VOCAL:** Profesor: Juan Carlos Ramírez Orejel

**SECRETARIO:** Profesor: Erika Gómez Chang

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Carmina Montiel Pacheco

**2° SUPLENTE:** Profesor: Javier Ordoñez Hernández

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 2, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. ERIKA GÓMEZ CHANG**

**SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ**

**SUSTENTANTE: ALEJANDRO MIRANDA BERMÚDEZ**

## Agradecimientos

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA de la UNAM, IN217019.

A la Dra. Erika Gómez Chang, del departamento de Bioquímica, por su asesoría académica, siempre con entrega y dedicación, a lo largo de todo el trabajo de investigación.

A la Dra. Irma Romero Álvarez, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina por permitirme integrarme a su equipo de trabajo y, además, fungir como Supervisora Técnica del presente trabajo.

A la Dra. Ma. Amanda Gálvez Mariscal, responsable del proyecto CONACyT 214286 “Rescate de especies subvaloradas tradicionales de la dieta mexicana y su contribución para el mejoramiento de la nutrición en México”, por la provisión del material vegetal utilizado en este trabajo y por todas las facilidades otorgadas para el uso de equipo de su laboratorio.

A la Técnico Académico Raquel Guerrero Alquicira, del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, por su destacable asistencia en la realización de las técnicas histológicas.

A los profesores Bertha Julieta Sandoval Guillén y Juan Carlos Ramírez Orejel por su compromiso con el presente trabajo, aún con las circunstancias extraordinarias en las que nos encontramos.

# Índice

A. Lista de abreviaturas.....	6
B. Lista de figuras.....	7
C. Lista de tablas.....	8
D. Introducción .....	9
1. Marco teórico.....	10
1.3. Úlcera péptica.....	16
1.4. Etiología de las úlceras gástricas.....	17
1.4.2. Factores agresivos para la mucosa gástrica.....	20
1.5. Tratamiento de la úlcera péptica.....	24
1.5.1. Problemas del tratamiento de la úlcera péptica .....	28
1.5.2. Medicina tradicional, una alternativa de tratamiento.....	29
1.6. Los quelites, una perspectiva sociocultural.....	31
1.6.1. El alache como un potencial gastroprotector.....	36
1.7. Modelos experimentales de inducción de úlcera.....	40
1.7.1. Modelo de inducción de úlceras gástricas por etanol.....	41
1.8. Anatomía e histología del estómago de ratón.....	42
3. Hipótesis.....	46
4. Objetivos .....	46
4.1. Objetivo general.....	46
4.2. Objetivos particulares.....	46
5. Metodología.....	48
5.1. Obtención del material vegetal.....	48
5.2. Obtención del mucílago.....	48
5.3. Preparación de los animales de experimentación.....	49
5.4. Evaluación de la actividad gastroprotectora del mucílago <i>in vivo</i> .....	50
5.4.1. Administración de los tratamientos e inducción de la ulceración gástrica.....	50
5.4.2 Extirpación de los estómagos y análisis macroscópico del área total de ulceración.....	51
5.5. Análisis histológico.....	54

5.6. Análisis estadístico.....	54
6. Resultados y discusión.....	55
6.1. Rendimiento del mucílago de alache. ....	55
6.2. Actividad gastroprotectora del mucílago de <i>A. cristata</i> en el modelo murino de ulceración gástrica con etanol absoluto. ....	56
6.2.1. Análisis macroscópico .....	57
6.2.2 Análisis microscópico.....	69
7. Conclusiones.....	82
8. Perspectivas.....	83
9. Bibliografía .....	84

## A. Lista de abreviaturas

AGS	Línea celular de adenocarcinoma humano
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
AQ	Extracto acuoso
CagA	Proteína asociada al gen <i>cagA</i>
CAR	Carbenoxolona
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COX	Ciclooxigenasa
EEM	Error estándar de la media
EFG	Factor de crecimiento epidérmico
EGI	Enfermedad gastrointestinal
EROS	Especies reactivas derivadas del oxígeno
ETSS	Especies Tradicionales Subvaloradas y Subutilizadas
<i>H. pylori</i>	Helicobacter pylori
HyE	Hematoxilina y eosina
IBP	Inhibidores de la bomba de protones
INI	Instituto Nacional Indigenista
IU	Índice de ulceración
MALT	Mucosae associated lymphoid tissue
MU	Mucílagos obtenidos a partir de extractos acuosos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAS	Ácido peryódico de Schiff

PC	Peso corporal
PG	Prostaglandinas
rpm	Revoluciones por minuto
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SSI	Solución salina isotónica
TFG- $\alpha$	Factor alfa de crecimiento transformante
VacA	Citotoxina vacuolizante

## B. Lista de figuras

- Figura 1.1 Anatomía del estómago humano.
- Figura 1.2 Capas del estómago humano.
- Figura 1.3 Corte histológico del estómago humano.
- Figura 1.4 Factores defensivos de la mucosa.
- Figura 1.5 Imágenes de *Anoda cristata*, tallo, hojas y flor.
- Figura 1.6 Caldo de alaches y alaches al vapor.
- Figura 1.7 Vista macroscópica de un estómago de ratón.
- Figura 5.1 Mucílago de alache.
- Figura 5.2 Imágenes del programa ImageJ de un estómago representativo de ratón.
- Figura 6.1 Estómago normal de ratón, sin ningún tipo de tratamiento.
- Figura 6.2 Estómago representativo de un control negativo.
- Figura 6.3 Estómago representativo de un control positivo.



- Figura 6.14 Estómagos sometidos a inducción de úlcera, tratados con distintas dosis de mucílago de *A. cristata*.
- Figura 6.15 Efecto de la concentración del mucílago sobre el Índice de Ulceración.
- Figura 6.16 Vista macroscópica y microscópica de un estómago de ratón sin tratamiento y administración de etanol.
- Figura 6.17 Vista microscópica del estómago normal de un ratón.
- Figura 6.18 Vista microscópica del estómago de un ratón control negativo.
- Figura 6.19 Vista microscópica del estómago de un ratón control positivo.
- Figura 6.20 Vista microscópica de un estómago representativo de ratones tratados con dosis 100 mg/kg PC de *A. cristata*.
- Figura 6.21 Vista microscópica de un estómago representativo de ratones tratados con dosis 200 mg/kg PC de *A. cristata*.
- Figura 6.22 Vista microscópica de un estómago representativo de ratones tratados con dosis 300 mg/kg PC de *A. cristata*.
- Figura 6.23 Vista microscópica de un estómago representativo de ratones tratados con dosis 400 mg/kg PC de *A. cristata*.
- Figura 6.24 Vista microscópica de un estómago representativo de ratones tratados con dosis 500 mg/kg PC de *A. cristata*.

## C. Lista de tablas

- Tabla 1 Efecto gastroprotector del mucílago de *A. cristata*.

## D. Introducción

El presente trabajo de tesis tiene su origen en el trabajo multidisciplinario CONACyT 214286 titulado “Rescate de especies subvaloradas tradicionales de la dieta mexicana y su contribución para el mejoramiento de la nutrición en México”, en un afán de colaborar con la reivindicación de los quelites en la cultura alimentaria de nuestro país y con la finalidad de exaltar las propiedades nutricionales y medicinales de este grupo de plantas mexicanas y fomentar su consumo y aprovechamiento.

Al mismo tiempo, se pretende mostrar la patología de la úlcera gástrica como resultado de múltiples factores, difíciles de solucionar en conjunto y frente a la cual, un quelite en particular, el alache (*Anoda cristata*), parece mostrar efectos potenciales de interés médico, además de su ya conocido valor nutricional y alimenticio, pues dicho quelite forma parte de la gastronomía local de ciertas poblaciones de nuestro país.

Se unen así en esta tesis, dos líneas de investigación en una oportunidad de abundar en el conocimiento que se tiene del alache como agente curativo frente a la úlcera gástrica. Bajo los antecedentes ya estipulados, el trabajo descrito en los siguientes capítulos se enfoca en demostrar y determinar, cuantitativa y cualitativamente el efecto gastroprotector que tiene el mucílago de *Anoda cristata* frente al daño gástrico que causa un injuriante (etanol) en ratones.

# 1. Marco teórico.

## 1.1 Las enfermedades gastrointestinales en México.

En México, las enfermedades gastrointestinales (EGI), en particular las úlceras pépticas, la gastritis y la duodenitis, están consideradas como una de las principales causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte (Hernández *et al.*, 2011) ya que, de acuerdo con datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE, 2019), son consideradas uno de los principales problemas de salud pública en nuestro país, debido a que constituyen una causa importante de morbi-mortalidad.

Entre los numerosos padecimientos gastrointestinales que sufre la población adulta de nuestro país, se encuentran aquellos asociados a la presencia de la bacteria patógena *Helicobacter pylori*, cuya seroprevalencia en la población adulta en México es del 70% (Torres *et al.*, 1998). Sin embargo, no debemos descartar que un buen número de patologías gástricas, principalmente las úlceras, también están ligadas al consumo crónico de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), entre otros factores.

Con respecto a *H. pylori*, se reconoce que dicha bacteria se encuentra asociada al desarrollo de patologías como gastritis, úlcera péptica (Dixon, 2001), cáncer gástrico (IARC, 1994) y linfoma tipo MALT (del inglés “mucosae associated lymphoid tissue”, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas) (Blanchard y Czinn, 2017). En el 80% de los casos, los pacientes infectados con la bacteria pueden permanecer asintomáticos, sin embargo, del 10 al 20% de los individuos desarrollan úlcera péptica (gástrica o duodenal). De manera particular, se estima que *H. pylori* es responsable del 70-85% de las úlceras gástricas y del 90-95% de las duodenales (Kusters *et al.*, 2006).

De manera general, el tratamiento de las gastritis y de las úlceras pépticas se basa en el uso de fármacos dirigidos a la erradicación de *H. pylori*, en combinación con medicamentos que disminuyen la secreción del ácido gástrico. Desafortunadamente, estas terapias suelen fallar en el 20% de los casos debido a

diferentes factores (falta de apego al tratamiento, efectos adversos, altos costos y resistencia a los antibióticos). A pesar de las terapias disponibles, urge la necesidad de encontrar nuevos compuestos que permitan mejorar el tratamiento de las patologías antes mencionadas. En este sentido, los productos naturales y en particular algunas plantas, representan fuentes potenciales de compuestos que, en conjunto con los tratamientos actuales, podrían ayudar en el manejo de las úlceras, con la ventaja de ser más accesibles para la población y mejor tolerados.

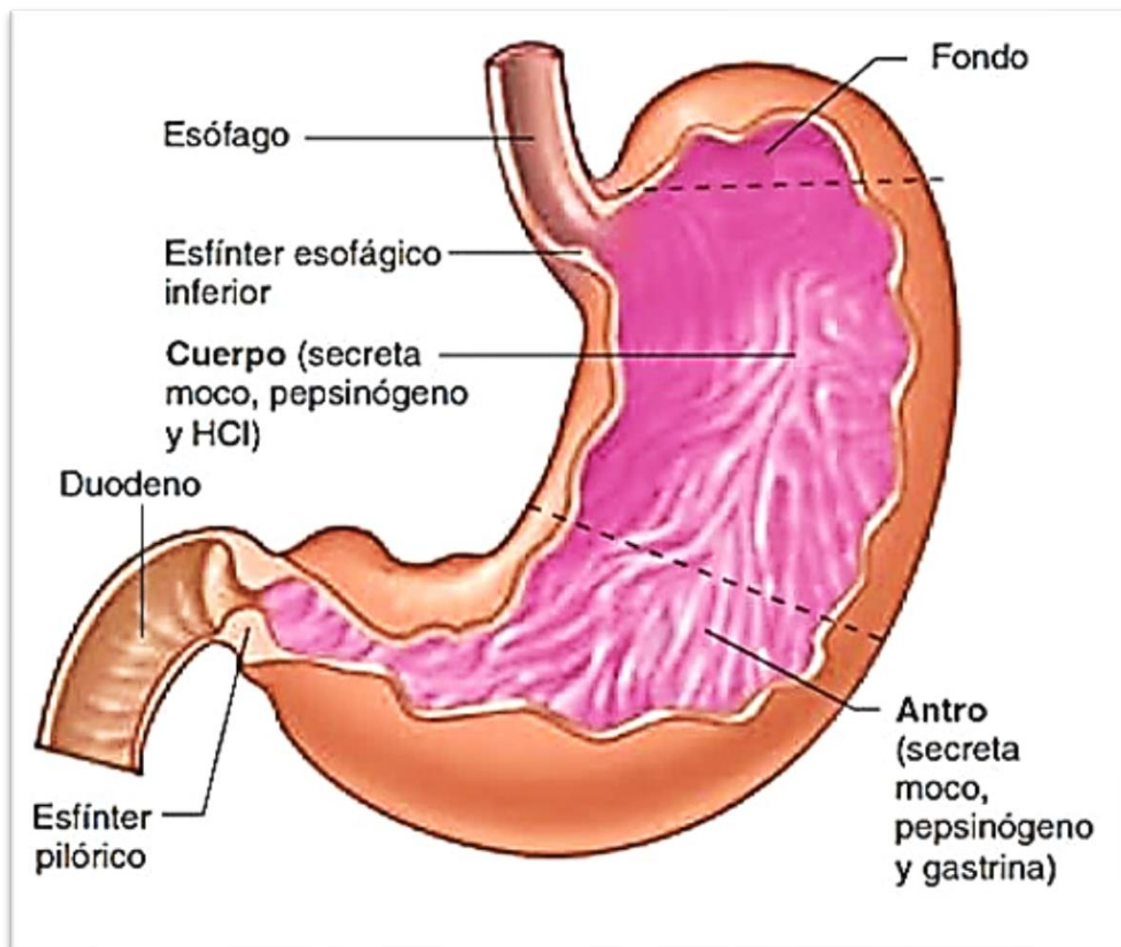
## **1.2. Generalidades de anatomía e histología del estómago humano.**

El sistema digestivo es el conjunto de órganos encargados de la digestión y absorción de los alimentos para su utilización por las células del organismo. Son funciones de este sistema el transporte de alimentos a través de los diversos órganos que lo componen, secreción de jugos gástricos, absorción de nutrientes y excreción de las heces restantes de estos procesos.

El aparato digestivo está conformado por el tubo digestivo, y glándulas anexas como las salivales, el hígado y el páncreas. El tubo digestivo comienza en la cavidad oral y termina en el ano, con una extensión de aproximadamente 10 a 12 metros de largo y corre a lo largo del interior del cuerpo recorriendo las cavidades torácica, abdominal y pélvica. Se subdivide en regiones morfológicamente diferenciadas: esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) e intestino grueso (ciego, colon, recto, apéndice y conducto anal) (Fox, 2011).

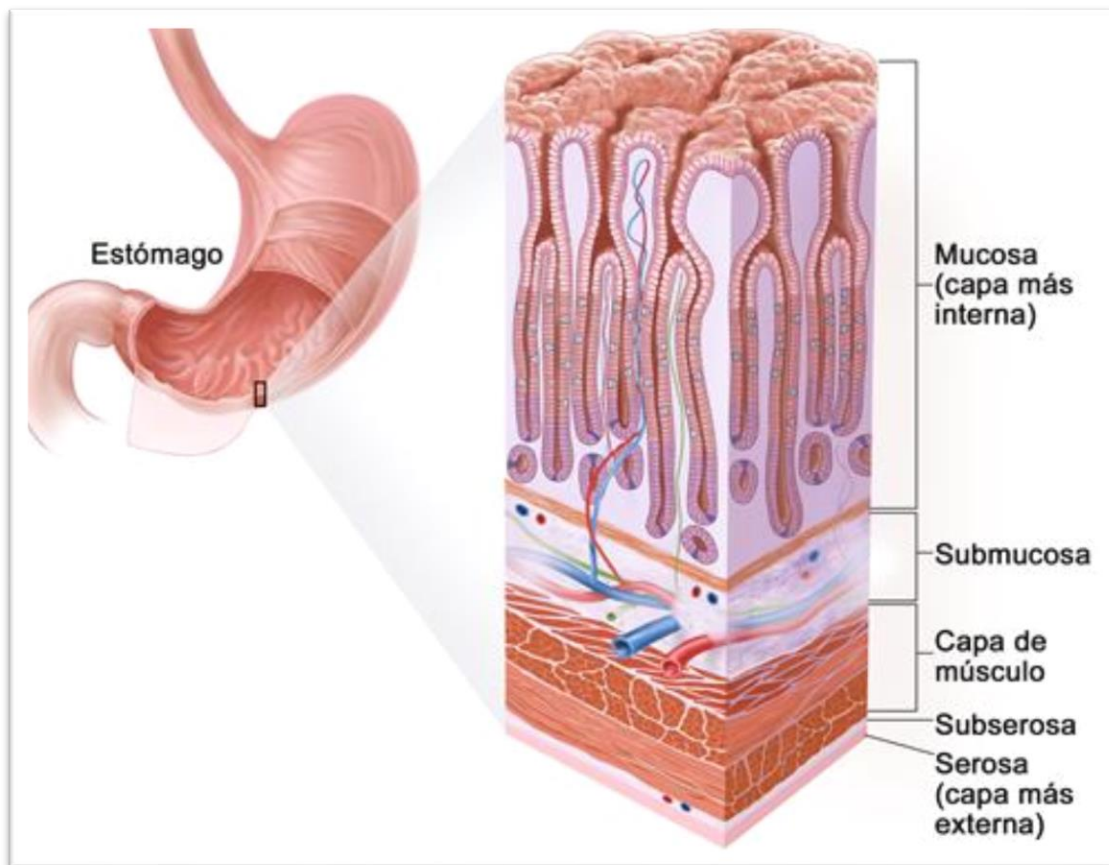
El estómago es la parte más dilatada del tubo digestivo. Situado entre el esófago y el duodeno (primera parte del intestino), es la región donde ingresa el bolo a través de la unión gastroesofágica, donde se almacenan los alimentos y se someten a un procesamiento hasta convertirse en un líquido viscoso denominado quimo. De manera intermitente, el quimo pasa hacia el duodeno a través de la válvula pilórica, para continuar con el proceso de digestión y absorción de los alimentos (Fox, 2011).

El tamaño del estómago varía considerablemente dependiendo del estado de plenitud (lleno o vacío) y anatómicamente, se divide en cuatro regiones principales: cardias, cuerpo, fondo y píloro, además dos curvaturas, una mayor convexa y una menor cóncava (Figura 1.1) (Moore *et al.*, 2013). Prácticamente todas las regiones del estómago presentan “arrugas”, que consisten en pliegues longitudinales de mucosa y submucosa que permiten el aumento de la capacidad gástrica conforme se llena con alimento o con jugos gástricos.



**Figura 1.1. Anatomía del estómago humano** (modificado de Barret, 2010).

En cuanto a la histología, la pared del tubo digestivo se describe en términos de cuatro grandes capas: mucosa, submucosa, muscular externa y serosa (o adventicia) (Figuras 1.2 y 1.3). De manera general, estas capas se asemejan a todo lo largo del tubo digestivo, sin embargo, existen características y especializaciones que son propias de cada región. La pared del estómago está conformada por estas cuatro capas, y desde el punto de vista histológico, fondo y cuerpo son idénticos. En cuanto a las regiones restantes, éstas presentan variaciones con respecto a la histología de la región fúndica.



**Figura 1.2. Capas del estómago** (modificado de Fox, 2011).

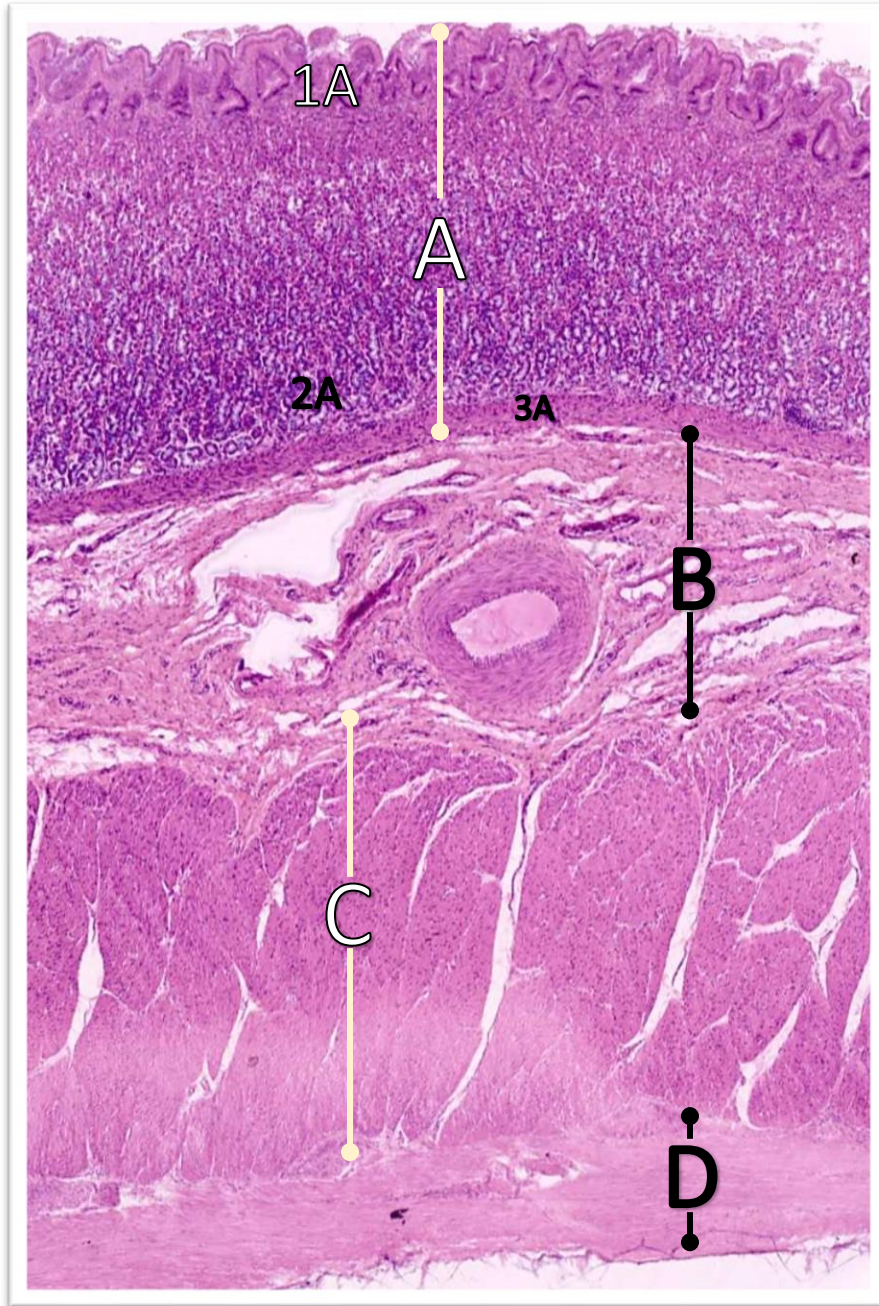
La capa más interna de la pared gástrica, es la mucosa, la cual a su vez está constituida por tres capas: a) un epitelio cilíndrico simple compuesto por células de revestimiento superficiales que elaboran una capa de moco que lubrica y protege al

propio estómago, además de otros tipos celulares con función especializada que conforman a las glándulas gástricas, como es el caso de las células principales, encargadas de la producción de pepsinógeno, renina y lipasa gástrica; o de las células parietales, que producen ácido clorhídrico y factor intrínseco; b) una capa de tejido conectivo subyacente, altamente vascularizado con una población rica en células plasmáticas, linfocitos mastocitos y fibroblastos, denominada lámina propia (*lamina propria mucosae*). Gran parte de la lámina propia está ocupada por unos 15 millones de glándulas gástricas; y c) células de músculo liso que conforman lo que se denomina capa muscular de la mucosa y están distribuidas a su vez en dos capas bien definidas, la circular interna y la longitudinal externa (Daniels *et al.*, 2005).

A la capa intermedia de la pared gástrica, se le conoce como submucosa, compuesta por tejido colagenoso denso de distribución irregular, así como una red vascular y linfática que riega y drena a los vasos de la lámina propia.

La siguiente capa de la pared gástrica corresponde a la capa muscular externa, constituida a su vez por células de músculo liso que se disponen en forma oblicua, circular y longitudinalmente.

Por último, la capa más externa que recubre al estómago corresponde a la serosa, la cual se compone de tejido conectivo subseroso laxo delgado, cubierto a su vez de un epitelio plano simple y húmedo (Daniels *et al.*, 2005).



**Figura 1.3. Corte histológico del estómago humano, tinción HyE.** A) Mucosa, 1A.- Epitelio de revestimiento superficial, 2A.- Lamina propia, 3A.- Muscular de la mucosa; B) Submucosa; C) Capa muscular propia; D) Serosa (modificado de Geneser, 1985).



### **1.3. Úlcera péptica.**

En determinadas condiciones, el estómago presenta enfermedades que tienen origen en muchas y variadas causas, una de estas patologías es la úlcera péptica.

La úlcera péptica es una enfermedad multifactorial que implica la presencia de heridas abiertas que afectan, en su mayoría, a la mucosa del estómago o del duodeno. De acuerdo con su ubicación pueden ser clasificadas como úlceras gástricas (estómago) o duodenales (duodeno, primera parte del intestino).

La enfermedad ulcerosa péptica constituye un problema grave de morbi-mortalidad, tomando en cuenta que esta enfermedad afecta a alrededor de 4 millones de personas en todo el mundo, sin embargo, la prevalencia de las úlceras varía dependiendo del género, la edad y la localización geográfica (Thorsen *et al.*, 2013).

Estas lesiones producidas en la pared del tubo digestivo pueden tener distintos niveles de profundidad: una erosión es de profundidad menor y solo afecta a la mucosa, una úlcera, ya sea aguda o crónica, puede atravesar la mucosa y la submucosa hasta llegar incluso a dañar la capa muscular. La morbi-mortalidad asociada a las úlceras se debe a que las complicaciones más graves, entre las que se incluyen hemorragias, perforaciones, (donde el daño ha llegado a comprometer toda la pared gástrica o duodenal) obstrucción gastrointestinal e incluso la aparición de neoplasias (Dimaline y Varro, 2007).

A continuación, por ser de interés para el presente trabajo, se hará énfasis en las características de la úlcera gástrica, ya que esta enfermedad afecta a alrededor de 4 millones de personas en todo el mundo (Thorsen *et al.*, 2013), y de manera particular a la población adulta de nuestro país (Hernández, 2011).

## **1.4. Etiología de las úlceras gástricas.**

De manera general, se considera que la úlcera gástrica es una patología multifactorial que es ocasionada por un desequilibrio en el que los factores agresivos para la mucosa gástrica sobrepasan a los mecanismos protectores de la misma. Por ello, para poder explicar el o los factores causales asociados a las úlceras gástricas, es necesario comprender en qué consisten los mecanismos que protegen y los que dañan a la mucosa (Frison, 1990).

### **1.4.1. Factores defensivos de la mucosa gástrica.**

Como se mencionó previamente, el estómago está revestido por una compleja mucosa que constituye una barrera selectiva entre el medio ambiente (lumen gástrico) y el medio interno. Dicha barrera está constituida principalmente por células epiteliales, las cuales desempeñan diversas funciones rodeadas de un medio hostil debido a la presencia de ácido clorhídrico (HCl), proteasas digestivas e incluso a algunos microorganismos patógenos. Sin embargo, aún en estas condiciones existen una serie de mecanismos de defensa que ayudan a mantener la integridad funcional y estructural de la mucosa. Para una mejor comprensión, es posible dividir estos mecanismos en tres tipos: 1) “Barrera” de moco-bicarbonato; 2) Epitelio gástrico y; 3) Componentes subepiteliales (microcirculación e inervación) (Figura 1.4) (Barret, 2010).

- **Barrera de moco-bicarbonato:** El moco gástrico es un fluido viscoso, elástico y adherente que sirve como primera línea de defensa contra el ataque bioquímico del HCl, la pepsina y otras sustancias agresivas presentes en el estómago. Está compuesto por agua (95%) y por una mezcla de glicoproteínas (mucinas), fosfolípidos y algunos péptidos (5%). Es secretado por las células epiteliales superficiales y se divide en dos capas: la capa interna (o moco visible) contiene una alta concentración de iones bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) que protegen a la mucosa de la acción corrosiva del HCl. Las mucinas del moco se encuentran unidas por puentes disulfuro, lo que le confiere una estructura consistente y con capacidad de extensión, en función de la distensión estomacal; además estas mucinas tienen una función de transducción de adhesión. La capa externa o moco soluble no

presenta los enlaces disulfuro por lo que su estructura es más débil en comparación con la capa interna; además, en esta capa la concentración de óxido nítrico (NO) es más alta en comparación con la capa interna, por lo que se ve incrementado su aporte como elemento defensivo contra microorganismos, al ser el NO un agente antimicrobiano de probado efecto (Díaz, 2015).

- Epitelio gástrico: La siguiente línea de defensa de la mucosa gástrica, la constituye una capa continua de células epiteliales superficiales que secretan moco,  $\text{HCO}_3^-$ , prostaglandinas (PGs) y otros componentes. Esta barrera epitelial separa el proceso digestivo que ocurre en el lumen, de los compartimientos internos del organismo, además de que permite que exista un intercambio selectivo de diferentes sustancias (secreciones y nutrientes) y protege al organismo al evitar la entrada de microorganismos o de antígenos externos, especialmente aquellos que puedan estar en los alimentos ingeridos. El mantenimiento de la integridad de este epitelio requiere de una fina regulación que permita el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular, esto permite que el epitelio tenga un recambio constante cuando existe daño o cuando las células superficiales ya están envejecidas. De manera general, podemos mencionar la importante participación de dos péptidos, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor alfa de crecimiento transformante (TFG- $\alpha$ ), que estimulan la proliferación celular a partir de células progenitoras y la secreción de moco. Su rol en el mantenimiento de la barrera epitelial resulta de gran importancia en el proceso de reepitelización ante una lesión de la mucosa gástrica. Uno de los productos secretados por estas células epiteliales son las moléculas llamadas prostaglandinas, sintetizadas a partir del ácido araquidónico, las cuales ayudan a atenuar e incluso a prevenir el daño de la mucosa, pues, aunque no se sabe con exactitud el mecanismo por el cual las PGs ejercen su acción citoprotectora, se considera que su efecto puede estar relacionado con la estimulación de secreción de moco,  $\text{HCO}_3^-$ , compuestos sulfhidrilo y el incremento del flujo sanguíneo, así como una disminución del reflujo ácido (HCl) hacia el epitelio (Malfertheiner *et al.*, 2009).

- Componentes subepiteliales (microcirculación e inervación): La irrigación sanguínea, en particular la microcirculación de la mucosa gástrica resulta de gran relevancia ya que es en esta forma como las células de la mucosa gástrica se mantienen con niveles adecuados de oxígeno y nutrientes, además de que se remueven sustancias tóxicas, y se regula el contenido de HCl que está en contacto con la mucosa. Al mismo tiempo, las células endoteliales que conforman el epitelio de los vasos sanguíneos desempeñan una importante función ya que se encargan de la síntesis de óxido nítrico (NO) que, a este nivel, se desempeña como una importante molécula de señalización que regula el tono del músculo liso vascular, favoreciendo la vasodilatación, inhibe la secreción de HCl a partir de las células parietales, estimula la secreción de moco y  $\text{HCO}_3^-$  y promueve la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos). De esta forma, la regeneración de una mucosa dañada depende en gran medida de la correcta irrigación que tenga las moléculas producidas por las células endoteliales (Malferteiner *et al.*, 2009).

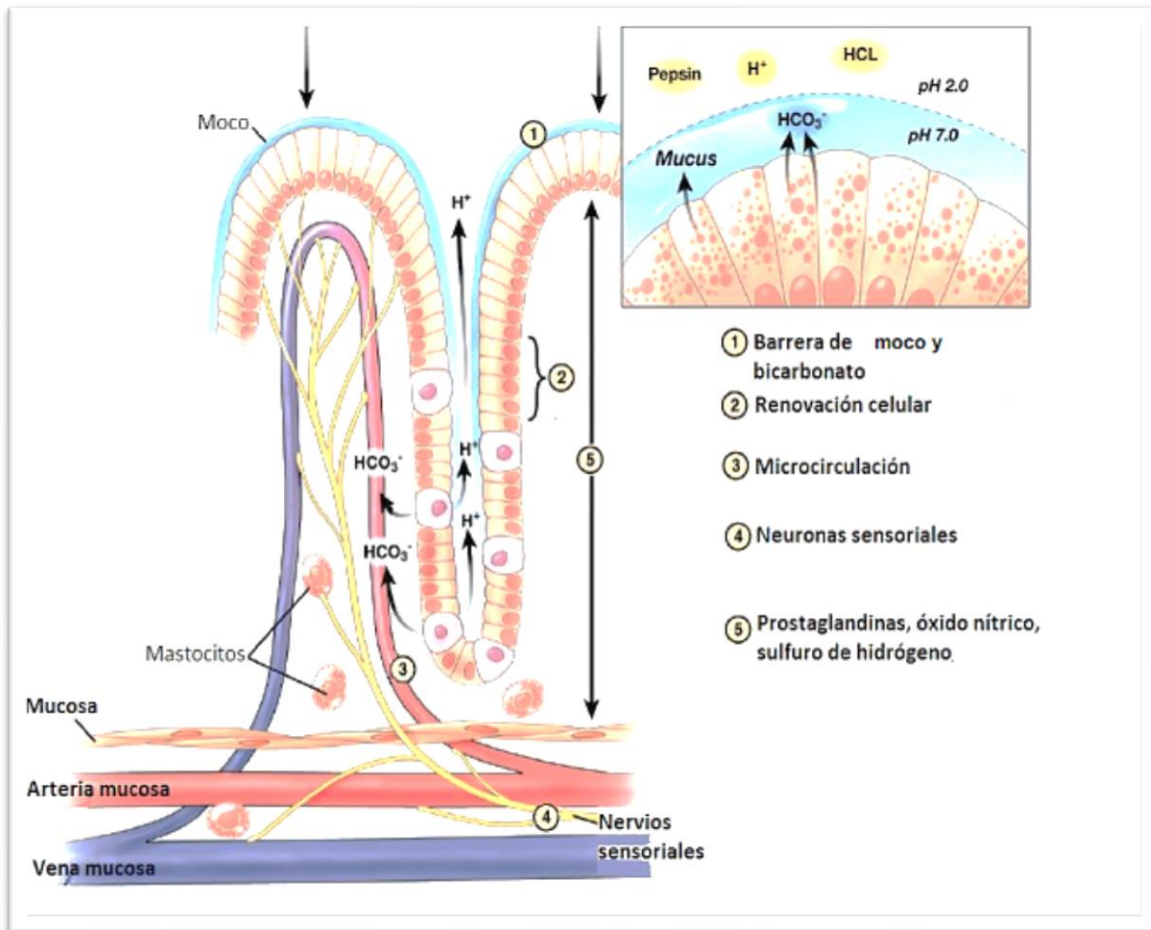


Figura 1.4. Factores defensivos de la mucosa. (Modificado de Laine *et al.*, 2008).

#### 1.4.2. Factores agresivos para la mucosa gástrica.

A pesar de los diferentes elementos con los que cuenta la mucosa gástrica para el mantenimiento de su integridad, existen muchos factores que alteran la homeostasis de los factores defensivos y por ende promueven el daño a la mucosa, como son: la propia secreción ácida, microorganismos patógenos como *H. pylori*, fármacos como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), alcohol, especies reactivas derivadas del oxígeno, entre otros compuestos químicos.

- Secreción ácida: Como parte del proceso de digestión de los alimentos, se secretan HCl y pepsinógeno. Cuando los alimentos llegan al estómago, tiene lugar la fase gástrica de la digestión. Aquí la presencia de alimentos

estimula la secreción de gastrina, una hormona producida por las células G de las glándulas localizadas en el antro del estómago. La gastrina se une a receptores específicos en la membrana de las células parietales y estimula la liberación de HCl al lumen gástrico. La presencia de los alimentos en el estómago, aunado a la condición ácida del estómago, provocan la secreción de pepsinógeno. En condiciones normales, esta potente acidez estomacal produce la desnaturalización de las proteínas de los alimentos y la transformación del pepsinógeno en pepsina, una proteasa. Estos dos elementos son fundamentales en la digestión de proteínas, así como en la defensa de la mucosa gástrica, evitando la colonización de agentes patógenos. La secreción de ácido es rítmica, en el período interdigestivo, el pH del estómago se encuentra próximo a 2 y la secreción es débil, casi nula, sin embargo, al recibir alimentos en el estómago, la secreción ácida aumenta hasta presentar un máximo que se reduce nuevamente a los niveles basales a las 4-5 horas. Sin embargo, se ha confirmado que en individuos que presentan úlcera duodenal las secreciones ácidas basal y estimulada son elevadas en cantidad y en tiempo de producción de HCl. Esta hipersecreción de ácido no tiene una única causa reconocida, habiéndose asociado a diversos factores tales como un incremento en la masa de células parietales, o la existencia de defectos en los mecanismos inhibidores de retrocontrol (Lozano, 2000).

- *Helicobacter pylori*: Es una bacteria Gram (-) con forma de bacilo helicoidal que coloniza el epitelio gástrico. Esta bacteria cuenta con varios factores de patogenicidad (colonización, virulencia y supervivencia) que son responsables de promover la producción de citocinas proinflamatorias, daño de la mucosa gástrica, inducción de apoptosis, proliferación celular e incluso transformación del epitelio. Además, estos diferentes mecanismos le permiten a la bacteria adaptarse generando cambios en su entorno que le permiten vencer a los mecanismos protectores de la mucosa gástrica e incluso a evadir la respuesta inmunitaria del hospedero. Por ejemplo:

La presencia de varios flagelos polares (4 a 6) y el propio movimiento espiral de la bacteria le dan una alta motilidad para impulsarse a través de la capa de moco

y aproximarse a las células del epitelio donde, comparado con el lumen gástrico, el ambiente es menos hostil para la bacteria. Además, esta motilidad le ayuda a soportar los movimientos peristálticos propios del tubo digestivo, con lo que evita su eliminación.

La ureasa de *H. pylori* es un importante factor de colonización y de supervivencia. Esta enzima hidroliza la urea presente en el ambiente gástrico, produciendo amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), lo que le permite crear un microambiente óptimo que le ayuda a soportar el ambiente hostil ácido del estómago.

Proteínas de membrana externa, algunas también conocidas como adhesinas, que le permiten a la bacteria fijarse a las células del epitelio gástrico. La adherencia de *H. pylori* a las células epiteliales es un elemento esencial para su colonización exitosa pero además, al adherirse, permite que otros factores de virulencia (CagA y VacA) se pongan en contacto con las células epiteliales, ocasionando inflamación y muerte celular, lo que compromete la estructura de la mucosa y tiene como consecuencia la liberación de sustancias tóxicas que a su vez propician diferentes niveles de daño, iniciando con la inflamación del tejido gástrico, ulceración y, a largo plazo, transformación celular que lleva a la generación de neoplasias malignas, tales como el adenocarcinoma gástrico o el linfoma tipo MALT (García, 2013).

- Consumo prolongado de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Este es un grupo de fármacos compuesto principalmente por antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos. Su mecanismo de acción consiste en inhibir a la enzima ciclooxigenasa (COX), una enzima clave en la biosíntesis de prostaglandinas (PGs), que a su vez tienen un rol importante en la protección gastrointestinal, la homeostasis vascular, la hemodinámica renal, y la función plaquetaria. La función de los AINEs es inhibir las COXs y, por tanto, la consecuente producción de PG, con lo que se reduce la liberación de sustancias y mediadores inflamatorios, previniéndose la activación de los receptores terminales asociados al dolor, y en un caso concreto los de la región preóptica hipotalámica que regula la temperatura corporal. Sin embargo, la mayoría de los AINEs disponibles en el mercado son poco

selectivos con las enzimas que inhiben, por lo que, a la par de generar efectos antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos, la producción de PG asociada a la producción de factores defensivos de la mucosa gástrica también se ve afectada, resultando en una menor protección frente a factores agresivos y, con el tiempo, en patologías como la ulceración (García y Gómez, 2000).

- Estrés oxidativo: Se sabe que aquellos factores que promueven la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno (EROS) (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos, etc.) juegan un rol importante en el daño tisular que provoca inflamación y ulceración gástrica. La sobreproducción de ROS provoca daño debido a la lipoperoxidación, oxidación de proteínas y alteraciones al ADN, lo que provoca muerte celular y por lo tanto lesiones en la mucosa que van desde erosiones hasta ulceraciones que pueden llegar a comprometer todo el espesor de la pared gástrica (Viada *et al.*, 2017).

- Etanol. De acuerdo con el reporte más reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018), en el año 2016, el consumo de alcohol provocó alrededor de 3 millones de muertes en todo el mundo, además de estar asociado al desarrollo de diversas enfermedades, entre las que destacan las gastrointestinales. El efecto que tiene el etanol en el tracto digestivo se debe a su contacto directo con la mucosa y a los numerosos cambios metabólicos y funcionales que puede provocar tras su absorción. Una vez que el alcohol se pone en contacto con la mucosa gástrica, causa daño membranal, exfoliación de las células, inflamación, erosiones y formación de úlceras. Por ello, las principales lesiones asociadas comprenden a la gastritis aguda o crónica, úlcera péptica e incluso carcinoma gástrico cuando existe una exposición persistente debido al efecto mutagénico. Se considera que el daño por etanol está mediado por la generación de EROS. Así mismo, la inflamación y las alteraciones inmunológicas están directamente relacionadas con el grado de estrés oxidativo (Park *et al.*, 2008). Aunado a la alteración directa de la integridad de la mucosa gástrica, el etanol induce secreción de ácido mediante la estimulación de una mayor producción de gastrina. Al haber más ácido en el lumen gástrico y en presencia de una mucosa dañada, se produce



un fenómeno de reflujo ácido hacia las diferentes capas que conforman a la mucosa y la submucosa, perpetuando así el daño (Mutoh, *et al.* 1990).

A pesar de que continuamente la mucosa gástrica se encuentra expuesta a diversos factores que pueden dañarla, la presencia de factores que la protegen permite que pueda mantener su integridad estructural y funcional. Sin embargo, como se mencionó al inicio de esta sección, las úlceras aparecen entonces como resultado de la alteración del equilibrio entre los agentes que lesionan a la mucosa gástrica y aquellos mecanismos que se encargan de defenderla y restituirla. En este contexto, el conocimiento tanto de los factores nocivos como de los protectores permite enfocar el estudio en la búsqueda de fármacos o compuestos que, por un lado, ayuden a potenciar los mecanismos de defensa y los que promueven su regeneración y, por otro lado, a bloquear o disminuir el efecto de los elementos lesivos (Pérez, 2017).

### **1.5. Tratamiento de la úlcera péptica.**

Durante décadas, se afirmó que la secreción de ácido por el propio estómago era la causa principal de la úlcera péptica. Esto hizo que, por más de un siglo, el tratamiento estuviera únicamente enfocado a suprimir la secreción de HCl principalmente en forma quirúrgica (vagotomías). Posteriormente, con el conocimiento de fármacos que podían tener efecto antsecretor de ácido como la ranitidina y el omeprazol, estos se convirtieron en el eje del tratamiento de las úlceras. Sin embargo, en los últimos 30 años, las estrategias terapéuticas han cambiado, sobre todo con el descubrimiento de que *H. pylori* es uno de los principales factores etiológicos de la úlcera péptica. Con esta información, el uso de antimicrobianos dirigidos contra *H. pylori*, en combinación con el uso de fármacos antsecretores, se ha convertido en la base de las terapias para el manejo de la úlcera péptica.

Así, se ha procurado que el tratamiento de la úlcera péptica esté dirigido a las causas que la originan. Por ejemplo, algunos de los fármacos empleados se

enfocan en tratar de proteger directamente a la mucosa (citoprotectores), mientras que otros siguen teniendo como blanco la reducción en la producción y/o secreción del HCl o incluso su neutralización. Por supuesto, cuando se confirma la presencia de *H. pylori* como causa de la ulceración, el tratamiento consiste en su erradicación. Tomando en cuenta que de manera general se considera que el 70 a 80% de las úlceras gástricas son provocadas por *H. pylori*, y que el consumo crónico de AINEs es responsable del 25%, el tratamiento más común es el manejo con antibióticos asociado a algún antisecretores.

La terapia con antibióticos es el único tratamiento efectivo para el manejo de las úlceras gástricas causadas por *H. pylori*. Entre los principales fármacos con efecto sistémico que se emplean en el tratamiento se encuentran: la amoxicilina, claritromicina, metronidazol, tetraciclina, levofloxacino y rifabutina. Los diferentes esquemas de tratamiento se basan en la administración de al menos dos antibióticos junto con un inhibidor de la bomba de protones (IBP) o incluso sales de bismuto. El esquema con el que usualmente se inicia, es el que se conoce como la triple terapia, el cual consiste en la administración durante 14 días de claritromicina más amoxicilina o metronidazol, además de un IBP. Existen consensos internacionales y nacionales que emiten recomendaciones con respecto al esquema de tratamiento más recomendado, el cual varía mucho en función del porcentaje de las resistencias reportadas con respecto a alguno de los antibióticos. En esos casos, se recurre a otros esquemas terapéuticos que consisten en diferentes combinaciones de los antibióticos ya mencionados (Shin, 2013).

Otros fármacos, comúnmente conocidos como antisecretores, tienen como blanco la modulación de la producción y/o secreción del HCl. Por ejemplo, los inhibidores de los receptores H<sub>2</sub> funcionan bloqueando la acción de la histamina en las células parietales, evitando la secreción de HCl (Montes *et al.*, 2005). Ranitidina, famotidina, cimetidina, nizatidina, son los fármacos de uso clínico más recurrentes, aunque actualmente su uso ha disminuido desde la aparición de otro tipo de fármacos, los de acción inhibidora de la bomba de protones.

Los IBP actúan bloqueando la proteína ATPasa, que está situada en la membrana de las células epiteliales y que participa en la etapa terminal de la secreción de iones  $H^+$  hacia el lumen gástrico. Este bloqueo reduce la acidez gástrica hasta en un 90%. Además, su efecto de acumulación en la superficie de la mucosa también tiene un efecto citoprotector importante (Shin y Sachs, 2008).

Otro grupo de medicamentos que tienen efecto sobre la acidez gástrica, pero por un mecanismo diferente a los antiseoretos, corresponde a los antiácidos. Los antiácidos son sustancias de carácter alcalino, que aumentan los valores de pH del contenido del estómago al neutralizar parte del HCl que ahí se encuentra. Se clasifican en dos tipos de acuerdo con su mecanismo de acción:

- Antiácidos no sistémicos. El antiácido reacciona con el HCl presente en el estómago, neutralizándolo y dando como producto una sal que no se absorbe en la pared del estómago, por lo que sus efectos secundarios (deficiencia ósea, efecto laxante, hipercalcemia, entre otros) se presentan a largo plazo, pero con elevada intensidad. Tienen un efecto neutralizante lento y sostenido. Ejemplo de estos antiácidos son: sales de magnesio, aluminio y calcio.

Antiácidos sistémicos. Al contrario del grupo anterior, la sal resultante de la reacción de neutralización ácido-base es absorbida por el epitelio gástrico, la cual puede tener importantes efectos secundarios como la alcalosis metabólica, desequilibrio electrolítico y daño renal. Algunos de estos antiácidos son el bicarbonato de sodio y el hidróxido de magnesio. De manera general, los antiácidos suelen ser menos utilizados en el manejo de las úlceras debido al mayor número de efectos secundarios asociados.

Por último, también se cuenta con los fármacos citoprotectores, los cuales tienen la capacidad de proteger la mucosa gástrica evitando la aparición de lesiones hemorrágicas o necróticas a través de diferentes mecanismos, pero sin incidir en la producción y/o secreción ácida (Ham, 2012). Entre los fármacos con este efecto destacan:

- Sucralfato. Es un complejo sacarosa-sulfato-aluminio que, una vez ingerido se fija al tejido necrótico de la úlcera y forma una barrera de protección, además estimula la secreción de moco, bicarbonato y prostaglandinas, absorbe la pepsina, e induce el factor epitelial de crecimiento, restaurando la mucosa.

- Sales de bismuto. Estas forman una capa protectora sobre la mucosa evitando el contacto directo de esta con el HCl y la pepsina; además estimulan la secreción de prostaglandinas, y tienen un efecto bactericida pues se unen a la pared de las bacterias inhibiendo la secreción de ciertas enzimas necesarias para su sobrevivencia y evitando su adherencia. Por estos efectos, las sales de bismuto suelen ser incluidas en el tratamiento contra *H. pylori*.

- Análogos de prostaglandinas. Su consumo propicia los mismos efectos de las prostaglandinas endógenas debido a su similitud estructural con estas moléculas: inducen la producción de moco y bicarbonato, aumentan el flujo sanguíneo y contribuyen a la reepitelización de la mucosa gástrica. Son ejemplo de ellos el misoprostol, rioprostil, trimoprostil, entre otros.

- Existen otros fármacos con efectos similares que, aunque no son análogos de prostaglandinas, su consumo promueve la secreción de éstas. De entre ellos, es importante resaltar a la carbenoxolona por su utilización en este trabajo. La carbenoxolona es un derivado sintético del ácido glicirretínico, del cual se ha reportado actividad antiulcerogénica, tanto en modelos animales como en seres humanos, sin inhibir la secreción ácida gástrica (Baron, 1977), además de que actúa facilitando la curación de las úlceras gástricas (Doll, et al., 1965). Existen diversos estudios en donde se prueba la actividad de la carbenoxolona, entre ellos, se ha reportado que su administración reduce la actividad péptica (Henman, 1970), incrementa la secreción de moco gástrico (Goodier, et al., 1967), incrementa el tiempo de vida de las células del epitelio gástrico (Lipkin, 1971), aumenta la producción de prostaglandinas (Takeuchi, et al., 1998) y eleva el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica (Guslandi *et al.*, 1994). Sin embargo, actualmente, la carbenoxolona prácticamente no es incluida en los esquemas terapéuticos para el manejo de las úlceras pépticas.

### **1.5.1. Problemas del tratamiento de la úlcera péptica**

A pesar de los diferentes esquemas de erradicación de *H. pylori* disponibles y del uso conjunto de fármacos que inciden sobre la acidez gástrica o que tienen efecto citoprotector, sigue existiendo un importante nivel de falla terapéutica en el manejo de las úlceras. Los factores que favorecen la falta de respuesta a los tratamientos convencionales son principalmente: los numerosos efectos adversos locales y sistémicos de los antibióticos, antisecretores, antiácidos y citoprotectores, a los altos costos de las terapias, a la falta de apego del paciente o simplemente como consecuencia de la presencia de úlceras refractarias a las terapias convencionales.

Los tratamientos para la erradicación de *H. pylori* son largos (14 días), costosos, y provocan en la mayoría de los casos diferentes efectos secundarios, lo que propicia el abandono de la terapia y por ende la aparición de cepas resistentes a los antibióticos utilizados, por lo que su efectividad se ve reducida. Esto provoca tanto la recurrencia de la infección como la reaparición de las lesiones ulcerosas que nunca se recuperaron en su totalidad (De Francesco *et al.*, 2012).

Ante este panorama, la necesidad de buscar terapias alternativas para la prevención y/o resolución de la úlcera péptica es cada vez mayor. Tomando en cuenta todos los elementos descritos que favorecen el daño ulceroso, no cabe duda de que los nuevos enfoques alternativos deberían buscar fortalecer o mejorar los mecanismos que protegen y que promueven la homeostasis de la mucosa (efecto gastroprotector), ya que como se mencionó previamente, el enfoque terapéutico actual se dirige principalmente a los factores etiológicos (*H. pylori* y AINEs). O bien, una vez que ya se ha producido el daño, buscar compuestos que favorezcan una reparación histológica más efectiva de las lesiones ulcerosas, lo que evite así las recurrencias. En este contexto, en los últimos años ha venido aumentando el interés en el uso de terapias alternativas, principalmente las basadas en el uso de productos naturales y en particular, las plantas, las cuales constituyen una de las fuentes más atractivas para la obtención de compuestos con efecto gastroprotector

o que ayuden a mejorar la calidad histológica de resolución de las úlceras (Bucciarelli, 2007).

### **1.5.2. Medicina tradicional, una alternativa de tratamiento.**

Mundialmente, el uso de plantas medicinales para preservar o recuperar la salud es una práctica ampliamente aceptada y sumamente frecuente. La OMS ha estimado que aproximadamente el 80% de la población mundial hace uso de la medicina tradicional, incluido el uso de plantas llamadas medicinales, para satisfacer sus necesidades de salud (OMS. 2013).

En los últimos años, la investigación científica sobre plantas medicinales se ha encaminado a generar información sobre, entre otras cosas, la naturaleza química y propiedades farmacológicas de los productos naturales, de manera que pueda existir, de ser posible, la obtención o desarrollo de algún compuesto nuevo que pueda ser usado como medicamento (Cragg y Newman, 2005).

México está considerado dentro del selecto grupo de los países llamados “megadiversos” que, en su conjunto, albergan alrededor del 70% de la biodiversidad del planeta. Se tiene documentado que, a nivel de especies, en México habitan aproximadamente el 10% de las totales que existen en el mundo, conservadoramente se ha estimado que en el país habitan alrededor de 200 mil especies distintas. En el caso de la flora de nuestro país, se ha establecido que es una de las más amplias y complejas del mundo (entre 22 000 y 31 000 especies), situando al país en el quinto lugar a nivel mundial (Llorente y Ocegueda, 2010).

Además, es sumamente amplia la herencia de los pueblos prehispánicos en materia de plantas medicinales, constituyéndose uno de los pilares de la cultura primigenia de nuestra nación, por lo que es de gran importancia rescatar el conocimiento que de estas plantas se tiene en un marco científico, metódico y reproducible.

De acuerdo con el Instituto Nacional Indigenista (INI), en México existen alrededor de 3 500 especies de plantas que poseen algún atributo medicinal y que

son utilizadas con regularidad por la población con el fin de aliviar diversos padecimientos. Es tal la importancia de estas especies que, desde 1997, la Ley General de Salud reconoce la existencia de remedios y medicamentos herbolarios, que, a su vez, provienen del empleo del y conocimiento empírico sobre plantas medicinales. Lamentablemente, aun demostrada la importancia de estas especies, sólo algunas han recibido una correcta valoración farmacológica, no se diga ya una adecuada apreciación económica y social (Argueta, *et al.*, 1994).

En nuestro país, se tiene registro que para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales son utilizadas más de 50 especies de plantas medicinales, casi todas ellas encaminadas a tratar la gastritis y la úlcera péptica, que son de las enfermedades más recurrentes entre la población. Algunas de estas plantas son: el cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) la manzanilla (*Chamaemelum nobile*), la sábila (*Aloe vera*), la mejorana (*Origanum majorana*), Boldo (*Peumus boldos*), la salvia (*Salvia officinalis*), el romero (*Rosmarinus officinalis*), el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), el alache (*Anoda cristata*), entre otros muchas (Navarrete *et al.*, 2002).

Sin embargo, estas plantas casi siempre son usadas en mezclas de ellas para asegurar un amplio espectro de acción, por lo que dilucidar los principios activos que intervienen en el alivio de estas patologías constituye un reto considerable para la comunidad científica (Argueta, *et al.*, 1994).

Al conocer que la úlcera péptica es consecuencia de un desequilibrio entre los factores defensivos y agresivos de la mucosa gastrointestinal, los estudios con plantas con potencial antiulceroso son realizados con modelos de producción de úlcera a base de métodos químicos y físicos, entre ellos la administración de etanol. Bajo esta óptica, solo algunas de estas plantas usadas para el alivio de la gastritis y úlcera péptica han sido sometidas a estudios farmacológicos profundos (Palacios *et al.*, 2011). Se ha encontrado que los efectos contra la gastritis y la úlcera que presentan estas plantas se generan por medio de varios mecanismos: actividad antioxidante, estimulación de la producción de moco, alivio de la inflamación, e incluso propiedades antimicrobianas (Bi *et al.*, 2014).

## **1.6. Los quelites, una perspectiva sociocultural.**

Algunas de las plantas que se han señalado como paliativos en padecimientos gastrointestinales también fungen como alimentos, la mayoría consumidos en forma de infusiones o bien en la preparación de diversos platillos. Estas propiedades curativas podrían estar justificadas por el hecho de que, algunas de estas plantas utilizadas como alimentos, contienen también una serie de sustancias no nutritivas (que intervienen en el metabolismo secundario de las plantas como colorantes, aromáticos, reguladores del crecimiento, protectores naturales frente a parásitos entre otros), y que no son consideradas esenciales para la salud humana pero que pueden tener un impacto significativo en el curso de algún padecimiento; éstas son llamadas sustancias bioactivas (o fitoquímicos).

Esto ha dado lugar a lo que se conoce como alimentos funcionales, alimentos a los que se les ha demostrado una o más funciones benéficas para el organismo, ya sea para el bienestar, salud o para la reducción del riesgo de una enfermedad, más allá de efectos sus nutricionales. Un alimento funcional debe reportar dichos beneficios al ser consumido en cantidades normales en la dieta (Diplock *et al.*, 1999).

Aunque comercialmente el concepto de “alimentos funcionales” es atractivo, aún resulta complicado demostrar y describir plenamente sus efectos, precisar las sustancias responsables y sus mecanismos de acción y, además, demostrar que dichos efectos son independientes de su función en la nutrición, por lo que los esfuerzos que se han implementado en la investigación de estos alimentos aún se encuentran en etapas tempranas de desarrollo.

No obstante, el hecho de que México sea reconocido como un importante centro de origen y domesticación de plantas comestibles, entre ellas algunas de importancia alimentaria mundial, como el maíz, el frijol y el jitomate (CONABIO, 1998), existe otro grupo dentro de estas especies de plantas comestibles endémicas de nuestro país que reúnen propiedades igual de interesantes que los llamados macro cultivos, y concretamente con propiedades antiulcerosas que no han sido



explotadas al máximo nivel. Entre estos últimos, se puede incluir al grupo de los quelites.

La palabra “quelite” proviene del vocablo náhuatl *quilitl*, que se ha traducido como “hierba tierna comestible”; es decir, un quelite es definido como aquella planta cuyas hojas, tallos y en ocasiones sus inflorescencias tiernas son consumidas como alimento. Entre los quelites de uso más común, se encuentran el pápalo (*Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum*), la verdolaga (*Portulaca oleracea*), el quintonil (*Amaranthus* spp.), el romerito (*Suaeda nigra*), el cenizo (*Chenopodium berlandieri* subsp. *berlandieri*), el huauzontle (*C. berlandieri* subsp. *nuttalliae*) el alache (*Anoda cristata*), el epazote (*Dysphania ambrosioides*), la chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*), la hoja santa (*Piper auritum*) y el chepil (*Crotalaria* spp.), entre otros (Bye, 1981).

Las formas tradicionales de consumir estas hierbas son muchas y variadas. Algunas hojas y tallos de ciertas especies se consumen crudas. Otras son sometidas a procesos de cocido y freído y se combinan con la gastronomía local en forma de sopas, guarniciones, condimentos o incluso como plato principal (Bye, 1981).

La presencia de los quelites en la gastronomía del Valle de México tiene razón de ser en la manera en que son obtenidas estas plantas, pues los quelites son propios de zonas templadas, donde crecen de manera espontánea en los campos de cultivo durante la época de lluvias (Bourges *et al.*, 2013).

El sistema de producción conocido como milpa (que incluye a varias especies como el maíz, frijol, calabaza, chile y otras) proporciona las características del suelo necesarias para propiciar el crecimiento espontáneo de los quelites ya que, aunque se desarrollan en el mismo espacio físico que estos otros cultivos, no compiten directamente con ellos, además de que son comparativamente más económicos y no requieren grandes cuidados para su crecimiento óptimo (Gálvez y Bourges 2012).

Sin embargo, las estadísticas sobre el consumo de quelites en México son prácticamente inexistentes, y sobre su naturaleza química existen datos de muy pocas especies. Agrupados en el rubro de “hortalizas”, la composición nutrimental de los quelites es, en términos generales, similar a la de otras verduras de hoja: de manera general, alrededor del 20% se compone de agua y entre los sólidos que posee (aproximadamente del 20%) se encuentran carbohidratos (la mayor parte fibra) y pequeñas cantidades de lípidos, carbohidratos, proteínas y nutrimentos inorgánicos. Varios quelites autóctonos, como la chaya, el chepil y el romero contienen incluso un 6% de proteína, valor alto comparado con el de vegetales de cultivo más común (Yildirim *et al.*, 2001). Entre los micronutrientes presentes en estas especies se han reportado cantidades importantes de vitamina A y C, así como riboflavina, tiamina y niacina, diversos carotenos y nutrimentos inorgánicos como el calcio, el potasio, el magnesio, el fósforo y, en menores cantidades, el hierro, el sodio y el zinc (Morales de León *et al.*, 2013).

La poca información disponible sobre los quelites obedece a la equivocada percepción cultural que se tiene de este alimento. Al ser especies endémicas del Valle de México, los quelites jugaron un papel central en la dieta de los pueblos mesoamericanos, llegando incluso a ser un alimento de carácter sagrado, utilizado en los rituales aztecas de inicio de año. Con la conquista española el cultivo, consumo e importancia de los quelites se vieron drásticamente mermados, pues tuvo lugar un proceso de sustitución de estas hierbas en pro de especies europeas y asiáticas, dejando a los quelites con una etiqueta de alimento de segunda, consumido por las poblaciones de bajos estratos sociales, estigma que, hasta nuestros días, mantiene a estas especies excluidas de intereses económicos, sociales y políticos (Bye y Linares, 2000).

Muchas especies de quelites han sido popularizadas como remedio tradicional de algunos malestares y padecimientos sufridos por la población mexicana (Bourges, 2015). Se ha reportado que, además del aspecto nutricional, presentan propiedades contra dolencias como dolor e inflamación gastrointestinal, padecimientos respiratorios, dolores musculares y fiebre (BDMTM, 2009), además

de que algunos compuestos aislados de ciertas especies presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria, cardioprotectora (García, *et al.*, 2014), antimutagénica y antidiabética (Loarca, *et al.*, 2010).

El abandono masivo de las especies nacionales tradicionales también puede explicarse en los modernos hábitos alimenticios de la población mexicana, el consumo de productos industrializados con alto contenido calórico, la introducción de proteína animal extranjera de menor calidad debido a sus reducidos costos, y pérdida de la competitividad en general del campo mexicano son algunos de los factores a considerar (Bye, 1981).

En el caso concreto de los quelites, la disminución de su consumo es tal, que, según los registros (Bye y Linares, 2000), en la actualidad solo se comercializan de manera regular en la región centro del país unas 20 especies de las 150 que se consumían en el México prehispánico.

Tomando en cuenta esto, se detecta un nicho de oportunidad en el ámbito de las políticas públicas, pues hasta ahora ningún programa social ha sido implementado en favor de este grupo alimenticio, lo que resulta en la exclusión de la agenda de investigación y desarrollo. Se requiere incrementar los estudios sobre aspectos comerciales y nutricionales de estas especies que resulten en nuevas y mejores políticas para su cultivo, comercialización y promoción.

A pesar de este panorama adverso, el consumo de quelites está integrado a la cultura loca de algunas poblaciones, utilizados en dos importantes aspectos de la vida cotidiana: como medicina tradicional y en las preparaciones de alimentos tradicionales. Partiendo de estos usos definidos, poco a poco comienzan a hacerse esfuerzos para investigar y documentar sus diferentes formas de obtención, usos, propiedades y composición. (Gálvez y Bourges, 2012, Morales de León, 2013; Ayala, 2016).

Es así como surge la iniciativa de catalogar estas especies bajo el concepto de Especies Tradicionales Subvaloradas y Subutilizadas (ETSS), especies y variedades de cultivos de uso tradicional/ancestral con adaptación a nichos agro-

eco-lógicos específicos, con valor nutrimental importante pero cuyo cultivo y uso, en algunas instancias, se ha reducido o está disminuyendo (Gálvez y Peña, 2015), que son importantes para el consumo local pero que en un panorama mundial e incluso nacional, no figuran en las agendas políticas, sociales y económicas, siendo vulnerables por los sistemas de mercado globalizado (Padulosi y Hoeschle-Zeledon, 2004).

En un esfuerzo por revertir esta situación, se inició el proyecto multidisciplinario (CONACyT 214286) titulado “Rescate de especies subvaloradas tradicionales de la dieta mexicana y su contribución para el mejoramiento de la nutrición en México”, teniendo resultados muy alentadores sobre tres especies de quelites, las cuales fueron seleccionadas por cumplir las características enlistadas continuación

- Importante en el sistema de producción y consumo local.
- Alto nivel de adaptación a nichos agroecológicos y áreas marginales.
- Ignorados por tomadores de decisiones y excluidos de las agendas de investigación y desarrollo.
- Representados por variedades locales.
- Cultivadas y utilizadas con base en conocimientos locales.
- Poco representados en bancos de genes *ex situ*.
- Caracterizados por un sistema de suministro de semillas frágil o inexistente (Padulosi y Hoeschle-Zeledon, 2004).

El chepil (*Crotolaria longirostrata*), proveniente de la región poniente de Oaxaca, la chaya (*Cnidocolus chayamansca*), de la península de Yucatán, y el alache (*Anoda cristata* (L.) Schltl.) colectado en la zona oriente del Estado de México, fueron las tres especies de quelites que cumplían a con los criterios de selección para su estudio, teniendo resultados muy interesantes, tanto a nivel biomédico como social. El proyecto CONACyT en cuestión incluyó en su reporte final una valoración ecológica, botánica, y biológica de las tres especies, así como

estudios de sus cadenas de valor, de los impactos socioeconómicos que tienen en las regiones estudiadas y sus valores etnobotánicos y antropológicos, además de haber avanzado en el conocimiento de su perfil como alimento, es decir su composición química, contenido nutrimental y su aportación a la dieta de los mexicanos.

El estudio de los quelites ofrece resultados prometedores en cuanto a su contenido de nutrimentos y, en algunos casos, de sustancias bioactivas con propiedades interesantes en el campo de la salud. De manera particular, una de las líneas de investigación de este proyecto CONACyT señaló a las tres especies de estudio antes mencionadas (alache, chaya y chepil) como paliativos usados popularmente en padecimientos relacionados con malestar estomacal (acidez) y gastritis.

#### **1.6.1. El alache como un potencial gastroprotector.**

*Anoda cristata* (L.) Schltldl, también conocida como alache, malva, malva cimarrona, panelita, quesitos, amapolita azul, amapola silvestre, malva abrisca, malvavisco, violeta de monte, o malvilla (Martínez, 1979) es una planta nativa de la región de Mesoamérica que pertenece a la familia *Malvaceae* (Figura 1.5). Es una hierba ruderal que alcanza hasta 1 m de altura, y presenta tallos con vellosidades y hojas triangulares, mientras que sus flores son pequeñas y moradas (BDMTM, 2009). Es común su presencia en cultivos de maíz, frijol, alfalfa, cebada, cártamo, entre otros. Su distribución es generalizada en el centro del país (Villaseñor, 1998).



**Figura 1.5.** *Anoda cristata*, tallo, hojas y flor (modificado de Vibrans 2004).



**Figura 1.6. Sopa de alaches y alaches al vapor.**

Las hojas y tallos tiernos son consumidos como alimento tradicional (Figura 1.6), generalmente preparados en caldo con especias (tequesquite, ajo, cebolla) o cocidos al vapor para acompañar otros alimentos (Rendón, 2001). Aunque en

ocasiones suele usarse como guarnición, la mayoría de las veces es consumido como plato fuerte.

En cuanto a su uso medicinal, está documentado su uso en patologías como dolor e inflamación gastrointestinal, padecimientos respiratorios, dolores musculares, fiebre, entre otros (Rendón, 2001).

Además, se ha demostrado la eficacia de extractos y compuestos puros obtenidos del alache, como agentes antihiperlipemiantes. También se determinó que el extracto acuoso de la planta y dos compuestos aislados a partir de éste (acacetina y diosmetina), tienen un efecto antioxidante sobre radicales de la forma ROO· (Juárez, *et al.*, 2015).

En el laboratorio donde este trabajo fue realizado se demostró con anterioridad que el extracto acuoso de *A. cristata* presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento *in vitro* de *H. pylori*, agente causal de gastritis, úlcera y otros padecimientos gástricos. También, en esa misma línea de trabajo, se probó que el extracto acuoso del alache inhibe la adherencia de *H. pylori* (uno de sus principales factores de colonización del epitelio) a células AGS hasta en un 40%. Además, dos flavonoides que se encuentran en el alache, la diosmetina y la acacetina, fueron sometidos a pruebas contra la actividad de *H. pylori*; los resultados muestran que ambos compuestos tienen un porcentaje de inhibición de adherencia de *H. pylori* a células AGS de alrededor de 85%. Estas pruebas del alache sobre la bacteria *H. pylori* son de suma importancia, pues demuestran el potencial farmacológico de la planta sobre este agente etiológico de enfermedades gastrointestinales, incluida la úlcera, y da pie a seguir investigando sus efectos sobre dichas patologías.

Una revelación importante del trabajo sobre *A. cristata* fue la presencia de un mucílago, que se manifiesta al preparar un extracto acuoso de la planta seca y molida. Los mucílagos, en general, son sustancias compuestas por cadenas largas y ramificadas de carbohidratos que forman parte de la fibra soluble de algunas plantas y vegetales y que, fisicoquímicamente, se clasifican como polímeros altamente hidroxilados, presentando propiedades funcionales como la hidratación,



retención de agua y la formación de un gel, de manera análoga a las gomas (Pareek *et al.*, 2010).

Se ha reportado, además, que los mucílagos de algunas plantas pueden ejercer una acción gastroprotectora. Sharma y colaboradores (2014) describieron el efecto gastroprotector de extractos acuosos, así como del mucílago de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz, encontrando que el efecto gastroprotector *in vivo* de dicho mucílago era patente desde las primeras dosis utilizadas, y que su máximo porcentaje de gastroprotección, se alcanzaba a una dosis de 500 mg/kg (Sharma *et al.*, 2014).

Son estos antecedentes los que motivan en particular la investigación del mucílago de *A. cristata* como un potencial gastroprotector en modelos *in vivo*.

### **1.7. Modelos experimentales de inducción de úlcera.**

Para el estudio de la úlcera péptica es necesario contar con modelos experimentales *in vivo* que permitan hacer comparaciones con la anatomía y fisiología humanas y que faciliten la búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y resolución de esta patología.

Los modelos de experimentación en animales suelen agruparse para su estudio de acuerdo con el tiempo en que producen úlceras (aguda o crónica) y en la distribución de estas (localizada o diseminada). Cada uno de los modelos, permite explorar en particular ciertos mecanismos que estén más asociados al grado de daño y enfocar el estudio en la búsqueda de compuestos, ya sea con efecto gastroprotector o bien, que ayuden a la resolución de la úlcera provocada. Entre los modelos de ulceración más utilizados debido a su reproducibilidad, uniformidad de sus resultados y relativa facilidad metodológica, están aquellos en los que se realizan manipulaciones fisiológicas, farmacológicas y quirúrgicas, empleando diferentes especies animales. Sin embargo, la mayoría de los modelos de ulceración se llevan a cabo en ratas o ratones. Los modelos más empleados son: estrés por inmersión en agua o por hipotermia, ligadura del píloro y administración de

diferentes agentes químicos, como el etanol, ácido acético, y AINEs entre otros (Glavin y Szabo, 1992; Adinortey *et al.*, 2013).

### **1.7.1. Modelo de inducción de úlceras gástricas por etanol.**

La administración oral de etanol ha sido descrita como un método de inducción de daño gástrico. Provoca lesiones en la mucosa gástrica en forma de bandas de tejido necrótico erosionado y ulcerado con presencia de hemorragia y edema de la submucosa. La severidad de las lesiones por etanol está relacionada con la dosis y concentración de la solución administrada (Peskar, *et al.*, 1986).

El etanol absoluto induce cambios histopatológicos severos en la mucosa de estómagos de rata y ratón, que consisten en lesiones agudas erosivas hemorrágicas, acompañadas de congestión vascular, edema y necrosis. Algunos de los factores involucrados en estas lesiones son daño a la integridad celular, lo que conlleva disminución en la secreción de moco, incremento de la generación de radicales libres, disminución de la motilidad gástrica y muerte celular, aunado a una mayor liberación de histamina, disminución en la producción de prostaglandinas y entorpecimiento del flujo sanguíneo. Por otro lado, como un mecanismo que contribuye al daño, se observa un aumento en la infiltración de células inflamatorias (leucocitos) en la mucosa, provocando a su vez mayor daño a la estructura de la mucosa por la liberación de citotoxinas inflamatorias (Loguercio *et al.*, 1993).

Esto tiene su razón de ser en el efecto de vasoconstricción que tiene el etanol sobre la microcirculación de la submucosa gástrica, que provoca una disminución en la irrigación de la mucosa por lo que disminuyen los niveles de proteínas, ácidos nucleicos, sustancias antioxidantes y grupos sulfhidrilos no proteicos, que entre otras funciones se encargan de regular el contenido de radicales libres.

La ventaja de emplear el modelo de ulceración por etanol se debe a que las lesiones inducidas son altamente reproducibles cuando se administra en forma intragástrica un determinado volumen de etanol cuya concentración puede oscilar entre 50-100%. Dependiendo de estos dos factores (volumen y concentración de etanol), en la región glandular de ratas o ratones se producen lesiones de tipo

hemorrágicas que pueden ser solo erosiones o ulceraciones, las cuales son visibles entre 1 y 2 horas posteriores a la administración del etanol absoluto. Sin embargo, reportes en la literatura han mostrado que el daño puede comenzar a observarse incluso entre 1 y 3 min posteriores a la administración del etanol. Otra importante ventaja de emplear este modelo es que las úlceras que se producen son muy semejantes a la úlcera péptica aguda en el humano (Masuda *et al.*, 1995).

### **1.8. Anatomía e histología del estómago de ratón**

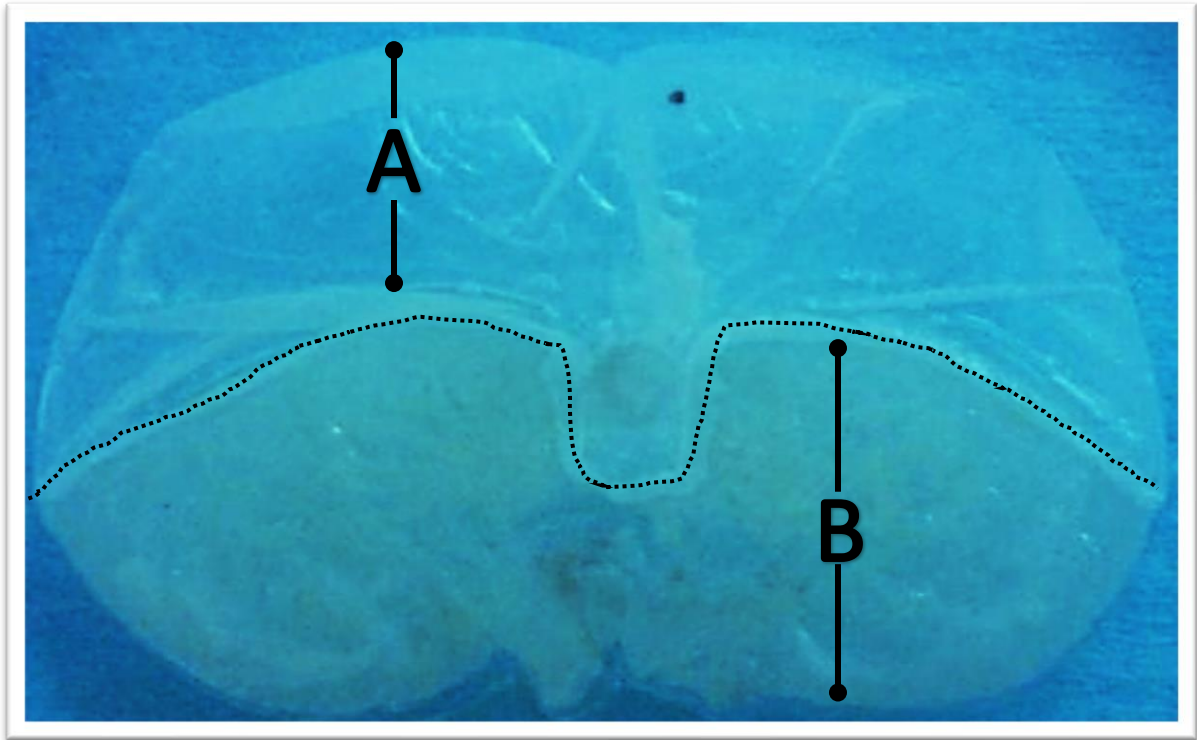
Algunos mamíferos como ratas, ratones, hámsteres, conejos y gerbos han sido ampliamente utilizados en diferentes ensayos de tipo inmunológico, reproductivos, metabólicos y ambientales entre otros. Cada especie en el contexto de un ensayo en particular ha permitido desarrollar modelos que han ayudado a generar el conocimiento de la fisiopatología de diversas enfermedades.

Al igual que en el humano, el estómago es la porción dilatada del tracto digestivo, que es continuación del esófago y a su vez, este se continua con el intestino delgado. El estómago se divide en dos regiones visiblemente diferentes a nivel macro y microscópico (Figura 1.7): a la parte izquierda, también se le conoce como “forestomach”, estómago no glandular, en tanto que, a la región derecha, se le conoce como estómago glandular. A simple vista, el estómago no glandular tiene la apariencia de una membrana delgada, grisácea y ligeramente transparente. En cambio, el estómago glandular tiene una consistencia más gruesa y una coloración blanquecina.

Los daños generados por la administración del etanol se evalúan en el estómago glandular, cuyo epitelio es de tipo columnar simple. También cuenta con una lámina propia, la cual está ocupada por glándulas tubulares simples. Estas glándulas, a su vez están conformadas por diferentes tipos celulares que permiten identificar tres zonas: 1) El tercio bajo de la glándula está ocupada por una población de células basófilas que corresponden a las células principales; 2) En el tercio alto de la glándula se encuentran predominantemente las células parietales

(productoras de HCl). Algunas de estas mismas células pueden estar mezcladas con las células principales en el tercio bajo. Al igual que en el humano, la mucosa cuenta con una delgada capa muscular de la mucosa, constituida por células de músculo liso. La submucosa está conformada por tejido conectivo laxo y algunos vasos sanguíneos. La capa muscular también está conformada por células de músculo liso que se disponen en forma espiral y oblicua. En esta capa, existen células ganglionares responsables del control motor del estómago. Finalmente, cuenta con una túnica serosa delgada. El límite entre el estómago glandular y el no glandular, está definido por una región que se denomina *margo plicatus*.

En cuanto al estómago no glandular, cuenta básicamente con las mismas capas que el estómago glandular (muscular de la mucosa, submucosa y capa muscular) sin embargo, las principales diferencias radican en el epitelio que está hacia el lado luminal, el cual es de tipo plano estratificado queratinizado y que el espesor de las otras capas es menor comparado con el estómago glandular (Ghoshal y Bal, 1989).



**Figura 1.7. Vista macroscópica de un estómago de ratón abierto por la curva mayor.** Se aprecian las dos partes del estómago, A) glandular y B) no glandular, separadas por el *margo plicatus* (señalado con la línea punteada).

## 2. Justificación del trabajo

A pesar de que en la actualidad existen tratamientos dirigidos al manejo de las úlceras, estos siguen principalmente enfocados en reducir la secreción ácida mediante el uso de inhibidores de los receptores H<sub>2</sub> (ranitidina) o de la bomba de protones (omeprazol). Desafortunadamente, son frecuentes los efectos adversos producto del uso prolongado de este tipo de fármacos (osteoporosis, hipergastrinemia e hiperplasia de algunas poblaciones celulares gástricas). Aunado a esto, el uso de antiseoretos como terapia única para el manejo de las úlceras se asocia a un elevado número de casos recurrentes de ulceración.

Como parte del proyecto (CONACyT 214286) “Rescate de especies subvaloradas tradicionales de la dieta mexicana y su contribución para el mejoramiento de la nutrición en México”, en el laboratorio donde se desarrolló el presente trabajo de tesis, se determinó, *in vitro*, el potencial anti-*Helicobacter pylori* del alache, así como su efecto sobre dos de sus factores de colonización (adherencia de la bacteria a células de adenocarcinoma gástrico y sobre la actividad de la enzima ureasa). El mucílago obtenido del alache no presentó efecto inhibitorio del crecimiento de *H. pylori* y ni sobre la ureasa; sin embargo, si tuvo un efecto significativo de inhibición de la adherencia con respecto a los controles positivos. Con estos experimentos, se buscó incidir sobre uno de los principales factores asociados al desarrollo de las úlceras gástricas.

Tomando en cuenta que el desequilibrio entre los factores que protegen y los que dañan a la mucosa gástrica constituyen importantes elementos causales asociados a la generación de las lesiones ulcerosas, con el presente trabajo, se buscó investigar el potencial que podría tener el mucílago del alache evitando o disminuyendo la inducción de úlceras en los estómagos de ratones tratados con etanol absoluto. Con los resultados del presente trabajo, podía verificarse si el mucílago posee un efecto gastroprotector, es decir, que ayude a evitar el daño antes de que la mucosa se exponga a un agente dañino como el etanol.

### 3. Hipótesis

Si el mucílago de *Anoda cristata* tiene un efecto gastroprotector al ser administrado intragastricamente, entonces se observará una menor ulceración gástrica después de la administración de etanol absoluto en un modelo murino.

### 4. Objetivos

#### 4.1. Objetivo general.

Determinar el efecto gastroprotector del mucílago de *Anoda cristata* en un modelo de ulceración gástrica aguda inducida por la administración de etanol en ratones CD-1.

#### 4.2. Objetivos particulares.

- Obtener la fracción mucilaginosa de *A. cristata* a partir de un extracto acuoso de la planta.
- Evaluar macroscópicamente y cuantificar el área total (en mm<sup>2</sup>) de ulceración gástrica inducida por la administración oral de etanol a ratones macho CD-1 a fin de conocer el efecto de dicho injuriante y poder comparar los valores obtenidos con el efecto gastroprotector producido por la administración del mucílago de *A. cristata*
- Evaluar el efecto del pretratamiento con 5 diferentes dosis de mucílago mediante la cuantificación del área total de ulceración gástrica.
- Calcular el índice de ulceración y el porcentaje de gastroprotección en presencia y ausencia del mucílago y comparar dichos valores.

- Evaluar a nivel histológico en cortes de estómagos representativos de cada dosis, el efecto producido por los pretratamientos con el mucílago de *A. cristata*.
- Realizar el análisis estadístico a fin de encontrar si existe diferencia significativa entre el grupo control y los grupos de tratamiento con mucílago de *A. cristata*.



## 5. Metodología

### 5.1. Obtención del material vegetal.

La planta *Anoda cristata*, de crecimiento espontáneo, fue colectada en la población de Nepantla de Sor Juana Inés de la Cruz, Estado de México, por parte de campesinos locales. Como parte del proyecto CONACyT 214286, coordinado por la Dra. Amanda Gálvez de la Facultad de Química de la UNAM, una muestra de *A. cristata* (alache) fue adquirida en junio de 2015 en el mercado municipal de Ozumba de Alzate, Estado de México.

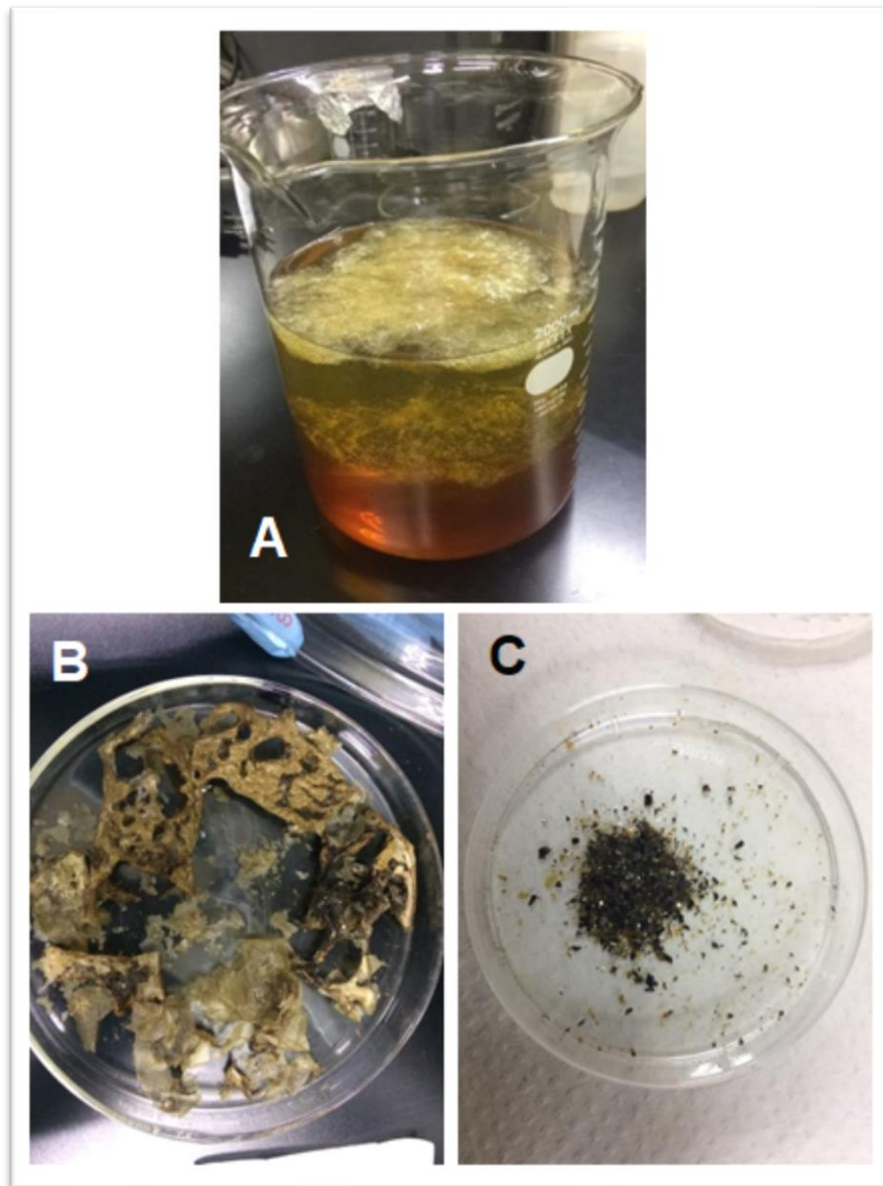
Fue botánicamente identificada y catalogada por el grupo de trabajo del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México a cargo de la Mtra. Edelmira Linares y el Dr. Robert Bye. Un ejemplar fue depositado en el Herbario Nacional con número de MEXU 1 445 645

La muestra de *A. cristata* fue deshojada, y las hojas fueron deshidratadas a temperatura ambiente durante 5 días. Posteriormente las hojas secas fueron pulverizadas y almacenadas en recipientes de plástico, en un lugar seco a temperatura ambiente y aisladas de la luz (natural y artificial).

### 5.2. Obtención del mucílago.

En primer lugar, se obtuvo un extracto acuoso de la planta (AQ). Se realizó mediante la infusión de 30.04 g de hojas de *Anoda cristata* seca y molida colocados en 1.5 L de agua destilada a temperatura de ebullición (97° C). Esta preparación se dejó reposar por 25 minutos a temperatura constante y agitación eventual. Después de filtrar esta infusión con papel filtro de tipo cualitativo grado 1 (11 µm de poro) al extracto acuoso se le agregó etanol 96% en una proporción 1.5:1, v:v (EtOH:AQ) y se dejó precipitar a temperatura de 4 °C durante 18 horas. Una vez precipitado el mucílago, se separó por centrifugación a 4300 x g por 15 minutos utilizando un equipo Thermo Scientific™ Sorvall™ LYNX 4000. El extracto AQ combinado con etanol fue retirado por decantación y el mucílago se secó en un Deshidratador TSM a una temperatura de 60° C durante 2:30 h (Figura 5.1). Al mucílago una vez seco

y pulverizado, se le determinó su rendimiento en relación con la cantidad de planta utilizada .



**Figura 5.1. Mucílago de alache.** A) precipitación con etanol a partir del extracto acuoso, B) mucílago deshidratado, C) mucílago pulverizado.

### **5.3. Preparación de los animales de experimentación.**

Se utilizaron ratones macho proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM, cepa CD-1 de 40 a 45 g de peso, de 6 a 7 semanas de edad

aproximadamente. A fin de acostumbrar a los animales a las condiciones ambientales del laboratorio y así reducir el estrés, se mantuvieron sin intervención durante tres días con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad, temperatura de  $22 \pm 2$  °C y con libre acceso a comida y agua. Dicho confinamiento se realizó en jaulas transparentes de polipropileno con buenas condiciones de ventilación y dimensiones adecuadas para el movimiento normal y pertinente a las necesidades biológicas de la especie, de conformidad con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999; y siguiendo las consideraciones éticas para el caso de utilización de animales de experimentación en los proyectos de investigación, establecidos por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM.

#### **5.4. Evaluación de la actividad gastroprotectora del mucílago *in vivo*.**

##### **5.4.1. Administración de los tratamientos e inducción de la ulceración gástrica.**

Los ratones se distribuyeron en 7 grupos (n= 5-6 por grupo) de acuerdo con el tratamiento que recibieron:

Grupo control negativo: Solución salina isotónica (SSI) (0.9% NaCl), en dosis 7 mL/kg de peso corporal (PC).

Grupo control positivo: Carbenoxolona (CAR) disuelto en el vehículo SSI (50 mg/kg PC).

Grupos de tratamiento: Mucílago del alache (100, 200, 300, 400 y 500 mg/kg PC) suspendido en SSI.

Doce horas antes del ensayo, a los individuos se les colocó por grupos en una jaula de plástico en la que se adecuó una malla para evitar la coprofagia y fueron privados de alimento, permitiéndose el acceso de agua *ad libitum* con el propósito de vaciar por completo la cavidad gástrica.

Tras el ayuno, la administración de los tratamientos se realizó por vía oral, mediante una cánula intragástrica montada en una jeringa graduada, en volúmenes

de 200 µL a fin de no saturar la cavidad gástrica del individuo. Transcurrida 1 h de la administración del tratamiento correspondiente se procedió a administrar, por la misma vía, etanol absoluto en una dosis de 7 mL/kg PC, a fin de inducir la úlcera.

Tras 1.5 h de la administración del etanol, los individuos fueron sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub> y se procedió a extirpar los estómagos

5.4.2 Extirpación de los estómagos y análisis macroscópico del área total de ulceración.

Inmediatamente después del sacrificio de los ratones, los estómagos se insuflaron con 3 - 4 mL de formalina al 10% amortiguada en buffer salino de fosfatos, mediante la misma vía intragástrica. Posteriormente, los ratones se colocaron en decúbito supino sobre una plancha de unicel y se realizó una incisión de aproximadamente 3 cm sobre la línea media ventral, iniciando desde el cartílago xifoides. Con ayuda de separadores, se expuso la cavidad gástrica y se realizaron dos ligaduras: una a nivel del cardias (entre esófago y estómago), y la otra en la región pilórica (entre estómago y duodeno). Una vez ligado el estómago por ambos extremos, se extirpó y se colocó en la misma solución de formalina al 10% amortiguada, durante 2 horas.

Transcurrido el tiempo de fijación del tejido, a cada estómago se le realizó una incisión a todo lo largo de la curvatura mayor con el objetivo de exponer por completo la cavidad intragástrica, después se les prensó entre dos placas de vidrio de aproximadamente 4x5 cm. Abiertos y montados en los cristales, los estómagos fueron escaneados y se realizó el análisis macroscópico midiendo el área total de ulceración gástrica con la ayuda del programa ImageJ®, desarrollado en el National Institutes of Health, USA y de libre acceso.

Los resultados se presentan como Índice de Ulceración (IU) de acuerdo con la siguiente ecuación:

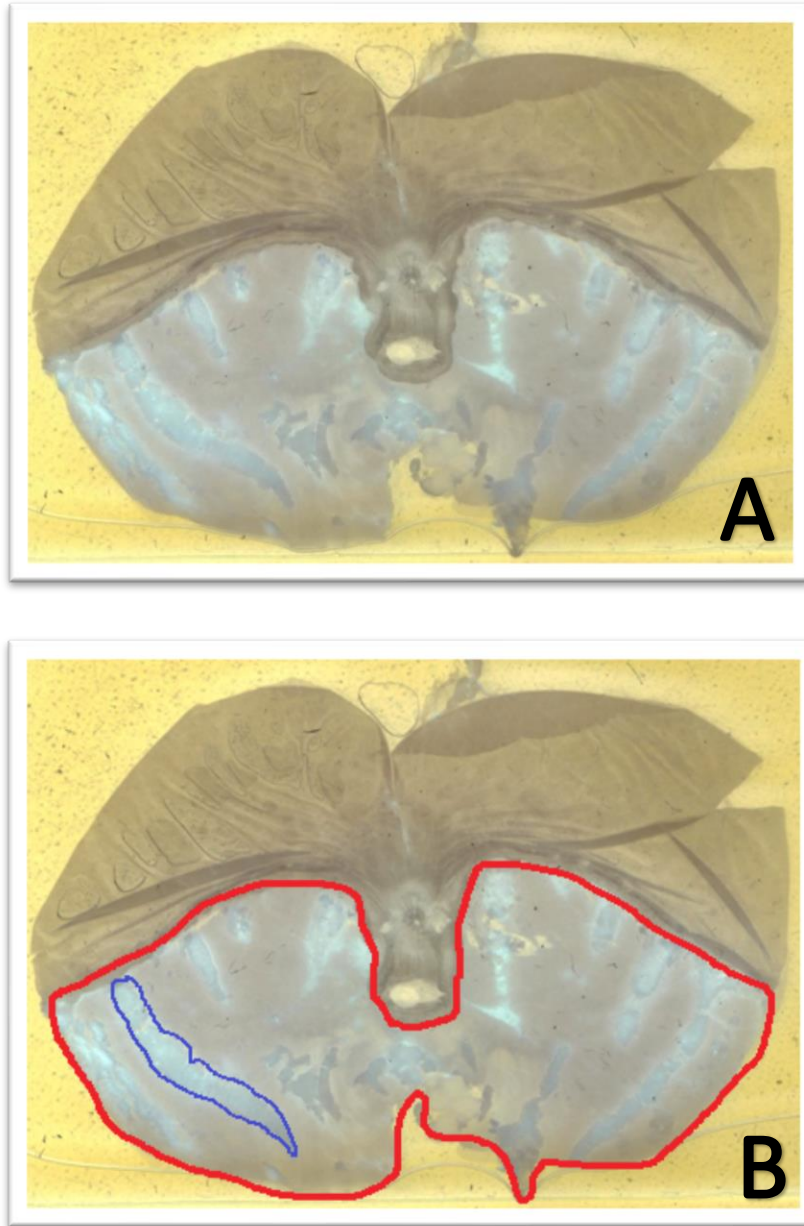
$$\text{Índice de ulceración} = \frac{\text{Área de ulceración}}{\text{Área estomacal total}}$$

Donde el Área de ulceración se define como la suma de aquellas partes del estómago (en el área glandular) que han sufrido daño de la mucosa gástrica (heridas típicas de ulceración) y el Área estomacal total se refiere a la superficie completa del estómago en su parte glandular (Fig. 5.2). Se calculó el IU de cada animal y posteriormente el promedio del grupo-dosis.

Los estómagos ya montados en sus respectivos cristales se conservaron en la misma solución de formalina amortiguada hasta su procesamiento para el análisis histopatológico.

Además, se determinó el porcentaje de gastroprotección de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ gastroprotección} = \left( \frac{\text{IU promedio del grupo control} - \text{IU promedio de dosis}}{\text{IU promedio del grupo control}} \right) (100)$$



**Figura 5.2. Imágenes obtenidas utilizando el comando negativo del programa ImageJ de un estómago representativo de ratón utilizadas en este trabajo para la obtención de datos.** A) Estómago ulcerado de un ratón tratado con SSI, abierto por la curvatura mayor y prensado entre placas de vidrio. Se observan en tono nacarado la zona de ulceración provocadas por la administración de etanol. B) Esta imagen es un duplicado de A, sin embargo, se destaca la llamada "Área total" marcada de color rojo, que corresponde al área glandular del estómago, en color azul se delimita una zona típica de daño gástrico por etanol. El Área de Ulceración es la de suma de todas las áreas de daño gástrico.

### **5.5. Análisis histológico.**

A partir de la evaluación macroscópica cualitativa y cuantitativa del daño al órgano de estudio (estómago), se realizó un análisis microscópico las zonas de ulceración de estómagos de cada tratamiento. El procesamiento histológico de los estómagos fue realizado en el Laboratorio de Histología del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM, donde se realizó el tren de deshidratación, los procesos de infiltración e inclusión en parafina. Se realizaron cortes sagitales en micrótopo, con un espesor de 5  $\mu\text{m}$  y posteriormente los tejidos fueron teñidos con hematoxilina y eosina (HyE) y ácido peryódico de Shiff (PAS por sus siglas en inglés).

El análisis de los cortes fue realizado por microscopia de luz, mientras que las variables histopatológicas analizadas fueron: integridad hística, infiltrado eritrocitario, infiltrado inflamatorio, edema submucoso además de la evaluación de la intensidad de la tinción PAS, lo que indica la presencia de moco neutro.

### **5.6. Análisis estadístico.**

El ensayo completo, fue realizado por triplicado. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Las diferencias estadísticas entre los índices de úlcera de los grupos tratados y control se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. El nivel de significancia estadística se fijó en un valor de  $p < 0.05$ .

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Rendimiento del mucílago de alache.

Los mucílagos en general son polisacáridos que forman parte de la fibra soluble presente en algunas plantas. Al ponerse en contacto con etanol o algún otro disolvente orgánico, precipita formando una suspensión gelatinosa. Para los ensayos de este trabajo, dicha estructura fue separada del extracto acuoso mediante precipitación con etanol y centrifugación, tal como se describió en la sección 5.2.

El método general que se siguió para la obtención del mucílago fue el reportado por Juárez y colaboradores (2015) con modificaciones, las más significativas fueron a) el cambio de agente precipitante, mientras que lo reportado refiere el uso de etanol absoluto en una proporción de 1:1 v:v (concentración final del etanol 50% v/v) en el presente trabajo se prefirió utilizar etanol 96% (que reduce el costo de obtención en miras a un proceso sistematizado y/o industrial) en una proporción 1.5:1 (concentración final del etanol 60% v/v) y b) el tiempo de precipitación, pues mientras el trabajo de referencia utilizó un tiempo de 12 h, en el presente trabajo dicho tiempo se alargó hasta 18 h. A partir de la infusión de 30.04 g de planta seca y molida (hojas), se obtuvo un total de 2.30 g de mucílago seco, lo que representa un rendimiento del 7.65%. En el trabajo reportado por Martínez (2016) perteneciente a esta misma línea de investigación y que siguió los mismos lineamientos que Juárez y colaboradores, el rendimiento obtenido fue de 6.06%. En el presente trabajo, se reporta un rendimiento de 1.59% mayor, comparado con el proyecto previo.

Es importante mencionar además que, en el presente trabajo, se utilizó alcohol etílico 96° para el proceso de precipitación, sustituyendo el uso de etanol absoluto, lo que reduce los costos de obtención del mucílago de *A. cristata*.

En la literatura existen diversos métodos reportados para la extracción del mucílago presente en diversas especies de plantas. Entre las principales técnicas, están las que se han empleado principalmente en las especies que pertenecen a la



familia de las cactáceas, como es el caso de *Opuntia spp.* (Monrroy *et al.*, 2017). Sin embargo, el rendimiento obtenido, puede variar en función tanto del método utilizado, como del propio contenido de mucílago que posee cada planta.

Este aspecto es de gran relevancia, ya que, en la medida en que dicha metodología pueda ser mejorada como parte de algún proceso industrial, la eficiencia en la obtención del mucílago será mayor, tomando en consideración que este tipo de hidrocoloides cada vez cobran más importancia en la industria química, de alimentos y cosmética.

## **6.2. Actividad gastroprotectora del mucílago de *A. cristata* en el modelo murino de ulceración gástrica con etanol absoluto.**

Para poder evaluar el potencial efecto gastroprotector del mucílago obtenido a partir de *A. cristata*, los estómagos de los ratones control y tratados con las diferentes concentraciones de mucílago, se digitalizaron mediante escaneo y se empleó el software ImageJ® para la valoración macroscópica y medición de las úlceras provocadas por la administración de etanol absoluto.

Por otra parte, se identificaron las zonas de ulceración y algunas de ellas, se sometieron a procesamiento histológico con el objetivo de poder realizar un análisis microscópico de las lesiones ulcerosas.

### **6.2.1. Análisis macroscópico**

#### **Estómago Normal**

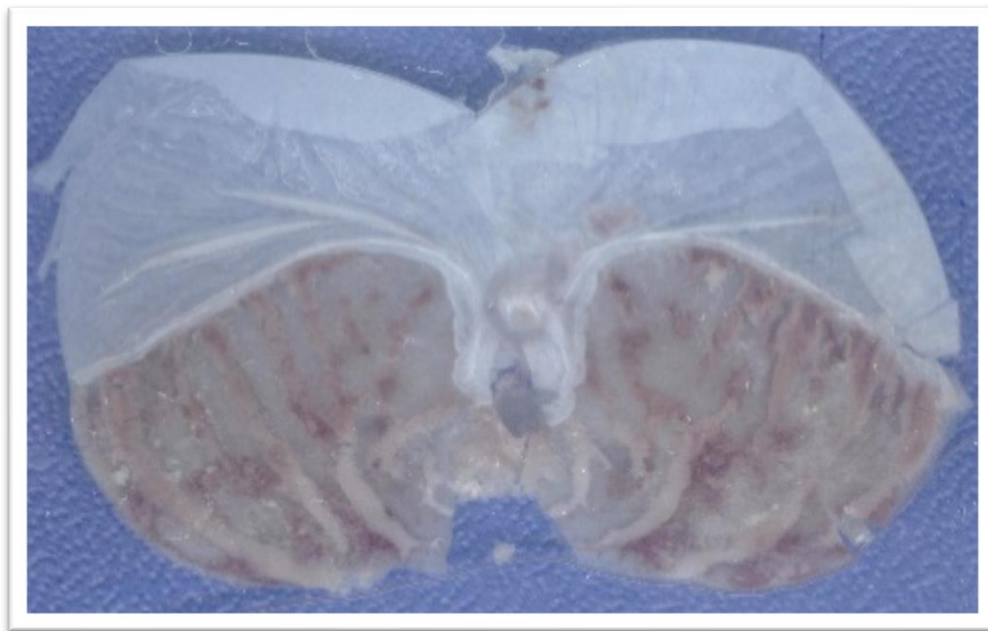
En la Figura 6.1, se puede observar la imagen de un estómago representativo de un ratón que no recibió ningún tipo de tratamiento, esto con el objetivo de visualizar la anatomía y aspecto macroscópico normal de este órgano. En dicho estómago se pueden distinguir claramente dos regiones anatómicas: 1) el estómago no glandular o “forestomach”, el cual tiene el aspecto de una tela transparente; y 2) el estómago glandular, el cual tiene la apariencia de un tejido más grueso de color blanquecino. Ambas regiones son histológicamente muy diferentes, de acuerdo con lo que se describió en la sección 1.9. La región glandular es la parte donde se desarrollan las úlceras, no solamente en este modelo, sino también en otros donde se emplean diferentes agentes injuriantes como el ácido acético o la indometacina, entre otros. De manera general, se puede apreciar que el estómago glandular presenta una superficie lisa, sin lesiones visibles ni hemorragias.



**Figura 6.1. Estómago normal de ratón, sin ningún tipo de tratamiento.**

### **Controles negativo y positivo de ulceración.**

En la Figura 6.2, se presenta la imagen de un estómago que corresponde a un ratón del grupo control negativo, el cual únicamente recibió el vehículo (SSI) 1 hora antes de la inducción de la úlcera con etanol. En este estómago, se pueden distinguir marcadas bandas hemorrágicas a lo largo de la región glandular, daño que en el modelo utilizado se considera como ulceración. Además de estas estrías hemorrágicas, también se identifican algunas zonas necróticas, las cuales son producto del efecto tóxico directo del etanol, ya que genera una depleción en la producción de moco gástrico y secreción de  $\text{HCO}_3^-$  (Adinortey *et al.*, 2013). Así mismo, durante el procesamiento de los estómagos para su fijación y montaje en los cristales se pueden encontrar regiones de exfoliación del epitelio gástrico que, en la mayor parte de las veces, se corresponden con las zonas necróticas donde hay mayor muerte celular.



**Figura 6.2. Estómago representativo de un control negativo, tratado únicamente con SSI.**

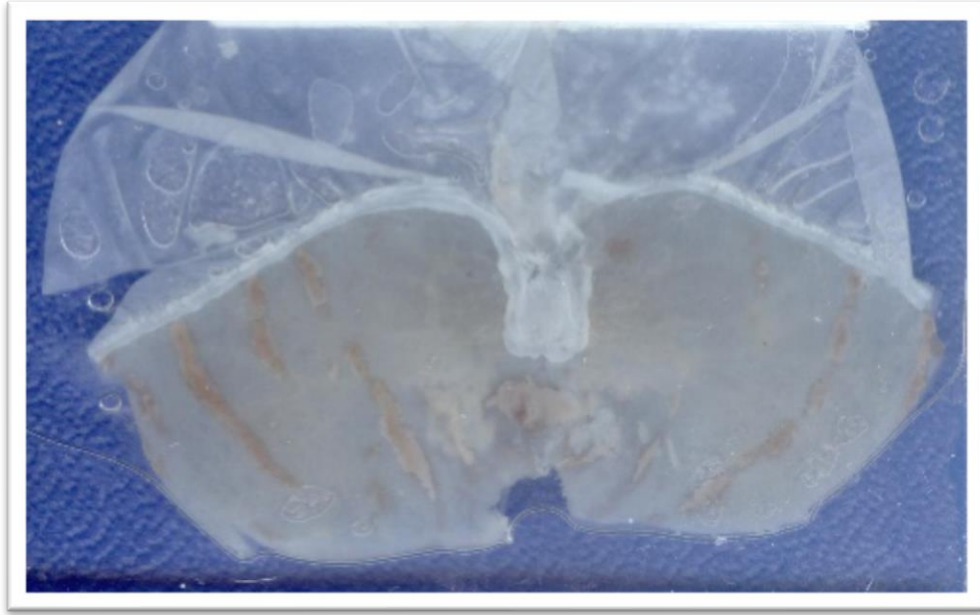
Para la evaluación del efecto gastroprotector del mucílago, se empleó como control positivo a la carbenoxolona (CAR 50 mg/kg PC), un fármaco que, desde

hace mucho tiempo ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de la úlcera péptica (Pinder *et al.*, 1976).

En la Figura 6.3, se observa la imagen de un estómago representativo del grupo de ratones tratados con la carbenoxolona antes de la administración del etanol. Macroscópicamente es posible constatar que, aun cuando sigue existiendo cierto grado de exfoliación del epitelio gástrico, existe una menor cantidad de bandas hemorrágicas y por lo tanto el área de ulceración es notablemente menor en comparación con el control negativo (SSI).

Tanto en diferentes trabajos encontrados en la literatura, como en algunos previos de nuestro grupo (Escobedo *et al.*, 2018), se ha reportado que la carbenoxolona proporciona alrededor de un 80% de gastroprotección con dosis que oscilan entre los 50 a 200 mg/kg PC. Se sabe que este efecto se debe a que este fármaco estimula la secreción de prostaglandinas y por ende la producción de moco. También se sabe que aumenta la vida media de las células epiteliales gástricas, disminuyendo el desprendimiento de estas. Probablemente, este último efecto se deba al mecanismo general que induce un incremento en la secreción de moco, el cual, a su vez, funge como una importante barrera física que protege al epitelio (Pinder *et al.*, 1976).

La selección de la carbenoxolona como control positivo se basa en el hecho de que no tiene efectos en la motilidad gastrointestinal o en la secreción de ácido y, por ende, su mecanismo gastroprotector depende de otros factores que defienden a la mucosa gástrica (citoprotección). En este sentido, el control positivo (CAR), se adecua al método seleccionado para la inducción de las úlceras (administración de etanol), ya que se sabe que este tipo de modelo es apropiado para evaluar la eficacia de compuestos aislados o incluso de extractos que potencialmente tienen actividad citoprotectora; sin embargo, dicho modelo no es útil cuando se trata de determinar efectos antisecretores, ya que por sí mismo, en el daño provocado por el etanol, no subyacen alteraciones en la producción y secreción del HCl.



**Figura 6.3. Estómago representativo de un control positivo, tratado con el fármaco carbenoxolona (50 mg/kg PC).**

### **Tratamientos con diferentes dosis de mucílago**

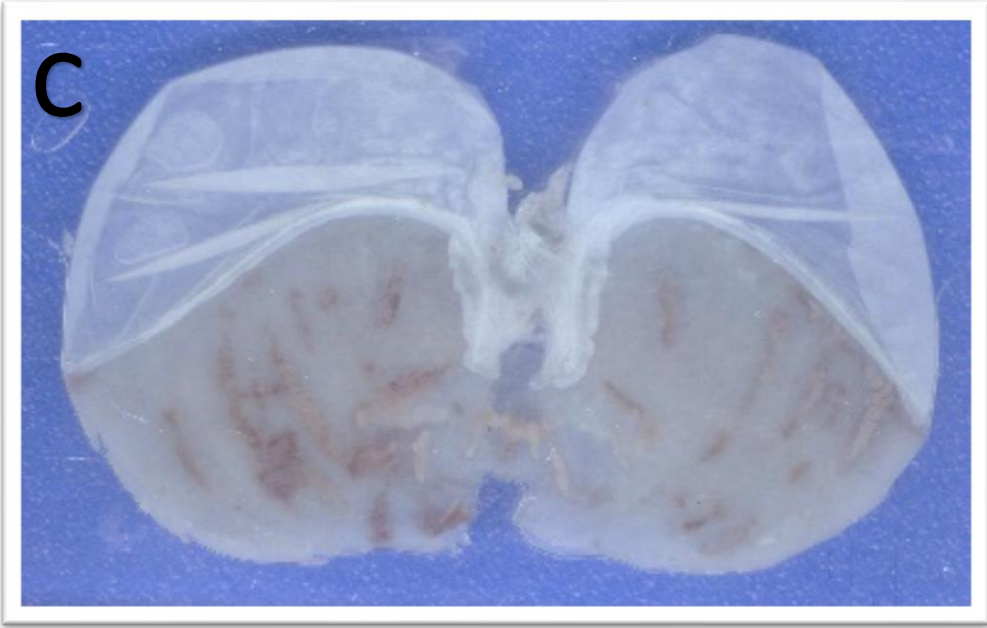
Con el objeto de evaluar si el mucílago obtenido del alache podría tener un efecto gastroprotector, los ratones se separaron en 5 grupos en función de la dosis de mucílago (100, 200, 300, 400 Y 500 mg/kg PC) que les sería administrada.

En la figura 6.4, se observan las imágenes más representativas de cada dosis administrada. En primera instancia, se denota que la apariencia ulcerada de los estómagos de los ratones que recibieron mucílago es menor comparado en el control de SSI. Aun con la dosis más baja, 100 mg/kg PC, de manera cualitativa, es posible apreciar que el número y extensión de lesiones ulcerosas es menor comparado con el control negativo (Fig. 6-4 A). Con esta dosis se percibe un efecto gastroprotector ya que, se exhiben bandas hemorrágicas bien definidas, por lo que la hemorragia y el daño producidos se presentan más localizados, a diferencia del grupo control negativo, donde la hemorragia es más dispersa.

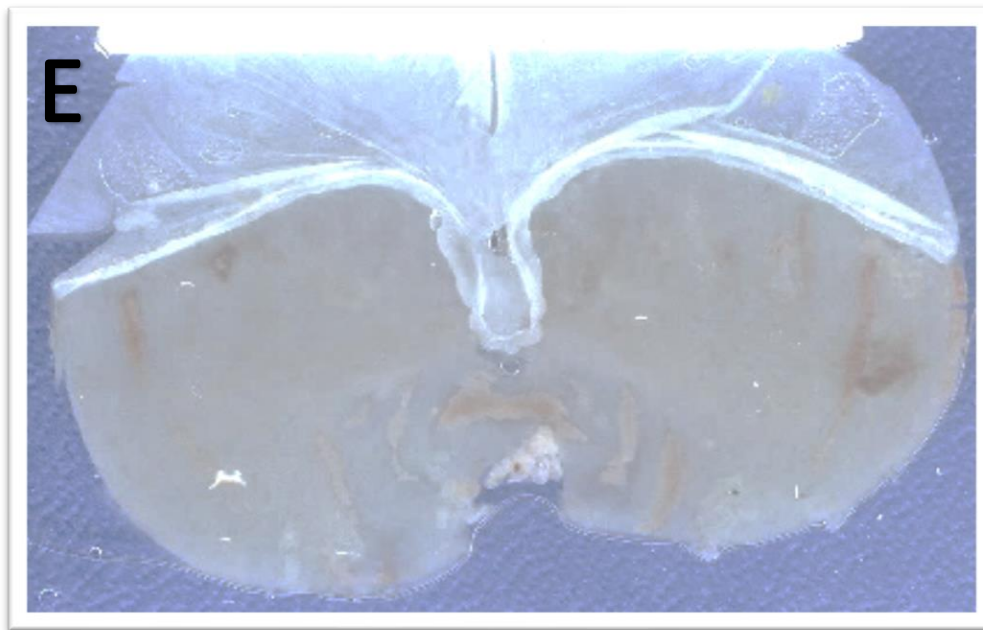
También se puede observar que el efecto gastroprotector mediado por la administración del mucílago parece ser dosis-dependiente, ya que en las imágenes

es posible ver que existe una disminución en la cantidad de lesiones ulcerosas y en la severidad del daño provocado por el etanol en el área glandular gástrica, a medida que aumenta la dosis del mucílago (Fig.6.4 B, C y D). El grupo administrado con la dosis más alta (500 mg/kg PC), presenta una considerable disminución del área de ulceración, las bandas hemorrágicas se muestran notablemente más pequeñas y no corren a todo lo largo del área glandular del estómago, si no que, de manera general, la integridad del tejido se conserva mejor (Fig. 6.4 E). Así mismo, con esta dosis de mucílago el efecto gastroprotector parece ser semejante al grupo tratado con CAR.







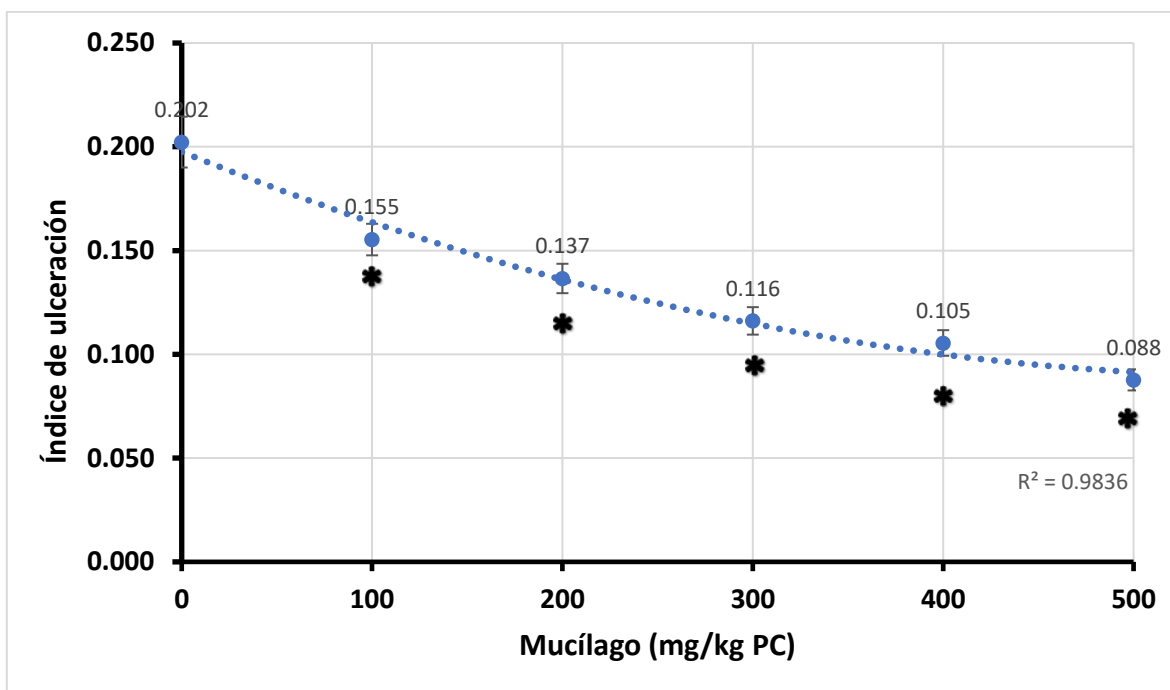


**Figura 6.4. Imágenes representativas de estómagos sometidos a la inducción de úlcera tratados con distintas dosis de mucílago de *A. cristata*. 100, 200, 300, 400 y 500 mg/kg PC (A, B, C, D y E respectivamente).**

La evaluación macroscópica de los estómagos también implicó un análisis cuantitativo, el cual consistió en la medición del área total ( $\text{mm}^2$ ) que abarcaron las lesiones ulcerosas. Con el objeto de hacer una adecuada comparación, se obtuvo el Índice de Ulceración como se describió en la sección 5.4.2.

En la siguiente gráfica (Figura 6.5) se observa, el índice de ulceración en el eje de las ordenadas y en el eje de las abscisas, la dosis única de mucílago suministrada (mg/kg PC), previa a la administración del etanol. Los resultados de este análisis cuantitativo se corresponden con la evaluación cualitativa macroscópica previamente descrita, es decir, se observa una correlación inversamente proporcional entre las variables, dosis de mucílago e Índice de Ulceración. Se demuestra que la administración de las diferentes dosis del mucílago de *A. cristata* fue efectiva para disminuir la cantidad y extensión de las lesiones gástricas provocadas por el etanol absoluto y que dicho efecto se percibe, incluso, desde la dosis más baja. El análisis estadístico mostró que existe una diferencia significativa al comparar el IU del control negativo (valor de ulceración máxima con

la administración de SSI) con cada uno de los valores correspondientes a las dosis administradas de mucílago.



**Figura 6.5. Efecto de la concentración del mucílago sobre el Índice de Ulceración.** Cada punto representa el promedio de 3 experimentos ( $n=6$ )  $\pm$  EEM. Se realizó un análisis tipo ANOVA  $p < 0.05$ , \* indica que existe diferencia significativa entre el control negativo y las diferentes dosis administradas.

El IU obtenido con el fármaco de referencia (carbenoxolona 50 mg/kg PC) fue de  $0.085 \pm 0.003$ , valor que no mostró tener diferencia estadísticamente significativa al ser comparado con el IU obtenido con la dosis de 500 mg/kg PC de mucílago ( $0.088 \pm 0.001$ ). Este resultado muestra que el efecto de protección del epitelio gástrico es similar. Sin embargo, es importante hacer notar que, por una parte, la carbenoxolona es un compuesto puro y el mucílago de *A. cristata* no, sin embargo por otro lado, a pesar de que la carbenoxolona se ha utilizado en el tratamiento de la úlcera péptica, en la actualidad, no forma parte de los esquemas de tratamiento de primera elección y su empleo a nivel clínico se encuentra en desuso, aunque se sigue utilizando ampliamente como referencia en los diferentes modelos de ulceración debido a conocido efecto gastroprotector.

Una vez obtenidos los datos del IU, estos se utilizaron para calcular el porcentaje de gastroprotección alcanzado en presencia tanto de las diferentes dosis de mucílago como de la carbenoxolona (Tabla 1).

**Tabla 1. Efecto gastroprotector del mucílago de *A. cristata*.**

Dosis (mg/kg)	IU	% gastroprotección
0	0.202	0.00
100	0.155	23.26
200	0.137	32.17
300	0.116	42.57
400	0.105	48.01
500	0.088	56.43
CAR (50 mg/kg)	0.085	57.92

El realizar la determinación de estos valores permite analizar de manera concreta y simple el efecto gastroprotector del mucílago de *Anoda cristata* en el modelo de úlcera gástrica inducida por etanol en ratones. El valor máximo de gastroprotección obtenido con la dosis más alta ensayada (500 mg/kg) fue de 56.43%, valor muy aproximado al obtenido con el de la carbenoxolona. Sin embargo, hay que hacer notar que el mucílago muestra un importante efecto gastroprotector (23.26%) desde la dosis más baja administrada (100 mg/kg).

El porcentaje de gastroprotección mostrado por el mucílago del *A. cristata*, es comparable con el efecto gastroprotector obtenido con mucílagos de otras especies. A manera de ejemplo, Sharma y colaboradores (2014) reportaron un porcentaje de gastroprotección del 69.65% con 500 mg/kg con el mucílago de *Bryophyllum pinnatum*, una planta de uso medicinal en India y África.

El efecto anti-úlceras demostrado por el mucílago puede ser explicado gracias a la naturaleza química del mucílago empleado. Como se mencionó antes, los mucílagos, de manera general, son polisacáridos con un peso molecular del orden

de  $2.3 \times 10^5$  a  $4.3 \times 10^6$  Da y cuya estructura química, aunque no descrita en su totalidad, arroja luz sobre ciertos aspectos funcionales de estas moléculas altamente ramificadas con grupos hidroxilo disponibles para interactuar con otras sustancias de tipo hidrofílicas; sirva de ejemplo el caso del mucílago de nopal que ha sido caracterizado y que contiene D-galactosa, L-arabinosa, D-xilosa, y L-ramnosa como principales unidades de azúcares neutros, así como ácido D-galacturónico. El mucílago presenta una cadena principal lineal con repeticiones de  $\beta(1-4)$  D-ácido galacturónico y  $\alpha(1-2)$  L-ramnosa ligado con cadenas laterales de oligosacáridos  $\beta(1-6)$  D-galactosa unidos a L-ramnosa y residuos (Espino *et al.*, 2010).

Al contar con tantos residuos de azúcares en la periferia de la estructura molecular del mucílago, se crea un efecto de retención de agua, lo que le confiere una textura característica adhesiva, de alta viscosidad y elevada humedad, y que dichas características fisicoquímicas podrían ser la base de su efecto gastroprotector pues se sugiere la formación de uniones tipo puente de hidrógeno entre las estructuras periféricas del mucílago y las mucinas producidas por las células epiteliales del estómago, así como con la superficie del epitelio, teniendo un efecto de recubrimiento y protección de dichos tejidos, haciendo un símil al moco de producción endógena de éstas células. Precisamente, si la primera línea de defensa de la mucosa gástrica es la capa estable formada por el moco y el bicarbonato, no se puede descartar que el mucílago pudiera tener un efecto local similar.

Cabe mencionar que, en los experimentos de este trabajo, la vía de administración (intragástrica) del mucílago, podría ser un factor importante en el efecto anti-úlceras. Suministrar el mucílago de esta manera, asegura su integridad hasta alcanzar el lumen gástrico, haciendo que el efecto adherente y protector arriba propuesto, pueda depender únicamente de la dosis administrada, pues el mucílago disuelto entra en contacto rápidamente con la mucosa gástrica, recubriéndola frente a la acción irritante del etanol (Sharma *et al.*, 2014).

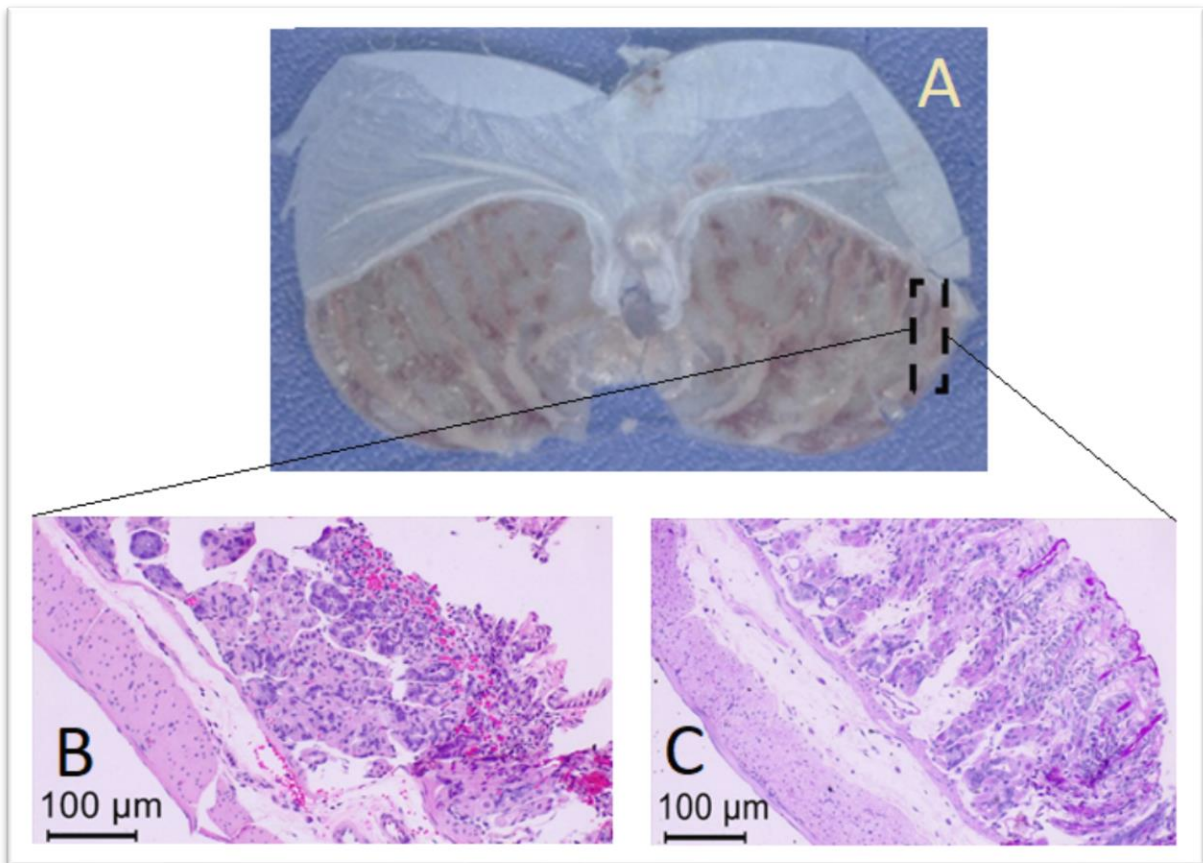
Sin embargo, no es posible descartar, además, que el mucílago en sí posea un efecto sistémico de gastroprotección, es decir que la presencia del mucílago o alguno de sus componentes promueva la secreción de PG, actuando como un análogo de la carbenoxolona o algún otro compuesto similar.

Existen muchos ejemplos en la literatura del potencial efecto gastroprotector de numerosas especies vegetales, ya sea de extractos de diferente naturaleza química obtenidos a partir de ellas, o bien de compuestos aislados. Por mencionar un ejemplo, cuando se realizó una búsqueda general en PubMed utilizando solamente como palabras clave “gastroprotection” y “extracts”, se desplegaron alrededor de 239 artículos que versan sobre este tema. Por otra parte, cuando se hace la búsqueda empleando como palabras clave “mucilage” y “gastroprotection”, se obtiene una menor cantidad de información al respecto. Por ejemplo, se encontró un artículo de reciente publicación en el que los autores, además de explorar otras variables, proponen que el mucílago de *Pulicaria undulata*, una planta desértica del sureste de Egipto tiene efecto gastroprotector en un modelo de ulceración con etanol (Fahmi et al., 2019). En otro estudio, se reporta que el mucílago obtenido de *Bryophyllum pinnatum*, una planta empleada en la medicina tradicional en India, África, China y América tropical, gastroprotege en un 69.65% y favorece el incremento de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa cuando el mucílago se administra a una dosis de 500 mg/kg durante 7 días en ratas Wistar (Sharma et al., 2014).

Al revisar la literatura con más detalle, se puede analizar que, en algunos trabajos, se proponen diferentes mecanismos de acción, ya sea a nivel local o sistémico, para los extractos o compuestos derivados de diversas plantas, por lo que es necesario continuar con el estudio del mecanismo que subyace a la gastroprotección mediada por el mucílago del alache.

### 6.2.2 Análisis microscópico.

De manera simultánea al análisis macroscópico, se llevó a cabo la evaluación histológica, tanto de un estómago normal (sin inducción de úlcera), como de los que fueron tratados únicamente con el vehículo, con las diferentes dosis del mucílago y con el fármaco de referencia.



**Figura 6.6. Vista macroscópica (A) y microscópica (B y C) de un estómago de ratón sin tratamiento y administración de etanol. B muestra un corte histológico con tratamiento HyE, mientras que C un tratamiento PAS.**

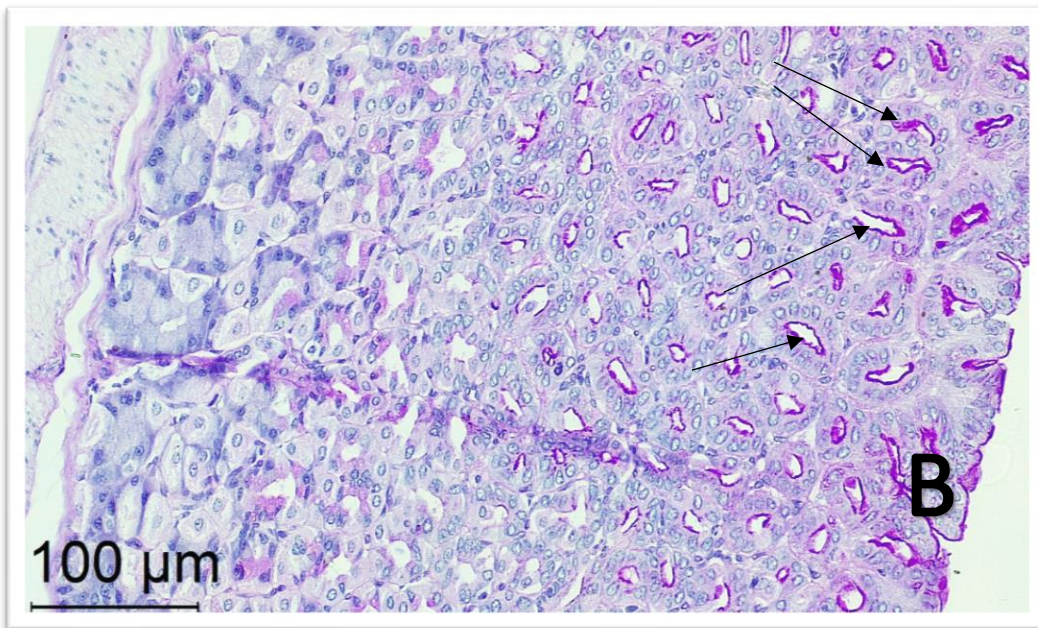
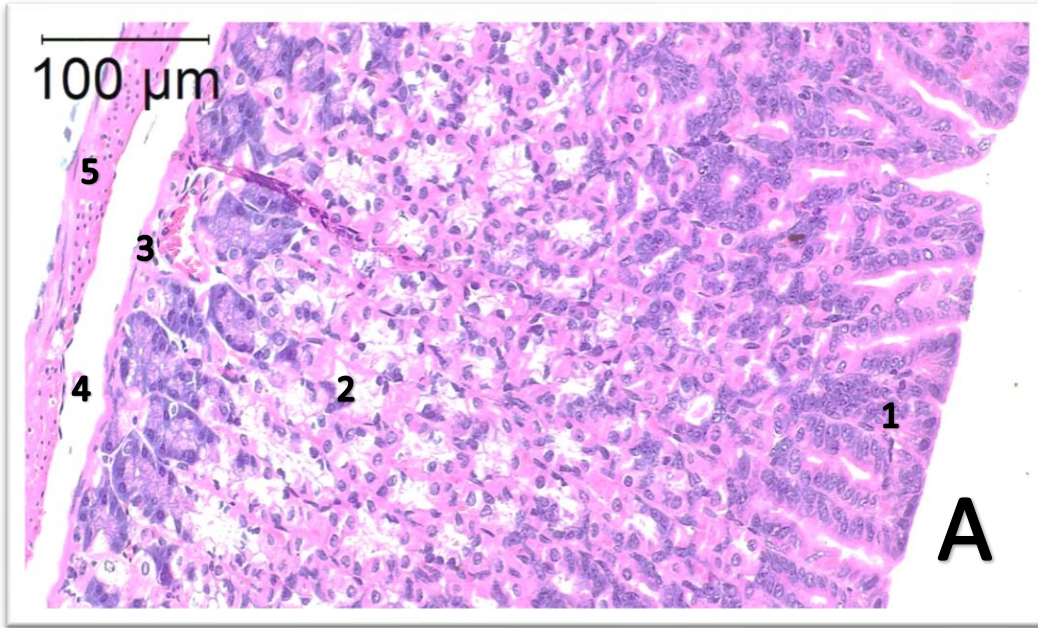
Para el análisis histológico de un estómago, se cortaron pequeños fragmentos de tejido de la región glandular de aproximadamente 10x12 mm. La región de corte en el estómago se seleccionó tomando en cuenta las zonas en las que mayoritariamente se producen las lesiones ulcerosas cuando el etanol se emplea como el agente injuriante (Figura 6.6). Este análisis se realizó tanto en los

estómagos normales, controles positivo y negativo y en los diferentes tratamientos con mucílago.

En el panel A de la figura 6.7 (estómago normal, tinción HyE), es posible identificar los principales componentes de la mucosa gástrica, como son: el epitelio columnar y las glándulas gástricas, la capa muscular de la mucosa, la submucosa y la túnica muscular. En esta imagen se puede observar la uniformidad de las glándulas de la mucosa gástrica, la perfecta estructuración del tejido y la ausencia de cualquier tipo de infiltrado ya sea eritrocitario y/o inflamatorio. En el panel B de la Figura 6.7, con la tinción de PAS, se puede además observar la presencia de moco, tanto al interior de las glándulas como en la porción apical del epitelio, lo que indica que no existen anomalías en el proceso de producción de este.

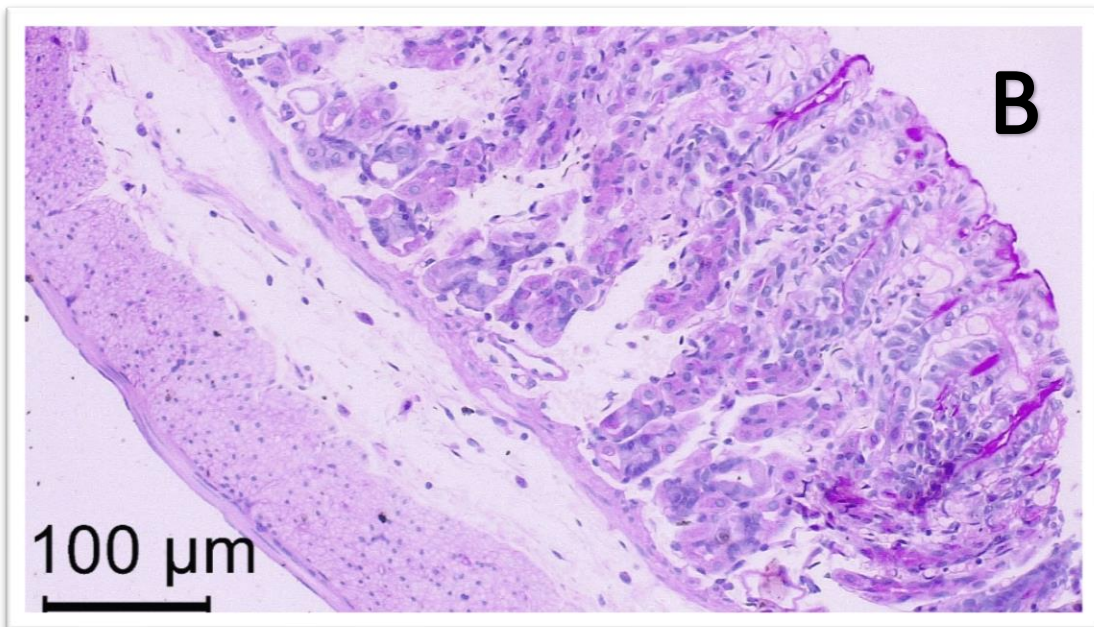
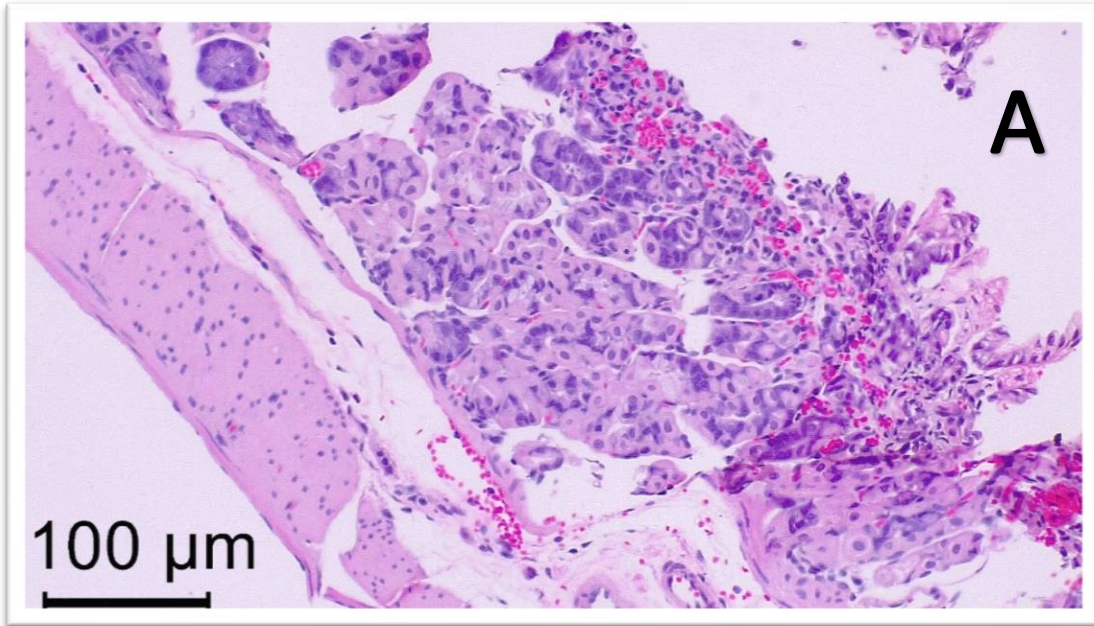
En la Figura 6.8, se muestran las imágenes histológicas de un estómago representativo del grupo de ratones que fueron tratados exclusivamente con SSI antes de la administración del etanol (control negativo). En el panel A, se puede observar que existe una evidente y completa pérdida de la estructura del tejido glandular, con un marcado edema a nivel de la submucosa, así como infiltración eritrocitaria y de células inflamatorias. Por su parte, en el panel B se denota la ausencia de moco neutro, lo que implica que el sistema productor y secretor de moco se encuentra comprometido debido a la disrupción epitelial y glandular.

Por otra parte, las imágenes obtenidas a partir de las muestras del control positivo, tratado con CAR 50 mg/kg PC (Figura 6.9), muestran que la estructura del tejido glandular se conserva mejor ante el daño con etanol, mientras que el edema a nivel de la submucosa disminuye, así como la infiltración eritrocitaria y de células inflamatorias (Figura 6.9 A). La tinción con PAS (Figura 6.9 B) permite ver que la producción y secreción de moco neutro se conservan, pero en menor proporción cuando se compara contra un estómago normal.

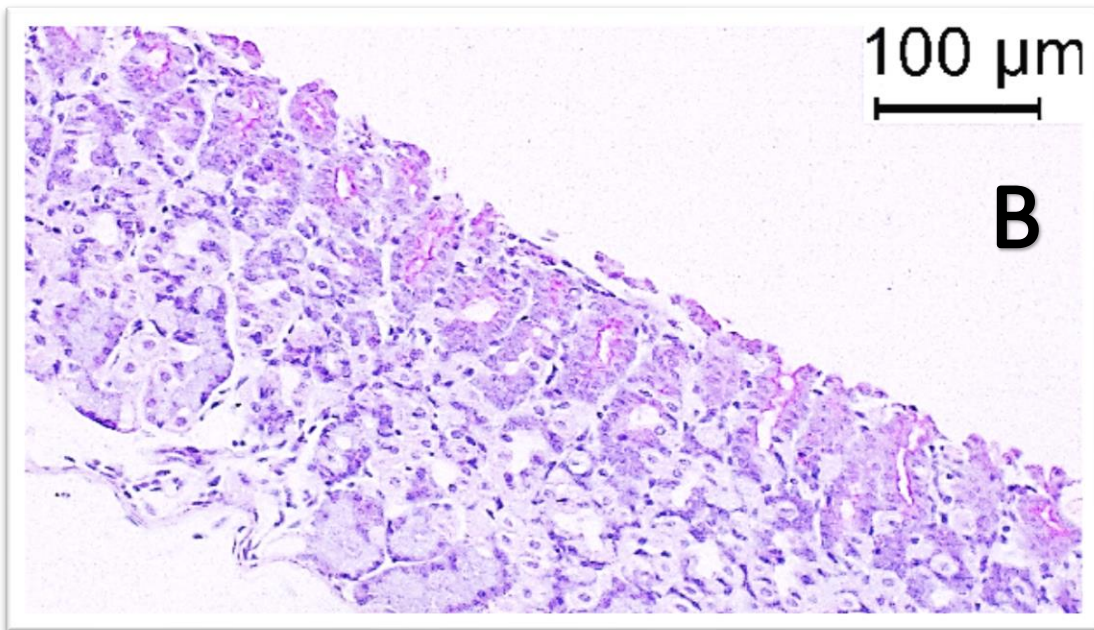
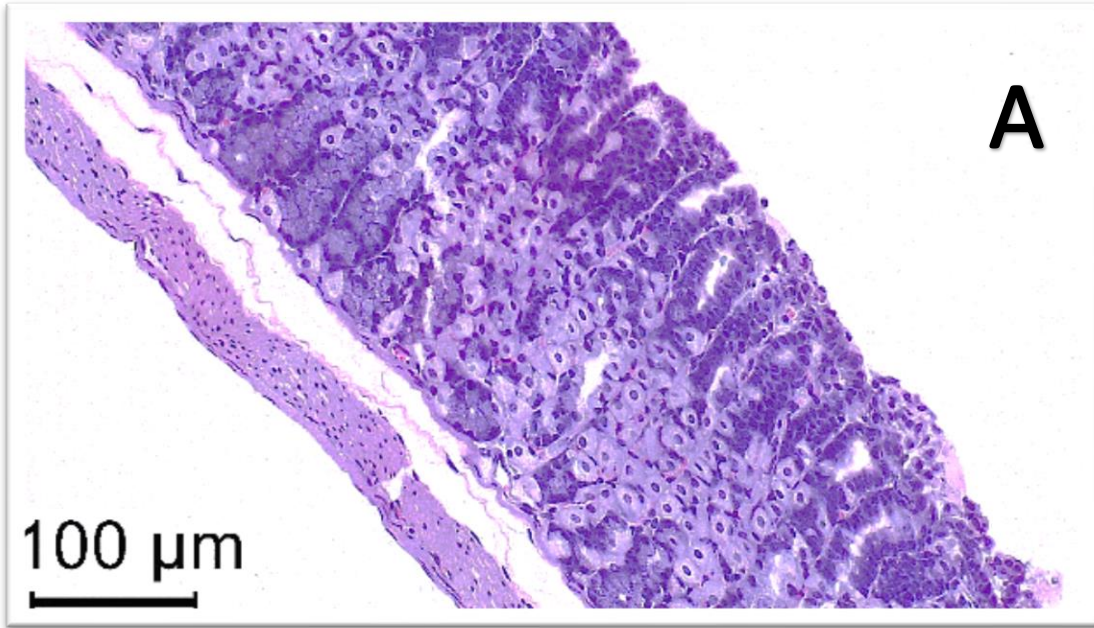


**Figura 6.7. Vista microscópica del estómago normal de un ratón.** Cortes sagitales de 5  $\mu\text{m}$  de espesor del área glandular de un estómago representativo. A) Tinción con Hematoxilina y Eosina (HyE) de la mucosa gástrica. 1. Epitelio columnar; 2 Glándulas gástricas; 3 Muscular de la mucosa; 4 Submucosa; 5 Túnica muscular. B) Tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS) de la mucosa gástrica. Las flechas continuas indican la presencia de moco neutro al interior de las glándulas.





**Figura 6.8. Vista microscópica del estómago de un ratón con inducción de úlcera tratado con SSI (control negativo).** A) Tinción Hematoxilina y Eosina (HyE) de la mucosa gástrica. B) Tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS) de la mucosa gástrica.

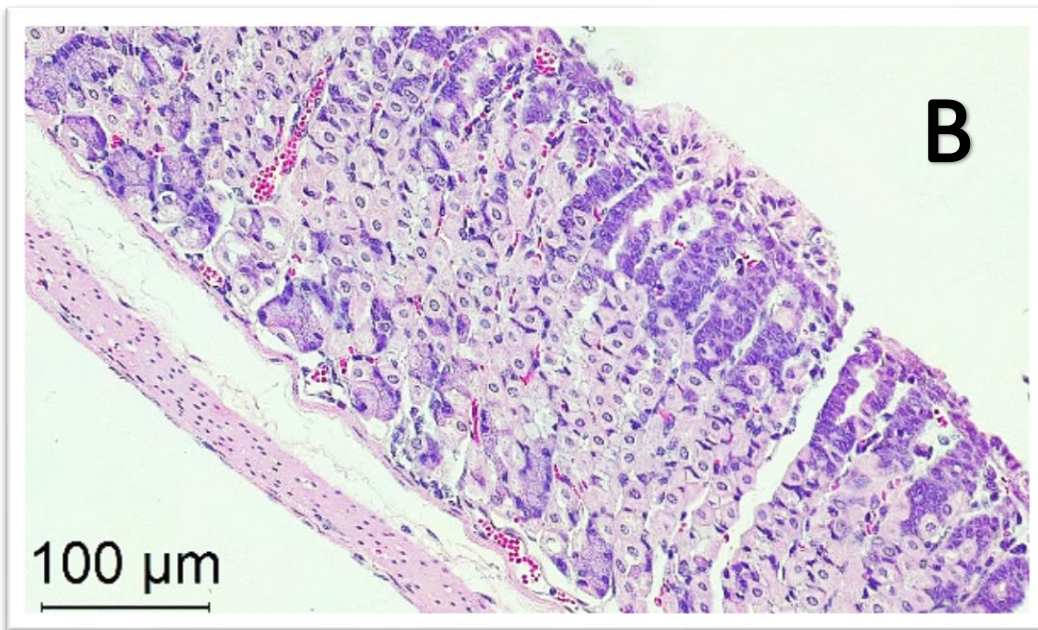
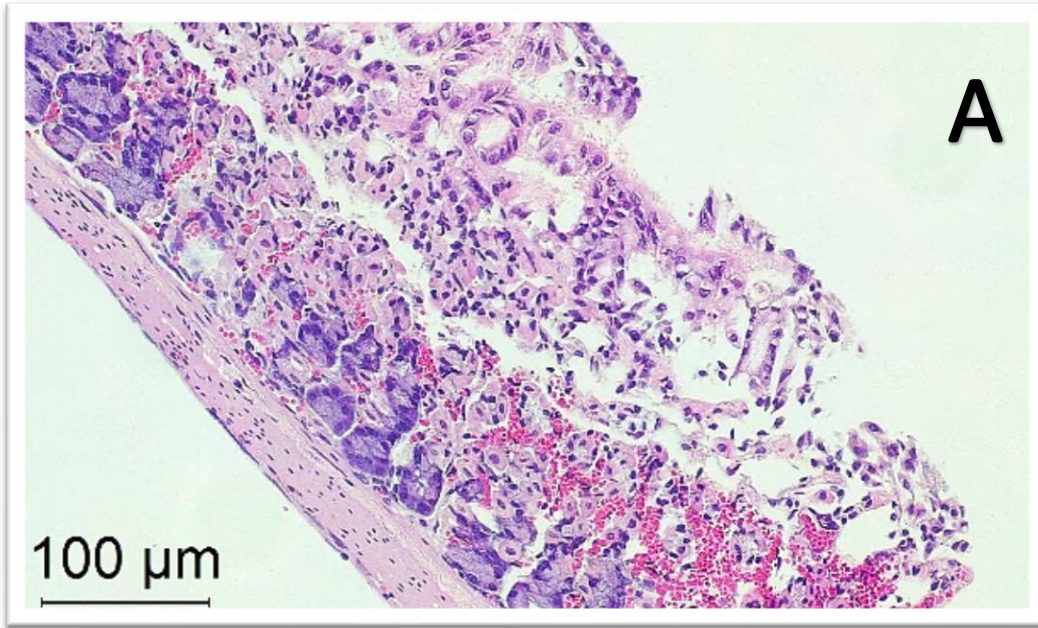


**Figura 6.9. Vista microscópica del estómago de un ratón tratado con Carbenoxolona 50 mg/kg PC (control positivo).** A) Tinción Hematoxilina y Eosina (HyE) de la mucosa gástrica. B) Tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS) de la mucosa gástrica.

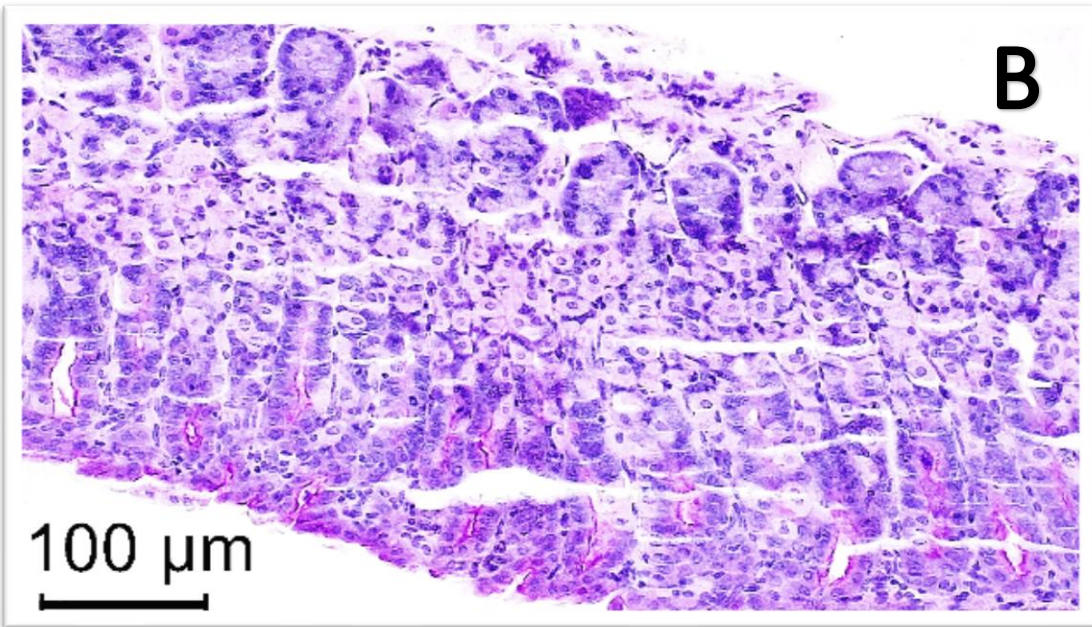
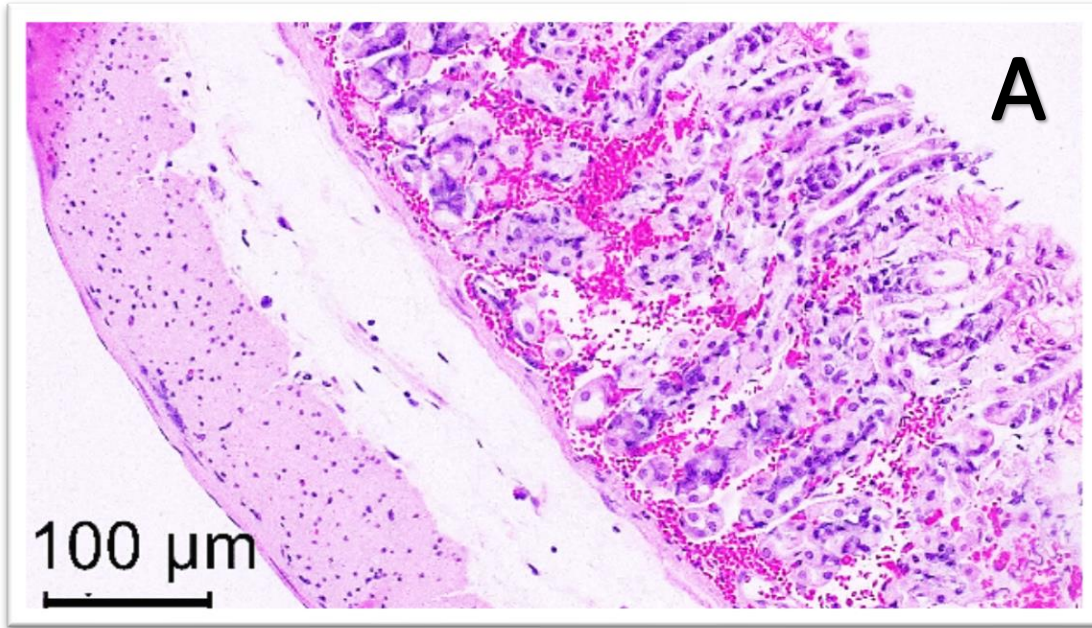
Por su parte, también se hizo la evaluación histológica de los cortes de los estómagos obtenidos del grupo de ratones tratados con las diferentes dosis del mucílago. Los tejidos de los diferentes estómagos muestran variaciones en el grado de daño según los parámetros de análisis: la uniformidad de las glándulas de la mucosa gástrica, la estructuración del tejido, el infiltrado eritrocitario y/o inflamatorio y la presencia de moco neutro.

En la figura 6.10 se puede observar con la tinción HyE (panel A) que, al administrar la dosis más baja del mucílago (100 mg/kg PC), en algunas regiones donde macroscópicamente se evidencia un mayor daño, coincide con una importante pérdida de la estructura del epitelio, un marcado infiltrado eritrocitario, pero menor infiltrado inflamatorio comparado con el control negativo. En el panel B, mediante la tinción de PAS, se observa que hay edema de la submucosa, lo cual se constata al comparar el espacio que abarca la submucosa en un estómago normal; así mismo se puede ver la ausencia del moco neutro tanto en el interior de las glándulas como en la superficie del epitelio.

Con la dosis de 200 mg/kg (Figura 6.11) se observa que, a pesar de que existe todavía un importante infiltrado eritrocitario e inflamatorio, así como edema de la submucosa, la estructura del epitelio parece más conservada (panel A) con respecto al control negativo e incluso al tratamiento con 100 mg/kg de mucílago. La ausencia de moco sigue siendo notoria aun con la dosis de 200 mg/kg (panel B).



**Figura 6.10. Vista microscópica de un estómago representativo de ratones tratados con 100 mg/kg PC de mucílago. A) Tinción con HyE. B) Tinción con PAS.**



**Figura 6.11. Vista microscópica de un estómago representativo de ratones tratados con 200 mg/kg PC de mucílago. A) Tinción con HyE. B) Tinción con PAS.**

Sin embargo, conforme se administraron las siguientes dosis del mucílago, 300 y 400 mg/kg PC (Figuras 6.12 y 6.13, respectivamente), se puede notar en la tinción con HyE que, aunque sigue existiendo infiltrado eritrocitario, sí existe ya una disminución importante en el infiltrado inflamatorio, prácticamente no se observa edema submucoso, hay una mejor conservación de la arquitectura epitelial. Mientras que, con la tinción de PAS, se observa la presencia de moco principalmente en la superficie epitelial.

Con la dosis de mucílago de 500 mg/kg (Figura 6.14), el daño inducido por la administración de etanol es notablemente menor comparado con el control negativo, y la conservación de la arquitectura epitelial se asemeja mucho al efecto que tiene la carbenoxolona (figura 6.10). Sin embargo, cabe hacer notar que con la dosis de carbenoxolona administrada, no se detecta la presencia del moco en la superficie del epitelio, comparado con la abundancia de moco que es patente cuando se administra la dosis más alta del mucílago. Este resultado sugiere que, aunque a nivel macroscópico los Índices de Úlcera generados en presencia de carbenoxolona y de la dosis más alta de mucílago sean muy semejantes, a nivel histológico hay diferencias significativas que podrían incidir en la calidad histológica con la que se resuelve una úlcera (Arakawa *et al.*, 2012), lo que redundaría en el éxito de la resolución de una úlcera o en la propensión a la recurrencia de las lesiones ulcerosas.

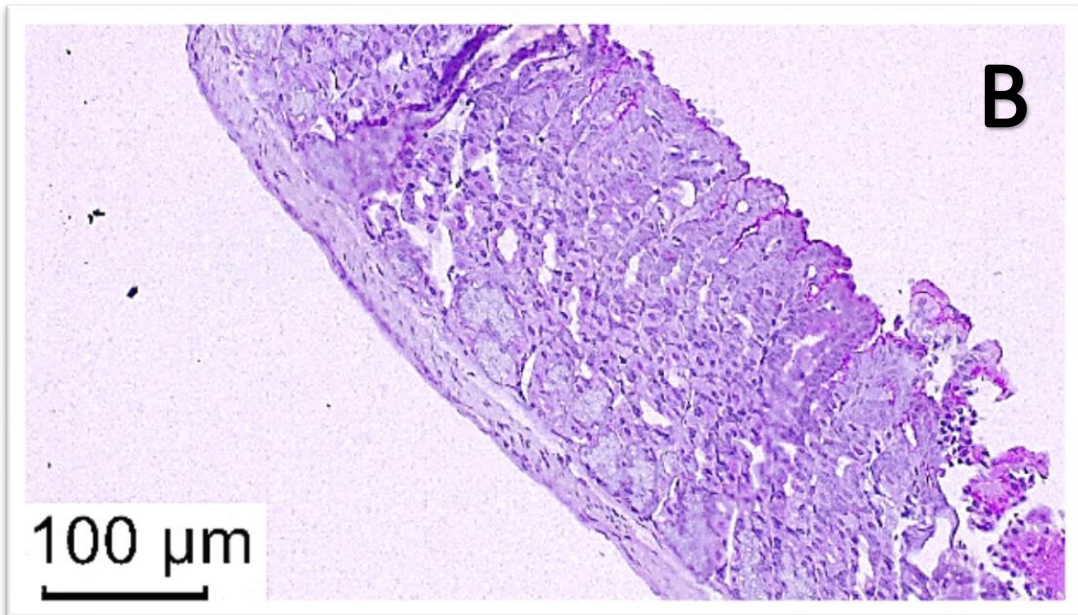
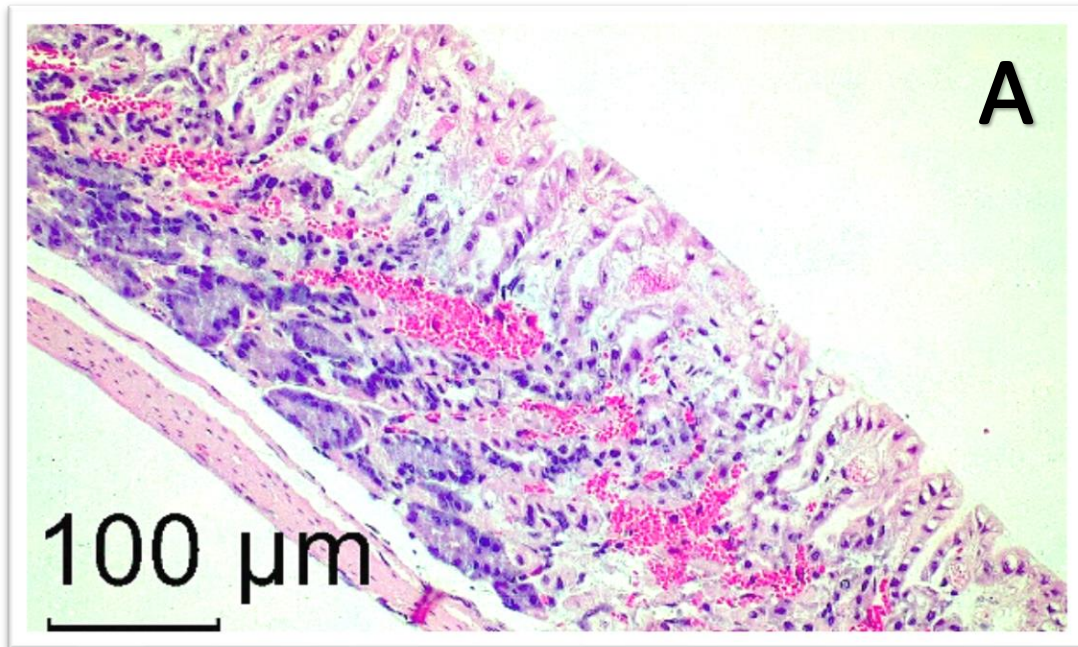
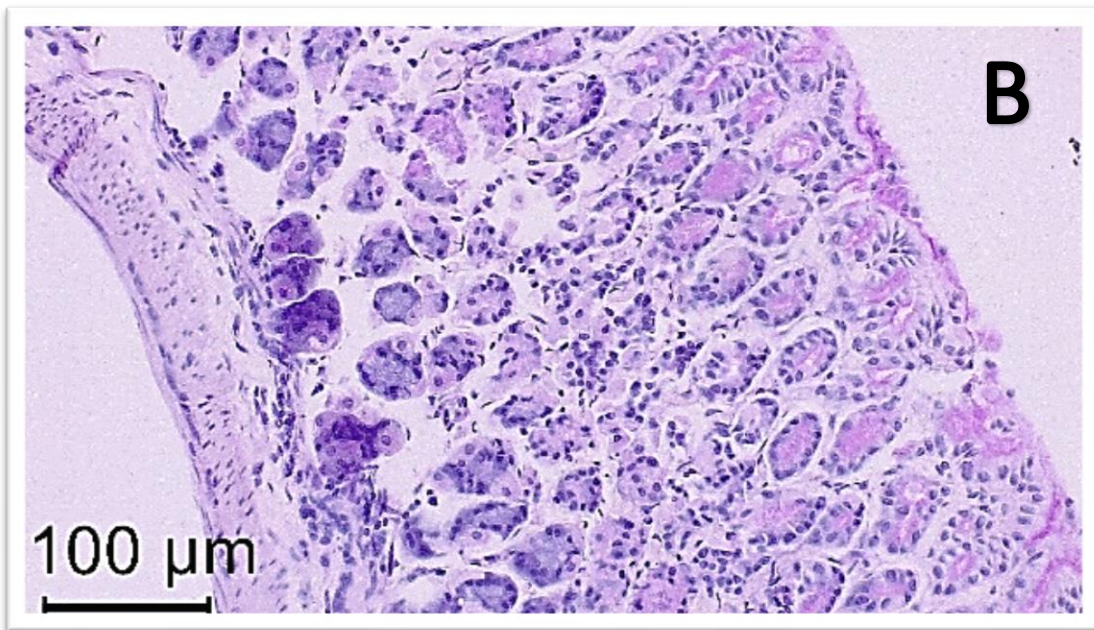
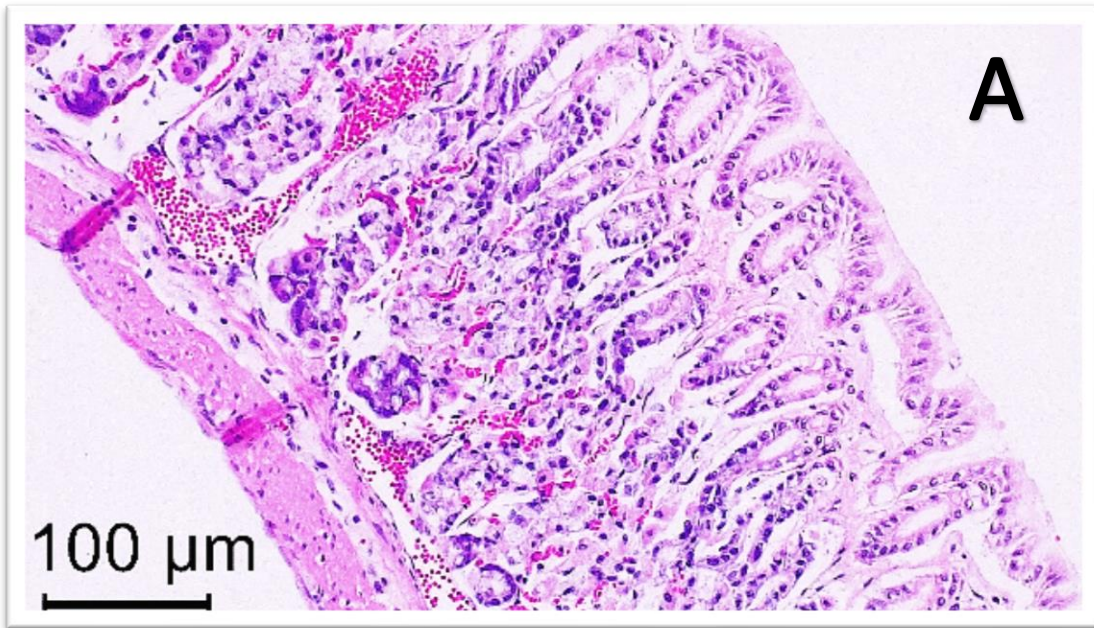
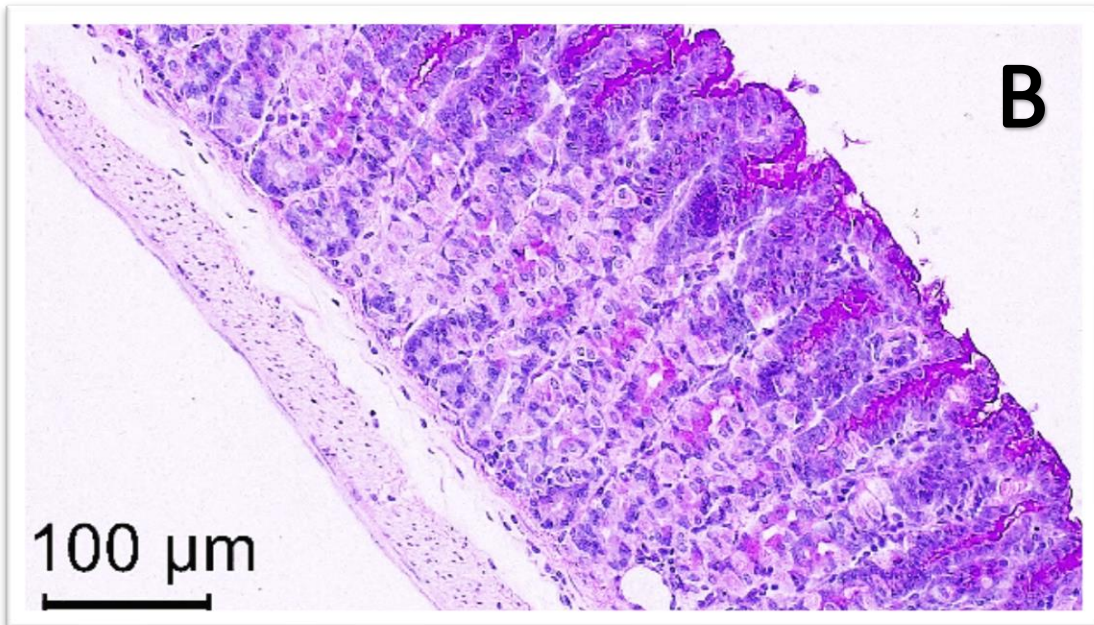
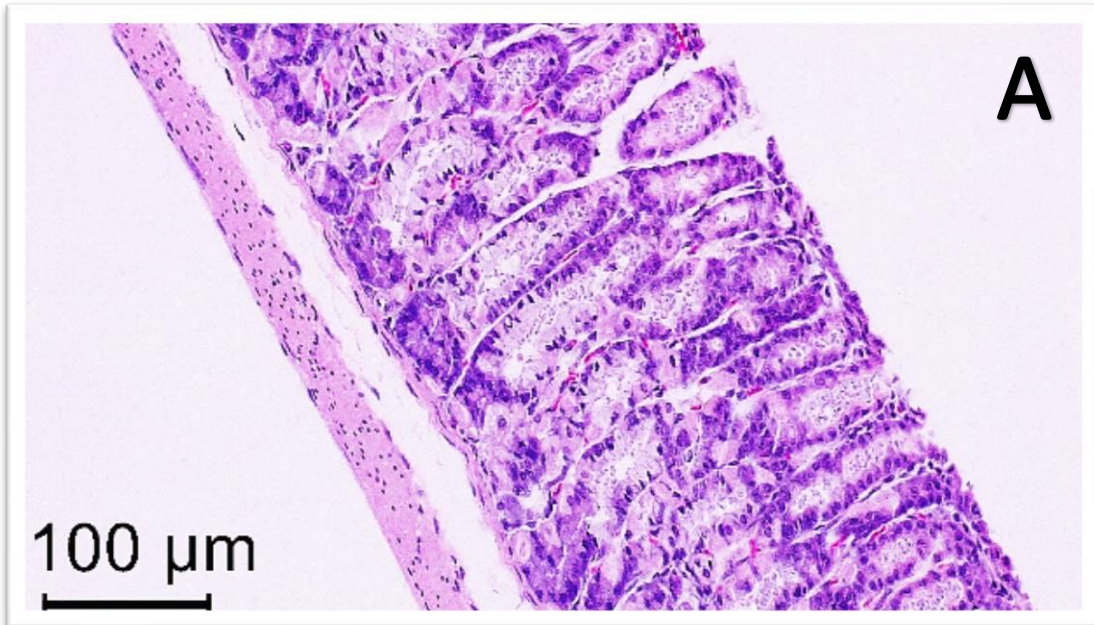


Figura 6.12. Vista microscópica de un estómago representativo de ratones tratados con 300 mg/kg PC de mucílago. A) Tinción con HyE. B) Tinción con PAS.



**Figura 6.13. Vista microscópica de un estómago representativo de ratones tratados con 400 mg/kg PC de mucílago. A) Tinción con HyE. B) Tinción con PAS.**





**Figura 6.14. Vista microscópica de un estómago representativo de ratones tratados con 500 mg/kg PC de mucílago. A) Tinción con HyE. B) Tinción con PAS.**

Hasta el momento, con los datos presentados, ha sido posible demostrar que el mucílago obtenido a partir de *A. cristata* exhibe un importante efecto gastroprotector, el cual es posible constatar tanto a nivel macroscópico como histológico.

Desafortunadamente de manera general, los quelites, incluyendo al alache empleado en este trabajo, han sido considerados como especies tradicionales subutilizadas y subvaloradas, a pesar de su importante rol como alimento y, en este caso, potencial uso médico.

La información aportada por este trabajo resulta de gran relevancia ya que le da un valor agregado a la especie, con lo que se busca promover que, el consumo de algunos quelites aumente entre la población del país y sean incluidos en mayor medida en la dieta común de los mexicanos.

## 7. Conclusiones

1. Fue posible obtener la fracción mucilaginosa de *A. cristata* a partir de un extracto acuoso de dicha planta, además de que las modificaciones implementadas en la metodología permitieron mejorar el rendimiento de extracción con respecto a trabajos previos, al incrementar dicho valor en 1.59%

2. Al calcular el índice de ulceración por etanol y el porcentaje de gastroprotección del mucílago fue posible establecer que la administración del mucílago exhibe un efecto gastroprotector frente al daño inducido por etanol, mismo que fue cuantificado y analizada macroscópicamente.

3. A nivel microscópico, también se constata el efecto protector de la mucosa gástrica cuando se administra el mucílago, aun con la dosis más baja.

4. El efecto gastroprotector del mucílago es dosis-dependiente.

5. Con la dosis más alta de mucílago, el porcentaje de gastroprotección es muy semejante al que produce el fármaco de referencia, carbenoxolona.

6. A nivel microscópico, en presencia de las dosis más alta de mucílago, las características histológicas de las capas que conforman a la pared gástrica están mejor conservadas y con menor carácter inflamatorio comparado con aquellas observadas en la administración de carbenoxolona.

## 8. Perspectivas

El presente trabajo aporta información relevante sobre el potencial efecto del mucílago del alache como coadyuvante en las terapias para el manejo de la úlcera péptica. Con estos datos se abre la puerta para continuar con su estudio:

- Determinar la composición química del mucílago.
- Continuar trabajando en modelos de ulceración con el objeto de elucidar el mecanismo de acción del mucílago.
- Seguir con los estudios preclínicos que permitan verificar toxicidad aguda y/o crónica.
- Evaluar el efecto del mucílago como un agente resolutorio de úlceras en un modelo crónico de ulceración gástrica.

## 9. Bibliografía

- Adinortey, M., Ansah, C., Galyuon, I., Nyarko, A. 2013 *In Vivo* models used for evaluation of potential antigastroduodenal ulcer agents. *Ulcers* 2013:1-12.
- Arakawa, T., Watanabe, T., Tanigawa, T., Tominaga, K., Fujiwara, Y., Morimoto, K. 2012 Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: its pathophysiology and clinical relevance. *World Journal of Gastroenterology*. 18: 4811-4822.
- Argueta, A., Cano, L., Rodarte, M. 1994. Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo I, II y III. Instituto Nacional Indigenista. México.
- Ayala, F. 2016. Perfil sensorial de Especies Tradicionales Subvaloradas y Subutilizadas de México: Quelites. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Baron, J. Effect of carbenoxolone sodium on human gastric acid secretion. *Gut*. 18(9): 721-722.
- Barret, K. (2010). Ganong fisiología médica. 23ª ed. McGraw-Hill Educación. México.
- BDMTM (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana). Zolla, C., Argueta, A., Mata, S. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Actualizado en 2009. Disponible en: [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/mongrafia.php?|=3&t=Anoda\\_cristata&id=7794](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/mongrafia.php?|=3&t=Anoda_cristata&id=7794). Ultimo acceso 20 de mayo de 2020-
- Bi, W., Man, H., Man, M. 2014. Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: A review. *World Journal of Gastroenterology*. 20(45): 17020-17028.
- Blanchard. T., Czinn, S. 2017. Identification of *Helicobacter pylori* and the evolution of an efficacious childhood vaccine to protect against gastritis and peptic ulcer disease. *Pediatric Research*. 81: 170-76.

- Bourges, H., Morales de León, J., Vázquez, N. 2013. El valor nutritivo de los quelites ¿Un alimento de segunda? Cuadernos de Nutrición. 36(1): 17-25.
- Bourges, H., Vargas, L. 2015. La cocina tradicional y la salud. Revista Digital Universitaria. UNAM. 16(5). Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num5/art36/art36> (ultima consulta el 20 de mayo de 2020).
- Bucciarelli, A., Skliar, M. I. 2007. Medicinal plants from Argentina with gastroprotective activity. Ars Pharmaceutica. 48: 361-369.
- Bye, R. 1981. Quelites - ethnoecology of edible greens - past, present and future. Journal of Ethnobiology. 1, 109-123.
- Bye, R., Linares, E. 2000. Los quelites, plantas comestibles de México: una reflexión sobre intercambio cultural. CONABIO. Biodiversitas 31, 11-14
- Cragg, G., Newman, D. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. Journal of Ethnopharmacology. 100(1-2): 72-79.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de país. México.
- Daniels, I., Allum, W. 2005. The Anatomy and Physiology of the Stomach. En: Upper Gastrointestinal Surgery. 17-37. Springer. Londres.
- De Francesco, V., Ierardi, E., Hassan, C., Zullo, A. *Helicobacter pylori* therapy: Present and future. The World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics 6. 3(4): 68-73.
- Diaz, L. 2015. Mucosa gástrica: mecanismos protectores y efectos dañinos del ácido acetilsalicílico. Enfoques fisiológico y bioquímico. Medicina e Investigación. 3(1): 100-103.
- Dimaline, R., Varro, A. 2007. Attack and defence in the gastric epithelium, a delicate balance. Experimental Physiology. 92(4): 591-601.

- Diplock, A., Aggett, P., Ashwell, M., Borneo, F., Fern, E., Roberfroid, M. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*. 81, S1–S28.
- Dixon, M. 2001. Pathology of gastritis and peptic ulceration. En: Mobley, H., Mendz, G., Hazell, S. (Eds.) *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press, Washington. 459-469.
- Doll, R., Hill, I., Hutton, C. 1965. Treatment of gastric ulcer with carbenoxolone sodium and oestrogens. *Gut*. 6: 19-24.
- Escobedo, W., Gómez, E., García, K., Guerrero, R., Cardoso, A., Romero, I. 2018. Gastroprotective mechanism and ulcer resolution effect of *Cyrtocarpa procera* methanolic extract on ethanol-induced gastric injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1: 1-12.
- Espino, M., Ornelas, J., Martínez, M., Santillán, C., Barbosa, G., Zamudio, P., Olivas, I. 2010. Development and characterization of edible films based on mucilage of *Opuntia ficus-indica* (L.). *Journal of Food Science*. 75(6): 347-352.
- Fahmi, A., Abdur, M., Aboul, A., Hamed, M., Abd, H., Shalaby, N., Nasr, M. 2019. Chemical composition and protective role of *Pulicaria undulata* (L.) C.A. Mey. subsp. *undulata* against gastric ulcer induced by ethanol in rats. *Heliyon*.5(3): 1-25.
- Fox, S. 2011. *Fisiología humana*. 12ª ed. McGraw-Hill Educación. México.
- Frison, J. 1990. *La úlcera*. Emeká Editores de Difusora Internacional S.A., Barcelona, España.
- Gálvez, A., Bourges, H. 2012. La alimentación en la Ciudad de México En: *Los riesgos para la Salud en la vida de una Megametrópolis. Memoria I*. México. UNAM, Facultad de Medicina, Seminario sobre Medicina y Salud. 366-403.
- Gálvez, A., Peña, C. 2015. Revaloración de la dieta tradicional mexicana: una visión interdisciplinaria. *Revista Digital Universitaria*. UNAM. 16(5). Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num5/art33/> (ultima consulta el 5 de mayo de 2020).

- García, J., Gómez, J. 2000. Fisiología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Revista Española de Reumatología*. 27(1): 33-35.
- García, C. 2013. Actualización del diagnóstico y tratamiento del cáncer gástrico. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 24(4): 627-634.
- García, R., Gutiérrez, G., Méndez E., Sánchez, A., Maldonado, O., Domínguez, M., Vázquez, M., Muñoz, O., Cruz, J. 2014. *Cnidioscolus chayamansa* Mc Vaugh, an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*. 151, 937-43.
- Geneser, F. 1985. Atlas de histología. Editorial Médica Panamericana. Copenhagen.
- Glavin, G., Szabo, S. 1992. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *FASEB Journal*. 6: 825-831.
- Goodier, T., Horwich, L., Galloway, R. 1967. Morphological observations on gastric ulcers treated with carbenoxolone sodium. *Gut*. 8(6): 544-547.
- Ghoshal, N., Bal, H. 1989. Comparative morphology of the stomach of some laboratory mammals. *Laboratory Animals*. 23(1): 21.29.
- Guslandi, M., Sorghi, M., Tittobello, A. 1994. Enhancement of gastric mucosal blood flow with sulglycotide. *Clinical Therapy*. 16(2): 141-144.
- Ham, M., Akiba, Y., Takeuchi, K., Montrose, H., Marshall, J., Kaunitz, J. 2012. Capítulo 43. Gastroduodenal Mucosal Defense. Editor: Johnson, L. En: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 5: 1169-1208.
- Henman, F. 1970. Inhibition of peptic activity by carbenoxolone and glycyrrhetic acid. *Gut*. 11(4): 344-351.
- Hernández, C., Aguilera, M., Castro, G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 4: 137-151.



- IARC (International Agency of Research on Cancer). 1994. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk on humans. Lyon. WHO. 61, 177-240.
- Juárez, K., Brindis, F., Medina-Campos, O., Pedraza-Chaverri, J., Bye, R., Linares, E., Mata, R. 2015. Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. Journal of Ethnopharmacology. 161, 36-45.
- Juárez, K., Déciga, M., Mata, R. 2015. Antihyperalgesic activity of an extract and compounds from *Anoda cristata*. En Radko, Y., Pedersen, S., Christensen, L. (Eds.) Screening of plant extracts for anti-inflammatory activity. Abstract from Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, Copper Mountain. 110. Estados Unidos.
- Kusters, J., van Vliet, A., Kuipers, E. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. Clinical Microbiology Reviews. 19, 449-490.
- Laine, L., Takeuchi, K., Tarnawski, A. 2008. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. Gastroenterology. 135: 41-60.
- Lipkin, M. 1971. In "defence" of the gastric mucosa. Gut. 12(7): 599-603.
- Llorente, J., Ocegueda, S. 2010. Estado del conocimiento de la biota, en: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México.
- Loarca, G., Mendoza, S., Ramos, M., Reynoso, R. 2010. Antioxidant, antimutagenic and antidiabetic activities of edible leaves from *Cnidioscolus chayamansa* Mc. Vaugh. Journal of Food Science. 75(2): 68-72.
- Loguercio, C., Taranto, D., Beneduce, F., del Vecchio, C., de Vicentiis, A., Nardi, G., Romano, M. 1993. Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. Gut. 34: 161-165.
- Lozano, J. 2000. La úlcera péptica y su tratamiento (I). Etiología, clínica, diagnóstico y medidas higienicodietéticas. Offarm: farmacia y sociedad. 19(3): 110-116.

- Malfertheiner, P., Chan, K., McColl, E. 2009. Peptic Ulcer Disease. *The Lancet*, 374: 1449-1461.
- Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México.
- Martínez, M. 2016. Estudio del potencial anti-*Helicobacter pylori* de extractos y alimentos preparados a partir de tres especies subvaloradas y subutilizadas de quelites. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Masuda, E., Kawano, S., Nagano, K., Tsuji, S., Takei, Y., Tsujii, M., Oshita, M., Michida, T., Kobayashi, I., Nakama, A., Fusamoto H., Kamada T. 1995. Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Gastroenterology*. 108: 58-64.
- Monrroy, M., García, E., Ríos, K., Renán, J. 2017. Extraction and Physicochemical Characterization of Mucilage from *Opuntia cochenillifera* (L.) Miller. *Journal of Chemistry*. 2017: 2-9.
- Montes, J., Flores, J. Alfonso, E. 2005. Histamina, receptores y antagonistas. *Revista Médica del Hospital General de México*. 68(3): 164-169.
- Moore, K., Dailey, A., Agur, A. 2013. Anatomía con orientación clínica. 7ª ed. Wolters Kluwer. Barcelona.
- Morales De León, J., Bourges, H., Vázquez, N. 2013. La composición nutrimental de los quelites. *Cuadernos de nutrición*. 36, 26–30.
- Mutoh, H., Hiraishi, H., Ota, S., Ivey, K., Terano, A., Sugimoto, T. 1990. *Gastrointestinal and Liver Physiology*. 258(4): 603-609.
- Navarrete, A., Trejo-Miranda, J. L., Reyes-Trejo, L., 2002. Principles of root bark of *Hippocratea excels* (*Hippocrataceae*) with gastroprotective activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 79: 383–388
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Hong Kong.

- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2018. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva.
- Palacios, F., Escobedo, W., Romero, I. 2011. Panorama actual del estudio de las plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 14(1): 51-61.
- Pareek, V., Singh, M., Bhat, Z., Singh, P., Kumar, D., Sheela, S. 2010. Studies on mucilage of *Basella alba* Linn. Journal of Pharmacy Research. 3(8): 1892-1894
- Park, S., Oh, T., Kim, Y., Sim, H., Park, S., Jang, E., Park, J., Baik, H., Hahm, K. 2008. Artemisia asiatica extracts protect against ethanol-induced injury in gastric mucosa of rats. Journal of Gastroenterology and Hepatology Research. 23:976-984.
- Padulosi, S., Hoeschle-Zeledon, I. 2004. ¿A qué denominamos especies subutilizadas? Leisa Revista de Agroecología. 120: 6-8.
- Pérez, S., Tálens, R., Rius, S., Finamor, I., Sastre, J. 2017. Redox signaling in the gastrointestinal tract. Free Radical Biology and Medicine, 104: 75-103.
- Peskar, B. M., Lange, K., Hoppe, U., Peskar, B. A. 1996. Ethanol simulates formation of leukotriene C<sub>4</sub> in rat gastric mucosa. Prostaglandins. 31: 283-293.
- Pinder, R., Brogden, R., Sawyer, P., Speight, T., Spencer, R., Avery, G. 1976. Carbenoxolone: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in peptic ulcer disease. Drugs. 11(4): 245-307.
- Rendón, B., Bye, R., Núñez, J. 2001. Ethnobotany of *Anoda cristata* (L.) Schlttdl. (*Malvaceae*) in Central México: Uses, management and population differentiation in the community of Santiago Mamalhuazuca, Ozumba, State of Mexico. Economic Botany. 55, 545–554.
- Sharma, A., Bhot, M., Chandra, N. 2014. Gastroprotective effect of aqueous extract and mucilage from *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz. Ancient Science of Life. 33(4): 252-258.

- Shin, J., Sachs, G. 2008. Pharmacology of proton pump inhibitors. *Current Gastroenterology Reports*. 10(6): 528-534.
- Shin, J., Kim, N. 2013. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the H<sup>+</sup> pump inhibitors. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 19: 25-35.
- SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica). 2019. Boletín epidemiológico. México. 52: 49.
- Takeuchi, K., Yagi, K., Kitamura, M., Kubomi, M. 1998. Stimulation of duodenal bicarbonate secretion by carbenoxolone in rats: a comparative study with prostaglandin E2. *General Pharmacology: The Vascular System*. 30(5): 739-744.
- Thorsen, K., Søreide, J., Kvaløy, J., Glomsaker, T., Søreide, K. 2013. Epidemiology of perforated peptic ulcer: age and gender adjusted analysis of incidence and mortality. *World Journal of Gastroenterology*. 19: 347-54.
- Torres J., Leal, Y., Pérez, G., Gómez, A., Camorlinga, M., Cedillo, R., Tapia, R., Muñoz, O. 1998. A community-based seroepidemiological study of *Helicobacter pylori* infection in México. *The Journal of Infectious Diseases*. 178(4): 1089-1094.
- Viada, E., Gómez, L., Campaña, I. 2017. Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico de Holguín*. 21(1): 171-186.
- Villaseñor R., Espinosa G., 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México.
- Vibrans, H. 2004. Malezas de México. *Anoda cristata*. Ficha CONABIO. Recurso en línea: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/malvaceae/anoda-cristata/fichas/ficha.htm> (última consulta el 20 de mayo de 2020).
- Yildirim, E., Dursun, A., Turan, M. 2001. Determination of the nutrition contents of the wild plants used as vegetables in upper çoruh valley. *Turkish Journal of Botany*. 25: 367-371.