



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DE LA
COMBINACIÓN DEL ÁCIDO 3 α -HIDROXIMASTICADIENÓNICO Y
DILIGUSTÍLIDA EN UN MODELO DE DAÑO GÁSTRICO INDUCIDO
CON DICLOFENACO EN RATA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

GALINDO MUÑOZ JOSÉ MARÍA

JURADO DE EXAMEN

DIRECTOR: DRA. ELIZABETH ARLEN PINEDA PEÑA

ASESOR: DR. ADELFO N. REYES RAMÍREZ

ASESOR: M. en F. MARÍA MARTHA UGALDE HERNÁNDEZ

SINODAL: Dr. GUADARRAMA MORALES FRANCISCO OSCAR

SINODAL: M. en C. DIAZ VAZQUEZ GERARDO



Ciudad de México
Diciembre de 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Programa de Apoyo a Proyectos de
Investigación e Innovación Tecnológica
(PAPIIT), Dirección general de asuntos
del personal académico (DGAPA-UNAM),
UNAM Clave IA20453

Índice

Índice de tablas.....	I
Índice de figuras.....	I
Abreviaturas, acrónimos y símbolos.....	III
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Marco teórico.....	6
3.1. El estómago.....	6
3.1.1. Fisiología.....	6
3.1.2. Irrigación sanguínea e inervación del sistema gástrico.....	7
3.1.3. La gastroprotección y sus mecanismos.....	8
3.1.4. Patologías del estómago.....	11
3.1.4.1. Úlcera péptica.....	12
3.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE).....	13
3.2.1. Diclofenaco.....	16
3.2.2. Daño gástrico causado por AINE.....	18
3.3. Plantas con uso medicinal.....	20
3.3.1. Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (3 α -OH-MDA).....	21
3.3.2. Diligustílida (DLG).....	22
3.4. Análisis para medir el efecto gastroprotector.....	23
3.4.1. Análisis isobolográfico.....	24
4. Planteamiento del problema.....	27
5. Hipótesis.....	29

6. Objetivos	30
6.1. Objetivo general.....	30
6.2. Objetivos particulares.....	30
7. Diseño experimental.....	31
8. Material y métodos	32
8.1. Materiales, equipos e instrumentos	32
8.2. Reactivos	32
8.3. Animales	32
8.4. Metodología	34
8.4.1. Modelo experimental de daño gástrico por diclofenaco	34
8.4.2. Evaluación de la seguridad gástrica de los compuestos 3 α -OH-MDA y DLG ante el daño gástrico generado por diclofenaco.....	35
8.4.3. Evaluación de la seguridad gástrica de la combinación de los compuestos 3 α -OH-MDA con DLG ante el daño gástrico generado por diclofenaco	37
8.4.4. Análisis Isoblográfico o análisis de los datos de la combinación de 3 α -OH- MDA con DLG.....	38
8.4.5. Análisis estadístico	39
9. Resultados	40
9.1. Modelo experimental de daño gástrico por diclofenaco.....	40
9.2. Evaluación del efecto protector de DLG y 3α-OH-MDA de forma individual ante el daño gástrico generado por diclofenaco	42
9.3. Evaluación del efecto protector de la combinación de 3α-OH-MDA con DLG ante el daño gástrico generado por diclofenaco.	45

10.	<i>Discusión de resultados:</i>	51
11.	<i>Conclusión</i>	55
12.	<i>Perspectivas</i>	56
13.	<i>Referencias</i>	57
14.	<i>Anexo</i>	65

Índice de tablas

Tabla 1. Factores que regulan la gastroprotección.....	10
Tabla 2. Clasificación de los AINE por su estructura.....	14
Tabla 3. Grupos de experimentación para la evaluación del efecto gastroprotector de la combinación de ácido 3 α -OH-MDA con DLG ante el daño gástrico por diclofenaco.	36
Tabla 4. Dosis usadas para el estudio de la curva dosis-respuesta del daño gástrico por diclofenaco.....	41
Tabla 5. Índice de úlcera del pretratamiento del 3 α -OH-MDA y la DLG ante el daño gástrico inducido por diclofenaco.....	42
Tabla 6. Dosis efectivas 50 y sus límites de confianza al 95%.	44
Tabla 7. Cálculos para la curva dosis respuesta de la combinación 1:1 de 3 α -OH-MDA con DLG	45
Tabla 8. Cálculos para la curva dosis respuesta de la combinación 1:3 de 3 α -OH-MDA con DLG	45
Tabla 9. Cálculos para la curva dosis respuesta de la combinación 3:1 de 3 α -OH-MDA con DLG	46
Tabla 10. Límites de confianza de las dosis efectivas 50 (Z_{ex}) de la combinación 1:1 y 1:3 .	48
Tabla 11. Valores teóricos (Z_{ad}) y experimentales (Z_{ex}) para combinaciones de ácido 3 α -hidroximasticadienónico-diligustilida y su magnitud de interacción.....	50

Índice de figuras

Figura. 1. Regiones anatómicas del estómago y capas musculares	7
Figura. 2. Conformación del cuerpo del estómago	9
Figura. 3. Mecanismos defensivos y factores agresivos de la mucosa gástrica	10
Figura. 4. Factores etiológicos responsables de la aparición de úlcera péptica.....	13
Figura. 5. Ácido araquidónico como precursor de los prostanoïdes proinflamatorios.....	14
Figura. 6. Estructura química del diclofenaco.....	16
Figura. 7. Gráfica de comparación de riesgo de hemorragia digestiva alta inducida por AINE	18
Figura. 8. Estructura del ácido 3 α -hidroximasticadienónico.....	21
Figura. 9. . Estructura de la diligustilida.....	22
Figura. 10. Isoblograma	25

Figura. 11. Metodología general para la evaluación de 3 α -OH-MDA, DLG o su combinación ante el daño gástrico por diclofenaco.	36
Figura. 12. Imágenes representativas de las lesiones en cuerpo del estómago después de los diversos tratamientos.....	40
Figura. 13. Grafica del daño gástrico generado en ratas Wistar por diclofenaco	41
Figura. 14. Comparación de las imágenes representativas de las lesiones en cuerpo del estómago causado por la dosis ulcerogénica del diclofenaco, después de los diversos tratamientos de las ratas	43
Figura. 15. Grafica del efecto gastroprotector del pretratamiento individual con 3 α -OH-MDA y DLG ante el daño gástrico con diclofenaco.	45
Figura. 16. Resultados gráficos de la combinación 1:1, 1:3 y 3:1 de 3 α -OH-MDA con DLG.	47
Figura. 17. Imágenes representativas de las lesiones en cuerpo del estómago después del tratamiento combinado de las sustancias.....	48
Figura. 18. Imágenes representativas de las lesiones en cuerpo del estómago después del tratamiento combinado de las sustancias.....	48
Figura. 19. Porcentaje de gastroprotección vs log de dosis de 3 α -OH-MDA, DLG y sus respectivas combinaciones.	49
Figura. 20. Isoblograma, Z_{ad} y Z_{ex} , de la combinación de 3 α -OH-MDA con DLG.	50

Abreviaturas, acrónimos y símbolos

3 α -OH-MDA	Ácido 3 α -hidroximasticadienónico
FDA	Administración de alimentos y medicamentos (del inglés Food and Drug Administration)
AM	Adultos mayores
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
COX	Ciclooxigenasa
CBS	Cistationina β -sintasa
CSE	Cistationina γ -liasa
DLG	Diligustílida
SOD	Dismutasa
<i>DE</i> ₅₀	Dosis efectiva 50
EEM	Error estándar de la media
ROS	Especies reactivas de oxígeno
EROS	Especies reactivas derivadas de oxígeno
GI	Gastrointestinal(es)
GSH	Glutación
°C	Grados Celsius
gl	Grados de libertad
g	Gramos
h	Hora(s)
IU	Índices de úlcera

Kg	Kilogramos
LTB	Leucotrienos
LIC	Límite inferior confiable
LSC	Límite superior confiable
msnm	Metros sobre el nivel del mar
mg	Miligramos
mm ²	Milímetros cuadrados
min	Minutos
OMS	Organización mundial de la salud
NO	Óxido nítrico
pH	Potencial de hidrógeno
%	Porcentaje
PGs	Prostaglandinas
RAM	Reacciones adversas a los medicamentos
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno
UP	Úlcera péptica
Z _{ad}	Zeta teórica
Z _{ex}	Zeta experimental

1. Resumen

Actualmente los padecimientos gastrointestinales originados ya sea por la dieta o por las reacciones adversas, como lo son las úlceras pépticas, resultan ser un problema muy recurrente en el ambiente hospitalario y a las pocas alternativas para disminuir la prevalencia de estas enfermedades como lo son el uso del omeprazol es importante el seguir buscando alternativas y la generación de evidencia que sustente estas opciones es por ello que en este trabajo se evalúa al ácido 3 α -hidroximasticadienónico (3 α -OH-MDA) y la diligustílida (DLG) ya que estos son compuestos aislados de las plantas *Amphiptherygium adstringens* y *Ligusticum porteri*, respectivamente y que son utilizadas en la medicina tradicional mexicana por sus propiedades terapéuticas a nivel gástrico. En estudios previos, estos compuestos han logrado demostrar una actividad gastroprotectora relevante en otros modelos de daño gástrico como son etanol e indometacina. Sin embargo, el comportamiento entre estos compuestos ante diferentes AINE podría ser diferente debido a la gran variedad de estructuras que componen este grupo farmacológico que podrían tener algún tipo de interacción con los compuestos o con los mecanismos implicados. Debido a esto, en el presente trabajo se evaluó la actividad gastroprotectora de dichos compuestos de manera individual en un modelo murino de daño gástrico inducido con diclofenaco, además de la evaluación de la interacción farmacodinámica de su combinación en dicho modelo.

Para este trabajo, se emplearon ratas Wistar con administración vía oral, se determinó la dosis ulcerogénica de diclofenaco, con la finalidad de poder contar con una dosis ulcerogénica, para así, evaluar el efecto gastroprotector de los compuestos, cada

compuesto se administró y evaluó de forma individual, así como en combinación en 3 diferentes proporciones. Después de 6 h de la producción de la úlcera de diclofenaco se evaluó el área de lesiones gástricas, mediante un software que nos permite medir el área de daño.

Los compuestos administrados de manera individual mostraron un efecto gastroprotector significativo ($p < 0.05$), al disminuir las lesiones gástricas observadas en comparación con el grupo dañado con diclofenaco a dosis ulcerogénica (51 mg/Kg). Las dosis efectivas 50 (DE_{50}) individuales de los extractos fueron 3.85 ± 1.47 mg/Kg para el ácido 3 α -hidroximasticadienónico y de 4.59 ± 1.62 mg/Kg para diligustílida. Mientras que la combinación de 3 α -OH-MDA con DLG en las proporciones empleadas, 1:1, 1:3 y 3:1, mostraron una disminución significativa de las lesiones gástricas comparadas con el grupo dañado con diclofenaco ($p < 0.05$), donde las DE_{50} de cada combinación fueron 3.27 mg/Kg, 3.93 mg/Kg y 0.91 mg/Kg, respectivamente. El análisis isoblográfico mostró que, la combinación en las proporciones 1:1 y 1:3 se presenta una interacción de tipo aditiva; mientras que en la proporción 3:1 la interacción es de tipo sinérgica. Basados en la prueba de significancia de las magnitudes respectivas. Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren el potencial uso de la combinación 3 α -OH-MDA con DLG como una estrategia derivada de productos naturales para disminuir el daño asociado al uso crónico de los AINE.

2. Introducción

El uso irracional de medicamentos a lo largo de la vida diaria de la población puede llevar a los consumidores a experimentar la aparición de Reacciones Adversas a los Medicamentos (RAM),¹ de entre las cuales suelen destacar los efectos gastrointestinales (GI) como la dispepsia y complicaciones tales como: lesiones ulcerosas, hemorragias gastrointestinales, perforaciones e incluso la muerte del paciente, provocados principalmente por el consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINE).²

Los AINE se sitúan entre las medicaciones más frecuentemente utilizadas a nivel mundial, esto debido a que son fármacos de venta libre para el público, tienen bajo costo, y poseen propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas que pueden utilizarse con alta efectividad para enfermedades crónicas, como es el caso de la osteoartritis, artritis reumatoide o la hipertensión.^{2, 3, 4} Tales beneficios pueden desencadenar un incremento en su consumo no regulado y/o por periodos prolongados,⁴ que a su vez implica un riesgo enorme, además, sumado a factores como ser mayor de 65 años, presentar comorbilidades graves y el tener antecedentes de úlcera péptica o infección por *Helicobacter pylori*, originan complicaciones gastroduodenales severas.^{3, 4}

Es el aumento de estas enfermedades en el tracto GI lo que ha captado la atención de los profesionales de la salud, pues además de las RAM, existen otros factores como las infecciones por patógenos, el consumo de agentes irritantes como alcohol, tabaco y comida picante, el aumento de estrés, la exposición a quimioterapia y radioterapia que son responsables de este incremento de enfermedades GI.^{3, 4}

En México las gastropatías como las úlceras pépticas, la gastritis y la duodenitis, están posicionadas como una de las principales causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte,⁵ ya que, de acuerdo con datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE, 2019)⁶, son consideradas uno de los principales problemas de salud pública en nuestro país, debido a que constituyen una causa importante de morbi-mortalidad. La gastropatía por AINE prevalece en un 70% entre las causas más habituales asociadas a estas enfermedades GI en México, mientras que el 40% de los pacientes tratados con AINE presentarán síntomas referidos al tracto gastro intestinal (GI) alto durante el tratamiento; siendo los más frecuentes el reflujo gastroesofágico y los síntomas dispépticos.⁷

El tratamiento actual para las gastropatías se divide en tres vertientes la co-prescripción de agentes supresores del ácido gástrico, el uso de análogos de prostaglandinas y el uso de inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2 (COX-2)^{8, 9}. Estas co-terapias comienzan a estar en desuso por múltiples causas como es el caso de la ranitidina (agentes supresores del ácido gástrico) que debido a su potencial contenido de nitrosamida, un agente cancerígeno, fue retirado del mercado por la FDA en abril 2020.¹⁰ Mientras que en el caso del omeprazol (un inhibidor de la bomba de protones), se ha reportado que si bien disminuye úlceras gástricas, puede incrementar las úlceras en duodeno, además de otras RAM.^{11, 12} Por otra parte, el misoprostol (análogo de prostaglandinas) solo se utiliza en situaciones muy particulares ya que es un potencial abortivo.^{4, 8} Finalmente el uso de inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) queda limitado por sus potenciales RAM a nivel cardiovascular por lo que se restringe su uso.⁸ En este contexto, es primordial la búsqueda de nuevas terapias y para ello el estudio de compuestos derivados de la

medicina tradicional mexicana es un camino potencial para su uso como terapias alternativas.¹²

La Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve activamente la importancia en el conocimiento y utilización de la medicina tradicional,¹³ sin embargo, este tipo de prácticas son poco utilizadas en el campo clínico, debido a una falta de evidencia en modelos experimentales que sustenten su uso. En México existe una amplia variedad de plantas con uso medicinal, entre ellas *Ligusticum porteri* y *Amphitherygium adstringens Schiede ex Schlech* utilizadas para el tratamiento empírico de diversos padecimientos de los cuales destacan las enfermedades del tracto gastrointestinal. Recientemente, se han identificado y aislado los principales compuestos de acción biológica de dichas plantas; el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (3 α -OH-MDA) y la diligustílica (DLG), respectivamente, los cuales se han estudiado en modelos de daño gástrico con etanol e indometacina, solos y en combinación.¹⁴ Sin embargo, el comportamiento de un compuesto puede variar en el modelo de daño, por ello el presente proyecto plantea estandarizar el modelo de daño gástrico agudo con diclofenaco, la evaluación individual de cada compuesto en este modelo y evaluar el efecto gastroprotector de la combinación de dichos compuestos para realizar un análisis de la interacción farmacodinámica de estos.

3. Marco teórico

3.1. El estómago

3.1.1. Fisiología

El estómago forma parte del tracto gastrointestinal, siendo continuación del esófago y conectándose distalmente con duodeno, su extensión vertebral generalmente es desde la 10ª vértebra dorsal hasta la 1ª vértebra lumbar.¹⁵ Fisiológicamente está encargado de procesar mediante la acción de enzimas (pepsina, gelatinasa, lipasas) y ácido clorhídrico los alimentos para que sean absorbidos con mayor facilidad en intestino delgado.

Fisiológicamente presenta 4 regiones (Fig. 1):

- El cardias, es relativamente pequeño, siendo la unión entre el esófago y el estómago.
- Fondo, es la parte superior del estómago.
- El cuerpo, es la continuación del fondo y el área más larga, abarcando hasta el tercio inferior, donde se identifica la incisura angular para continuar con
- El antro, el cual determina la parte final del estómago. Cuenta con 2 bordes: el derecho, correspondiendo a la curvatura menor y el izquierdo a la curvatura mayor.¹⁶

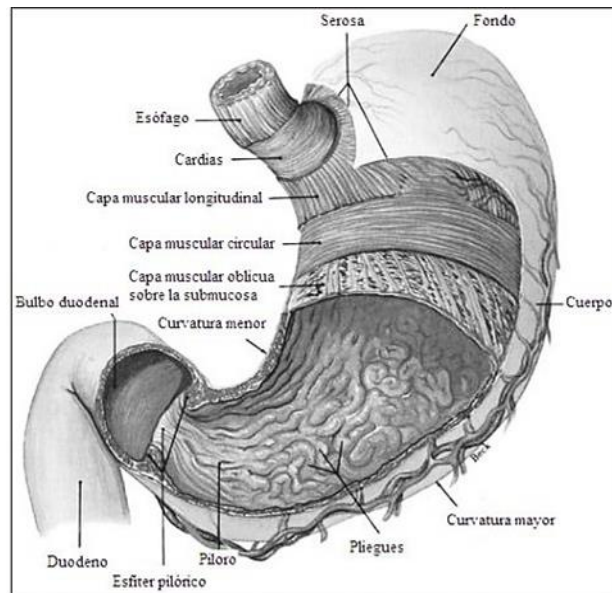


Figura. 1. Regiones anatómicas del estómago y capas musculares.¹⁶

En cuanto a la histología, la pared del tubo digestivo consiste en 4 grandes capas, las cuales se encuentran dispuestas del lumen al exterior de la siguiente manera: mucosa (formada por glicoproteínas, bicarbonato, lípidos y agua), submucosa (tejido conjuntivo que contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras nerviosas), muscular externa y serosa.^{9, 15}

A lo largo de la mucosa en todo el estómago encontramos varios tipos de glándulas, por ejemplo, el cardias es en donde se encuentran glándulas secretoras de moco; al fondo y cuerpo del estómago se les denomina “segmento secretor de ácido”, ya que contiene glándulas parietales, células parietales, células cimógenas (secretoras de ácido), factor intrínseco, pepsinógeno y enzimas gástricas; por último el antro y el píloro, que contienen glándulas pilóricas compuestas por células G productoras de gastrina, células endocrinas y mucosas.^{9, 16, 17}

3.1.2. Irrigación sanguínea e inervación del sistema gástrico

El estómago es un órgano ricamente irrigado, su irrigación se encuentra alimentada por 5 arterias importantes: La arteria gástrica izquierda, encargada de la irrigación de

la porción cefálica y curvatura menor; la arteria gástrica derecha, irrigando la porción caudal y curvatura menor; la arteria gastroepiploica derecha, irrigando la parte baja del cuerpo y antro; la arteria gastroepiploica izquierda, que irriga la parte superior del cuerpo y por último, las arterias cortas gástricas, que irrigan el fondo, parte cefálica del cuerpo.^{16, 18}

La inervación simpática del estómago procede de las fibras preganglionares provenientes de nervios desde la columna vertebral T6-T8, haciendo sinapsis con el ganglio celíaco y luego por medio del plexo celíaco al estómago. La inervación parasimpática por medio del tronco de los nervios vagos derecho e izquierdo cerca del cardias que contiene fibras preganglionares aferentes viscerales (Fig. 2).^{16, 18}

3.1.3. La gastroprotección y sus mecanismos

La mucosa gástrica se encuentra permanentemente expuesta a los ataques constantes por parte de múltiples agentes endógenos, tales como el ácido clorhídrico, pepsina, ácidos biliares y enzimas pancreáticas, así como por parte de otros agentes exógenos como alcohol, fármacos, bacterias o alimentos irritantes y de condiciones inflamatorias (Colitis y enfermedad de Crohn).⁹ Aun así es capaz de mantener su integridad anatómico-funcional gracias a un complejo sistema de mecanismos de defensa y reparación a la mucosa conocido como citoprotección, mediada por el moco y moléculas como bicarbonato, óxido nítrico (NO), fosfolípidos de membrana y de las prostaglandinas,⁹ las cuales no solo están encargadas de reparar la mucosa, sino también el daño en otros órganos como el hígado,^{15, 16, 19, 20} estos mecanismos tienen como objetivo el mantener la homeostasia de la mucosa y pueden ser divididos según

la zona de la capa gástrica en la que se producen como pre-epiteliales, epiteliales y post-epiteliales (Fig. 2).²¹

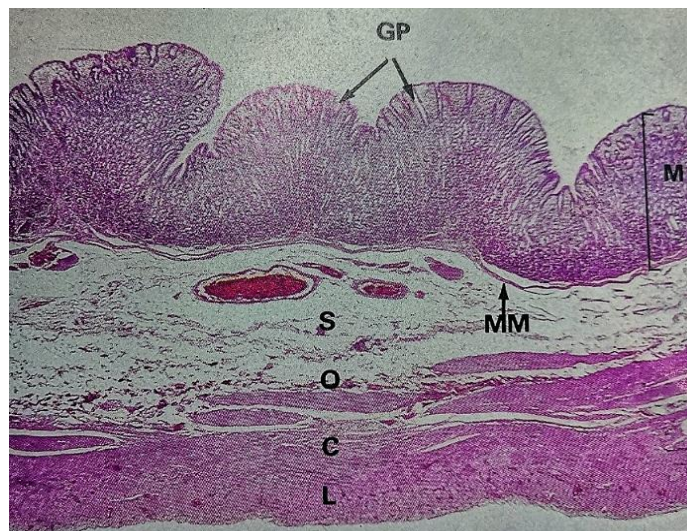


Figura. 2. Conformación del cuerpo del estómago: fositas gástricas (GP), mucosa (M), muscularis mucosa (MM), submucosa (S), capa interna oblicua (O), capa muscular interna (C), capa muscular externa (L).²¹

La mucosa gástrica posee como primera barrera fisiológica al moco o mecanismo preepitelial, el cual recubre las células epiteliales en dos capas (Fig. 3), la primera capa, el moco visible o capa interna, cuyas moléculas de glicoproteína se encuentran entrelazadas por puentes de disulfuro, confiriéndole una consistencia extremadamente viscosa y con la capacidad de expansión al hidratarse, está conformada por una alta concentración de bicarbonato para mantener el pH neutro (7.0); y la capa de moco soluble o capa externa con una consistencia menos viscosa, debido a la falta de enlaces disulfuro, esta capa se encarga de la liberación de óxido nítrico y de la unión de agentes nocivos, ya que es la que se desprende y mezcla con los alimentos.^{9, 20}

Las células epiteliales de superficie son las encargadas de mantener el pH intracelular y producir prostaglandinas E2, así como proteínas de choque térmico.^{9,17} Estas

últimas tienen la función de proteger a las células de aumentos de temperatura, agentes citotóxicos y estrés oxidativo al desnaturalizar a las proteínas.^{21, 22}

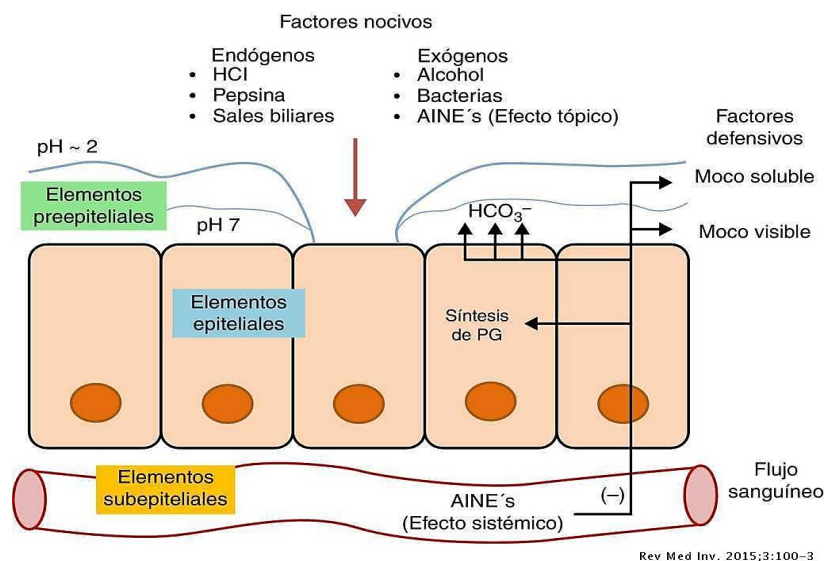


Figura. 3. Mecanismos defensivos y factores agresivos de la mucosa gástrica.^{9, 22}

Por último, en los mecanismos sub-epiteliales encontramos el flujo sanguíneo y la microvasculatura subepitelial mucosa, la cual está conformada de células endoteliales y una serie de factores vasodilatadores, entre los que se encuentra el NO.^{21, 22}

Si bien, el proceso de gastroprotección es complejo e involucra diversos agentes para su homeostasis, se pueden dividir en 3 tipos de factores (Tabla 1).¹⁷

Tabla 1. Factores que regulan la gastroprotección.¹⁷

Factores funcionales	Factores neuronales	Factores humorales
<ul style="list-style-type: none"> • Motilidad • Producción de moco • Secreción de bicarbonato • Microcirculación sanguínea 	Neuronas sensibles a capsaicina y la liberación de neuropéptidos como la sustancia P, calcitonina y neurocinina	<ul style="list-style-type: none"> • Prostaglandinas (PGs) locales • Óxido nítrico (NO) • Sulfuro de hidrógeno (H₂S) • Glutación (GSH)

El NO es un radical reactivo que actúa como un importante señalizador oxidativo biológico en una gran variedad de procesos fisiológicos.^{17, 18} Dentro del sistema GI, el NO tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad de la mucosa, ya sea provocando vaso relajación o promoviendo la síntesis de prostaglandinas, las cuales se ven involucradas en diferentes puntos del mecanismo como en el dolor.^{22,}
19

El sulfuro de hidrógeno (H₂S). Un vasodilatador endógeno, antiinflamatorio, neuromodulador y mediador de la reparación de tejidos dañados en el sistema GI, protegiendo a la mucosa de las erosiones inducidas por etanol, pues los grupos sulfhidrilos son citoprotectores de la mucosa gástrica e influyen en la permeabilidad de la membrana y atrapamiento de radicales libres.^{22, 23}

Por último, el glutatión (GSH). Un tiol ubicuo, está involucrado en muchas funciones celulares y se considera que participa en el mantenimiento de la integridad de la mucosa. En los mecanismos de defensa del estómago, el GSH mejora la resistencia contra el estrés oxidativo al eliminar el superóxido y prevenir la autooxidación irreversible de los grupos SH de las proteínas.¹⁷

Cuando estos mecanismos de protección se ven modificados, interrumpidos, fallan, etc, se provocan daños en la mucosa provocando diversas patologías en el estómago.

3.1.4. Patologías del estómago

En determinadas condiciones, el estómago presenta enfermedades que tienen origen en muchas y variadas causas, una de estas patologías es la gastritis, que es una enfermedad inflamatoria aguda o crónica de la mucosa gástrica, producida por factores exógenos y endógenos que provoca síntomas dispépticos atribuibles a la

enfermedad y cuya existencia se sospecha clínicamente, se observa endoscópicamente y requiere confirmación histológica, cuando la gastritis no es tratada de forma adecuada, puede progresar y provocar una ulceración.^{21, 24, 25}

3.1.4.1. Úlcera péptica

La úlcera péptica (UP) se refiere a una lesión del tracto digestivo causado por el ácido péptico¹ se define como la pérdida de continuidad de la mucosa gástrica que puede incluso llegar a la capa muscular.^{25, 26} Es resultado de un desequilibrio entre factores que protegen la mucosa y factores etiológicos (Fig. 4). Las úlceras pépticas pueden tener distintos niveles de profundidad, consisten en un área de daño de 5 mm o más, en la pared gástrica o duodenal, que se extiende más allá de la mucosa y que persiste por la actividad de la secreción ácida gástrica pudiendo en ocasiones llegar incluso a dañar la capa muscular. No obstante, en algunos casos las úlceras se pueden complicar en forma de hemorragia o perforación, obstrucción gastrointestinal e incluso la aparición de neoplasias.²⁴ Lo que repercute en tratamiento endoscópico, quirúrgico e incluso el deceso del paciente.^{12, 24} Algunos de los factores protectores son amortiguación del ácido clorhídrico, prostaglandinas (PGs) citoprotectoras, respuesta inmunitaria y cicatrización de la herida. Los factores nocivos comprenden actividad ácido-péptica, se distinguen en el flujo sanguíneo gastroduodenal, inflamación, alcohol, especies reactivas derivadas del oxígeno, infección por *Helicobacter pylori* y empleo de AINE.^{9, 24, 25, 26}

Factores etiológicos de las úlceras pépticas	
Factores endógenos	Infecciones por <i>Helicobacter pylori</i> Aumento de acción del nervio vago Disminución del efecto del sistema nervioso simpático Estrés, ansiedad, depresión
Factores exógenos	Fármacos (AINES) Edad Dietas inapropiadas Falta de higiene Intoxicaciones por alcohol

Figura. 4. Factores etiológicos responsables de la aparición de úlcera péptica.²⁷

3.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

Estos conforman un extenso grupo de fármacos con estructuras químicas variadas y no necesariamente relacionadas entre sí, poseen propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias, la población diana de este es robusta, ya que están indicados en una amplia variedad de padecimientos que, a su vez, presentan una alta prevalencia.²⁸ Por tanto, constituyen uno de los grupos farmacológicos más utilizados y de mayor consumo.²⁹ Históricamente, los AINE tienen su lugar en el grupo terapéutico contra el dolor por sus propiedades, ya que inhiben la producción de sustancias proinflamatorias, mediante el bloqueo competitivo, reversible o no, de ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2) al ácido araquidónico, por acetilación del sitio de unión impidiendo de esta manera la conversión oxidativa en prostaglandina G2 y H2 y toda la cascada subsecuente (Fig. 5).^{11, 24, 29}

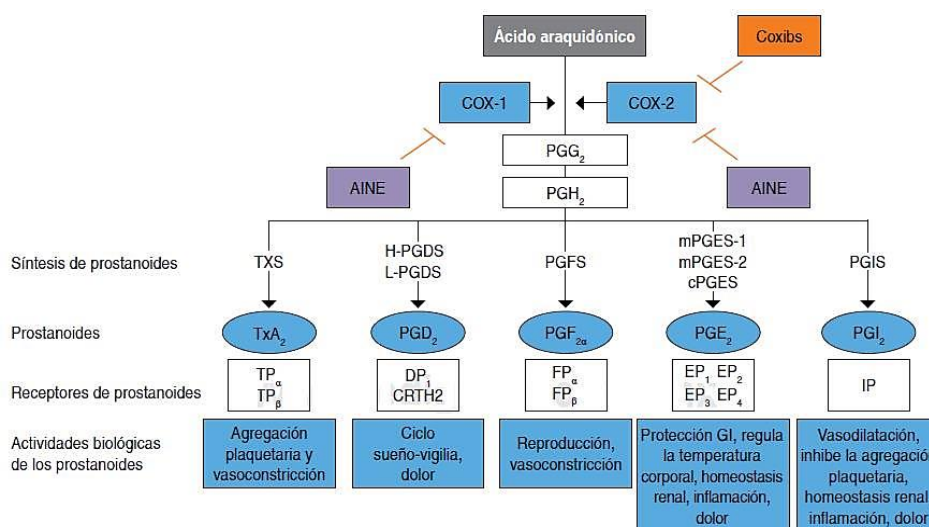


Figura 5. Ácido araquidónico como precursor de los prostanooides proinflamatorios.²⁹

Debido a sus variadas estructuras químicas, se pueden clasificar en ácidos o no ácidos, esta clasificación permite conocer su capacidad de distribución, es decir, los AINE no ácidos como celecoxib se distribuirán en todos los tejidos corporales, y por el contrario, aquéllos con grupos ácidos como diclofenaco, ketoprofeno e ibuprofeno tienden a distribuirse y permanecer en los sitios de inflamación.²⁹ Por otro lado, los AINE se pueden clasificar por su estructura funcional tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de los AINE por su estructura.³⁰

Clasificación ¹⁵	Mecanismo	Ejemplos
Salicilatos	Inhibición irreversible de la COX plaquetaria por medio de acetilación. Pueden producir trastornos gastrointestinales y nefritis.	Ácido acetilsalicílico, Acetilsalicilato de lisina, Sulfalacina, Salicilamida
Pirazononas	Inhibición competitiva de la COX. Incidencia de trastornos hematológicos, leucopenia, aplasia medular y efectos adversos gastrointestinales.	Dipirona, Fenilbutazona, Pirazinobutaona,

			Oxifenbutazona
Paraminofenol	Inhibición selectiva de la COX. Menos incidencia de lesión gástrica.		Fenacetina Paracetamol
Indoles	Unión e inhibición específica de COX-1. Efectos adversos renales y GI frecuentes.		Indometacina, Benzidamina,
Ácido acético	Arilacéticos o fenilacéticos	Similar a las pirazonas.	Diclofenaco, Aceclofenaco
	Pirrolacético		Ketorolaco, Tolmetina
	Piranoacético	Inhibición principalmente de COX-2.	Etodolac
Fenamatos o arilantranílicos	Inhibición reversible y competitiva de la COX.		Ácido mefenámico, Flufenamico
Derivados del ácido propiónico	Similar a los salicilatos.		Ibuprofeno, Ketoprofeno, Naproxeno
Oxicames	Similar a las pirazonas con larga vida media. Meloxicam es un inhibidor selectivo de COX-2. Menos efectos GI.		Piroxicam, Meloxicam, Sudoxicam, Isoxicam
Derivados del ácido nicotínico	No está determinado.		Clonixinato de lisina,
Derivados de naftilalcanonas	Inhibidor selectivo de COX-2.		Nabumetona
Derivados de ácidos heterocíclicos	No está determinado.		Oxaprozin
Derivados de la sulfonamida	Inhibidor selectivo de COX-2. Menores efectos adversos GI.		Nimesulida

3.2.1. Diclofenaco

A nivel mundial el diclofenaco (Fig.6.) es el AINE más recetado con un 43.40%,³¹ posicionándose en el octavo lugar de los medicamentos más vendido.³² Es un AINE derivado del ácido fenilacético, considerado como un inhibidor no selectivo de la COX, posee principalmente una actividad analgésica y antipirética. Se absorbe a nivel gastrointestinal y sus concentraciones plasmáticas máximas se detectan dentro de las 2 horas, su vida media de eliminación es de 1.5 horas ya que se metaboliza principalmente en hígado y se excreta por orina y bilis. La principal indicación clínica es como tratamiento para el manejo del dolor de leve a moderado en condiciones como la dismenorrea, la inflamación ocular, la osteoartritis, la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante y la queratosis actínica; siendo tan efectivo como aspirina, indometacina, ibuprofeno, ketoprofeno y naproxeno.^{33, 34}

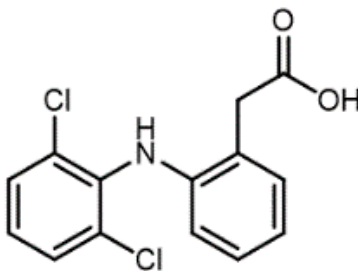


Figura. 6. Estructura química del diclofenaco

Existe evidencia de que mecanismos adicionales independientes de prostaglandinas están involucrados en el mecanismo de acción antinociceptivo del diclofenaco tanto a nivel periférico como central. En este sentido, se reporta que el diclofenaco abre los canales de K⁺ sensibles a ATP además de regular a la baja nociceptores periféricos por estimulación de la vía L-arginina-ON-GMPc.^{35, 36} Como resultado de la apertura del canal de potasio, el potasio se escapa de la neurona dando como resultado una

hiperpolarización y una excitabilidad reducida. Los efectos antipiréticos pueden deberse a la acción sobre el hipotálamo, lo que resulta en dilatación periférica, aumento del flujo sanguíneo cutáneo y posterior disipación de calor. Entre otros efectos del diclofenaco encontramos el bloqueo de los canales de sodio, calcio y potasio dependientes de voltaje, mecanismo por el cual causa analgesia sin la inhibición de la formación de prostaglandinas.³⁴

Los efectos adversos están estrechamente relacionados con la susceptibilidad de cada persona y principalmente del tiempo de uso, el cual a su vez depende del objetivo terapéutico. Algunas de los efectos adversos destacables se manifiestan en el sistema gastrointestinal, hematológico, hepático, cardíaco, renal, sistema nervioso central y piel, por ejemplo, el uso prescrito normal de 3 - 5 días se relaciona con la inducción de dispepsia, esofagitis, náuseas, vómitos, cefaleas e hipercoagulabilidad; mientras que el uso crónico, de alrededor 90 días, puede inducir el desarrollo de hipertensión arterial, accidente cerebro vascular, infarto agudo al miocardio, hepatitis fulminante, hemorragias/úlceras gástricas, etc., además el síndrome de Steven-Johnson y la necrólisis epidérmica tóxica, son reacciones de hipersensibilidad relacionados con el tiempo de uso de este fármaco.³⁴

La toxicidad GI inducida por diclofenaco sódico es uno de los efectos secundarios más graves asociados con el uso de este medicamento y es particularmente evidentes en los ancianos, más su riesgo relativo no es tan alto como para otros AINE (Fig. 7).^{36, 37}

Debido a su vida media corta hace que el fármaco sea adecuado para preparaciones de liberación sostenida. Sin embargo, una preparación de liberación sostenida en realidad aumenta la exposición del tracto GI inferior al fármaco. En el caso de algunos

AINE, esta exposición prolongada aumenta los efectos secundarios en el intestino distal, donde las reacciones adversas pueden ser aún más graves y posiblemente mortales.

3.2.2. Daño gástrico causado por AINE

El daño en la mucosa gástrica inducida por estos fármacos puede deberse a dos mecanismos:

- El daño local, es decir, las alteraciones en la composición de la barrera de la mucosa gástrica, donde los AINE suelen disminuir cerca de un 70% la secreción basal de bicarbonato y bloquean completamente el incremento de la secreción del mismo, inducido por la producción excesiva de ácido clorhídrico.²²
- El daño sistémico, ya que las lesiones inducidas por la administración de AINE se deben principalmente al bloqueo de las enzimas ciclooxigenasas (COX), inhiben la síntesis de prostaglandinas que tienen una función protectora de la mucosa gástrica.³⁷

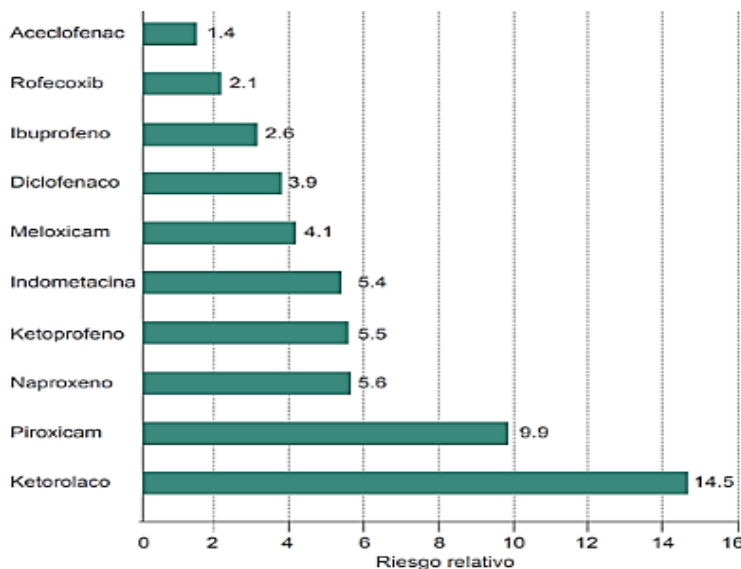


Figura. 7. Gráfica de comparación de riesgo de hemorragia digestiva alta inducida por AINE.³⁷

También se ven implicados factores como el aumento del tiempo de hemorragia y la posible disminución de la capacidad de eliminación de estos fármacos que producirían mayores concentraciones sanguíneas.¹⁶ Estos mecanismos dependen del tipo de AINE empleado y de su selectividad hacia las diferentes isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX).^{35, 38, 39} En el caso del diclofenaco el daño gástrico se genera un daño menos profundo, pero igual de extenso que el generado por la indometacina, sin embargo, el compromiso de la microcirculación, estrés oxidativo y activación del proceso inflamatorio es similar al reportado en modelos generados por indometacina.

Los AINE también han demostrado estimular el daño microvascular dependiente de neutrófilos y especies reactivas derivadas de oxígeno (EROS), mediante el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular que, al ser metabolizados por peroxidasas gástricas, causan daño de la mucosa a través de la oxidación de lípidos, proteínas y DNA, junto a un aumento de la apoptosis de las células epiteliales gástricas.^{19, 39}

El consumo de AINE es la segunda causa más frecuente de úlcera péptica, por detrás de la infección por *Helicobacter pylori*. El riesgo relativo depende del AINE que se use (Fig. 7) por lo tanto, los síntomas como el daño son variables, ya que puede cursar asintomático o manifestarse como anemia por deficiencia de hierro, hemorragia, estenosis y perforación. El espectro de lesiones puede variar desde el edema y eritema de la mucosa hasta la presencia de erosiones y úlceras.^{16, 37}

La cápsula endoscópica y la enteroscopia son métodos diagnósticos directos en la enteropatía por AINE.²⁴ Respecto a la prevención, se recomienda prescribir la dosis mínima necesaria de un AINE para obtener el efecto deseado y durante el menor

tiempo. Por último, los inhibidores de la bomba de protones representan el estándar de oro para la profilaxis y tratamiento de los efectos gastroduodenales¹², aunque ya se cuenta con estudios que demuestran eficacia para la prevención en la pre-administración de AINE.¹¹

Debido al reducido número de fármacos empleados para el tratamiento de daño gástrico inducido por AINE, la búsqueda de nuevas terapias alternativas para la gastroprotección incluye el aislamiento de compuestos derivados de plantas medicinales y su estudio en modelos animales de daño gástrico.⁴⁰

3.3. Plantas con uso medicinal

La OMS define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos más complejos, por lo que actualmente tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna.

México es un país de una gran riqueza biológica, diversidad de ecosistemas y variabilidad genética, donde se han registrado más de 4000 especies vegetales con atributos medicinales de los cuáles sólo se ha estudiado y caracterizado el principio activo del 5%,⁴¹ por lo que existe una gran oportunidad para el desarrollo de nuevas terapias basadas en el uso empírico de estas especies.

En épocas recientes ha resurgido el interés por la medicina herbolaria y el desarrollo de fármacos a partir de especies vegetales, ya que se estima que aproximadamente el 80% de las personas en regiones menos desarrolladas emplea plantas medicinales

para combatir diferentes dolencias, tales como los padecimientos gastrointestinales.^{13,}

41

3.3.1. Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (3 α -OH-MDA)

La corteza de *Amphipterygium adstringens*, conocida popularmente como “Cuachalalate” es ampliamente utilizada en México.^{42, 43} En la Medicina tradicional mexicana es útil en el tratamiento de la úlcera péptica y otros problemas gastrointestinales, la decocción es la forma más común en la que es consumida, también se utiliza como “emplastos” preparados a partir del polvo o su resina como auxiliar en la cicatrización de heridas. Se han identificado a los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico (3 α -OH-MDA), masticadienónico y anacardicos como los principales componentes activos en esta planta.⁴³

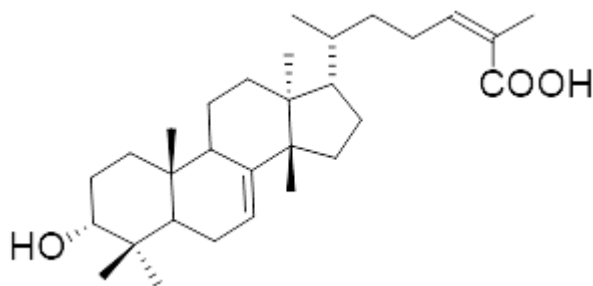


Figura. 8. Estructura del ácido 3 α -hidroximasticadienónico

El ácido 3 α -hidroximasticadienónico (3 α -OH-MDA) (Fig. 8) es un triterpeno, cuyo principal mecanismo en la gastroprotección, es el aumento en la secreción de moco en lugar de la inhibición de la secreción de HCl. Este efecto gastroprotector está referido por la presencia de un grupo hidroxilo libre en el Carbono-3.⁴³

3.3.2. Diligustílida (DLG)

Tradicionalmente las raíces de *Ligusticum porteri*, conocido como “Chuchupate” han sido utilizadas en decocción, para tratar síntomas gastrointestinales, dolores de cabeza, fiebre y en el tratamiento de enfermedades respiratorias.³⁶ A partir de esta planta se han logrado aislar diferentes compuestos entre los principales se encuentra la diligustílida (DLG) (Fig. 9), de la cual recientemente se ha descrito su eficacia como gastroprotector en las lesiones inducidas por etanol e indometacina, y se ha sugerido que su actividad antiulcerosa depende de la participación de los grupos -SH no proteicos involucrados en esta gastroprotección.⁴⁴ Los reportes encontrados acerca de la diligustílida (DLG) indican que mantiene los niveles de glutatión, evita la formación de nitritos (sugiriendo la actividad de este metabolito como agente antioxidante), promueve la liberación de sulfuro de hidrógeno y mantiene estables los S-nitrosotioles como mecanismo de acción gastroprotector en el modelo de daño gástrico provocado por el etanol.⁴⁵

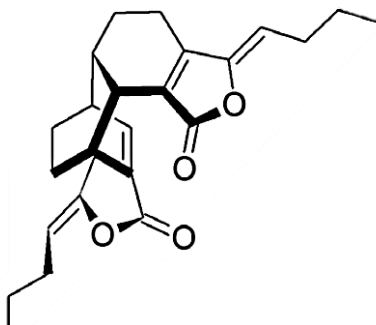


Figura. 9. . Estructura de la diligustílida.⁴⁵

3.4. Análisis para medir el efecto gastroprotector

Para el estudio de la úlcera péptica es necesario contar con modelos experimentales *in vivo* que permitan hacer comparaciones con la anatomía y fisiología humana, y que faciliten la búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y resolución de esta patología.⁴⁶

Los modelos de experimentación en animales (*in vivo*) suelen agruparse de acuerdo con el tiempo en que producen úlceras (aguda o crónica) y en la distribución de estas, localizada o diseminada.⁴⁶ 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.⁴⁷ Entre los modelos de ulceración más utilizados están aquellos en los que se realizan manipulaciones fisiológicas, farmacológicas o quirúrgicas, empleando diferentes especies animales. Sin embargo, la mayoría de los modelos de ulceración se llevan a cabo en ratas o ratones.⁴⁷ 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, etc.^{46, 47, 48}

Los AINE constituyen el modelo de úlcera más utilizado en los estudios antiulcerosos debido a que son la segunda causa más frecuente de esta patología debido a el abuso en su consumo, además resultan importantes para la investigación de la utilidad de agentes potencialmente antiseoretos y citoprotectores, ya que la fisiopatología

subyacente implica la secreción de ácido gástrico y la síntesis de prostaglandinas en la mucosa.⁴⁷

En el presente proyecto se plantea la evaluación los compuestos obtenidos de *Amphipterygium adstringens* y de *Ligusticum porteri*, el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (3 α -OH-MDA) y la diligustílida (DLG), respectivamente. Tanto de manera individual como en combinación, en un modelo de daño gástrico agudo por diclofenaco en ratas Wistar; mediante el análisis macroscópico de las lesiones en estómago, obteniendo sus respectivas DE_{50} , así como realizar un análisis isobolográfico, que nos permita evaluar su interacción farmacodinámica.

3.4.1. Análisis isobolográfico

El análisis isobolográfico es una herramienta que nos permite evaluar las proporciones de dos compuestos biológicamente activos, en comparación con su actividad individual, donde estos compuestos pudieran tener un efecto similar. Mediante este análisis se puede determinar de manera más gráfica si el efecto es mayor (superaditivo), menor (subaditivo) o igual (aditiva); además que este método nos permite observar y analizar las interacciones entre dos fármacos con la finalidad de evaluar el riesgo-beneficio cuando estos se administran de manera concomitante. En el caso de este trabajo también resulta de utilidad para evaluar la interacción entre dos compuestos de origen natural, definir cuál es su interacción y comprobar que la combinación sea efectiva en el modelo de daño con diclofenaco.

El isobolograma es la representación gráfica de la comparación de dos xenobióticos (*A* y *B*), donde se emplean las dosis equi-efectivas de cada compuesto a analizar (*DA*

y DB), es decir, la dosis efectiva 50 (DE_{50}) respectiva de cada uno, las cuales se unen por una línea llamada “línea de aditividad” o “de no interacción”, pero es mejor conocida como isobola. Esta isobola representa la DE_{50} de cualquier proporción probada (1:1, 1:3 o 3:1), está representada como Z_{ad} (concentración teórica) y es la línea en donde no existe algún tipo de interacción que potencialice o disminuya el efecto de la combinación, esto quiere decir que sobre esta línea solo se encuentran las concentraciones que representan la suma del efecto de cada componente individual, probados en la combinación, esto partiendo de los ejes “X” y “Y” (da y db); La Z_{ex} , será entonces el resultado, la DE_{50} experimental de cada proporción, esta Z_{ex} nos brindará la información acerca de la magnitud y el tipo de interacción (sinérgica, aditividad, etc.) con tan solo observar si Z_{ex} se encuentra sobre la isobola o por debajo de ella, tal y como se puede observar de manera gráfica en la Fig. 10.

La ecuación que representa la relación entre las combinaciones es:

$$\frac{da}{DA} + \frac{db}{DB} = 1$$

Ec. 1.

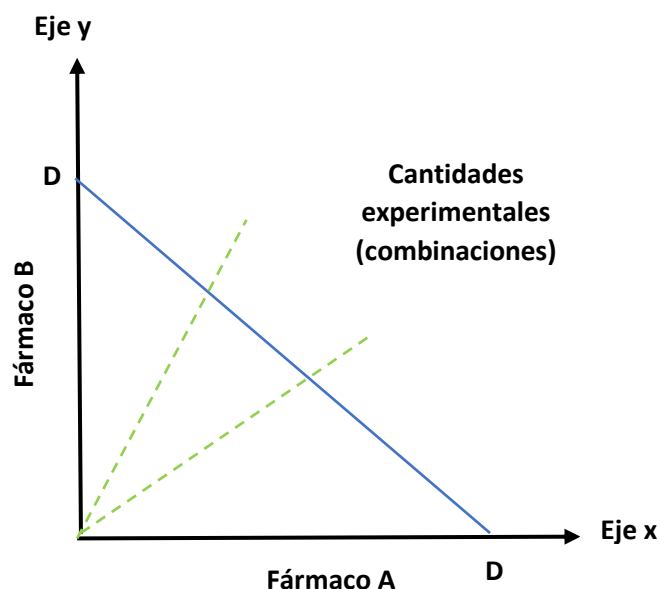


Figura. 10. Isoblograma

La línea causada por la Z_{ex} expresa la magnitud de la interacción y el tipo de comportamiento dependiendo de su forma. Existen 3 posibles casos:

- Si la línea es recta, como se muestra en la Fig. 10, el valor de la ecuación se aproxima a 1 y se dice que el efecto es aditivo, ya que no se produce una interacción.
- Si la línea es cóncava, el resultado de la ecuación será un número menor que 1, lo que indica una interacción de sinergia y,
- Si el isobolo es convexo sugiere un antagonismo y se verá con un resultado mayor a 1 en la ecuación.^{49, 50, 51}

4. Planteamiento del problema

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) relacionadas con el uso de AINE, especialmente de origen gastrointestinal como la producción de úlceras y hemorragias, han puesto de manifiesto que la población mayor de 60 años tiene un riesgo 5 veces mayor de toxicidad gastrointestinal por estos fármacos, resultando en la hospitalización o incluso la muerte del paciente. El 25% de los pacientes que consumen AINE de forma crónica pueden desarrollar enfermedad ulcerosa péptica y entre un 2 al 4% hemorragia y perforación.⁵² En general, al menos del 10 al 20% de los pacientes usuarios de AINE presentan dispepsia, aunque la prevalencia puede variar entre el 5 y el 50%.^{4, 53}

Los tratamientos que se han empleado para la úlcera gástrica por AINE como la ranitidina (fuera del mercado), misoprostol y el omeprazol, presentan RAM como abortivos, e incluso riesgo en el desarrollo de tumores, lo que los hace poco efectivos para la población y la necesidad de contar con más alternativas que puedan resultar seguras nos demanda mayor producción de evidencia y los tratamientos naturales resultan atractivos para este fin.

El uso milenario de plantas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades del tracto gastrointestinal resulta una opción atractiva para el desarrollo de nuevos fármacos. Sin embargo, la mayoría de las plantas utilizadas no cuenta con evidencia científica. Este proyecto plantea demostrar el posible efecto gastroprotector del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (3 α -OH-MDA) y diligustílida (DLG) en un modelo de daño gástrico inducido con diclofenaco en rata y a su vez generar mayor evidencia

científica que respalde el uso de estos compuestos ya sea de manera individual o en combinación.

5. Hipótesis

La administración de ácido 3 α -hidroximasticadienónico y diligustílida de manera individual y en combinación presentarán un efecto gastroprotector en el modelo de daño gástrico generado por diclofenaco, donde la combinación probada presentará una interacción farmacodinámica de tipo sinérgica.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Evaluar la actividad gastroprotectora de la combinación de ácido 3 α -hidroximasticadienónico y diligustílida utilizando el modelo experimental de daño gástrico por diclofenaco en ratas Wistar.

6.2. Objetivos particulares

- Evaluar la administración individual de diclofenaco en un modelo de daño gástrico mediante una curva dosis respuesta para determinar dosis ulcerogénica.
- Evaluar el efecto gastroprotector de la administración individual de ácido 3 α -hidroximasticadienónico en un modelo de daño gástrico inducido por diclofenaco en las ratas Wistar.
- Evaluar el efecto gastroprotector de la administración individual de diligustílida en un modelo de daño gástrico inducido por diclofenaco en las ratas Wistar.
- Determinar el tipo de interacción farmacodinámica del efecto gastroprotector de la combinación de ácido 3 α -hidroximasticadienónico y diligustílida por medio del análisis isoblográfico.

7. Diseño experimental

- **Tipo de estudio:** experimental, descriptivo, transversal y prospectivo.
- **Población de estudio:** ratas Wistar macho del Bioterio de la Facultad de Estudios Supiores Zaragoza, Campus 2.
- **Criterios de inclusión:** macho peso de 180 a 220 g.
- **Criterios de exclusión:** ratas que no pertenezcan a la cepa o peso determinados.
- **Criterios de eliminación:** ratas que presenten alguna herida o alteración antes o durante el experimento.

8. Material y métodos

8.1. Materiales, equipos e instrumentos

Balanza, equipo de disección, campos dentales, cajas Petri, jeringas de 1 mL (29 G x 13 mm), cámara de CO₂, cámara fotográfica de 12 MP (apertura de $f/1.8$ y estabilización óptica), centrifuga compacta (500-12,500 rpm, modelo Gusto de la Marca Heathrow) y equipo de cómputo con los programas de prueba ImageJ (versión 1.45) y Graphpad prism (versión 6).

8.2. Reactivos

Diclofenaco (15307-79-6), NaHCO₃ (3506-01), NaCl (7647-14-5) y Tween 80 (9005-65-6) adquiridos de Sigma-Aldrich y JT-Baker respectivamente. El 3 α -OH-MDA y la DLG fueron proporcionados por el L-126 de la Facultad de Química de la UNAM, los cuales fueron extraídos de la corteza de *Amphiteryium adstringens* y de las raíces de *Ligusticum porteri*, siguiendo los procedimientos descritos por Arrieta *et al.* (2003)⁴² y Velazquez-Moyado *et al.* (2015),⁴⁴ respectivamente. El 3 α -OH-MDA y la DLG fueron suspendidos en Tween 80 al 0.5% en solución salina (NaCl al 0.9%). Diclofenaco fue suspendido en solución salina. Todas las soluciones fueron preparadas inmediatamente antes de su uso.

8.3. Animales

Se utilizaron un total de 162 ratas macho Wistar (175-220 g de peso, 6-8 semanas) provenientes del Departamento de Bioterio de la Sección de Posgrado e Investigación de la FES Zaragoza, Campus II, del Centro de Producción UNAM-Envigo México, S.A. de C.V.

Los animales experimentales se mantuvieron en la sala asignada del Bioterio a temperatura constante $22 (\pm) 1$ °C y se sometieron a un ayuno de 12 h previo al experimento, se colocaron rejillas para evitar coprofagia, teniendo libre acceso al agua. Todos los grupos experimentales estuvieron conformados por 6 ratas. El protocolo fue sometido y aprobado por el Comité de Investigación y del Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (Registro FESZ-CE/22-115-12). El manejo y el cuidado de los animales, desde la crianza hasta el traslado y uso para este estudio, se realizaron conforme a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.⁵⁴

8.4. Metodología

8.4.1. Modelo experimental de daño gástrico por diclofenaco

Se llevó a cabo una curva dosis-respuesta del daño gástrico por diclofenaco a diferentes dosis, a partir de algunas modificaciones de la metodología descrita por Wallace and Vong (2008)⁵⁵, Navarrete *et al.* (2005)⁵⁶ y Pineda-Peña *et al.* (2019)⁵⁷, lo cual consistió en lo siguiente:

A grupos de 6 ratas Wistar macho de entre 175 y 220 g para cada dosis y en ayuno previo de 12 h y con libre acceso al agua, se les administró por vía oral y a través de una cánula metálica una dosis única de diclofenaco, a dosis de 10, 30, 56, 100 y 133 mg/kg, respectivamente; y el mismo volumen de vehículo (solución salina) a un grupo denominado como grupo basal. Después de 6 h de la administración, los animales se sacrificaron en cámara de CO₂ acorde a la NOM-062-ZOO-1999.⁵⁴

Cada animal experimental fue diseccionado para extraer el estómago, el cual se abrió por la curvatura mayor, fue lavado con solución salina, extendido completamente y se realizó un registro fotográfico. Posteriormente se realizó la evaluación macroscópica del daño gástrico mediante el análisis fotográfico del estómago utilizando el programa ImageJ (versión 1.45), el cual permitió la obtención del índice de úlcera (IU), medido en mm², es decir, la suma total de las áreas lesionadas por cada espécimen.^{58, 59, 60}

Con el análisis de los resultados obtenidos, se integró una curva dosis-respuesta que sirvió para elegir la dosis ulcerogénica (correspondiente a la DE_{50}) para realizar la evaluación de la seguridad de los extractos en este modelo.⁵¹

8.4.2. Evaluación de la seguridad gástrica de los compuestos 3 α -OH-MDA y DLG ante el daño gástrico generado por diclofenaco

A todos los animales de experimentación se les tuvo con un ayuno previo de 12 h y por vía oral se les administraron los compuestos aislados de plantas medicinales (el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (3 α -OH-MDA) y la digustílida (DLG), el omeprazol (fármaco de referencia), y los vehículos (Tween 80 al 0.5% y Sol. Salina, respectivamente) de manera individual, a volúmenes iguales y en cinco dosis diferentes (reportadas en la Tabla 3), 30 min después, se administró el diclofenaco a dosis ulcerogénica (51 mg/kg); 6 h posteriores de la administración de diclofenaco los animales fueron eutanizados en cámara de CO₂ y se les extrajo el estómago, el cual fue lavado en solución salina con el objetivo de tomar fotografías para ser analizadas de manera microscópica y poder medir las lesiones acorde a lo descrito en el punto 8.4.1. Una vez obtenidos estos valores en superficie (mm²), se calcularon los porcentajes de gastroprotección a partir de la *Ec.2*.⁶⁰

$$\%deGastroprotección = (IUC - IUT) \times \frac{100}{IUC} \quad \text{Ec.2.}$$

A partir del análisis de resultados se integraron las curvas dosis-respuesta individuales que sirven para calcular la dosis efectiva 50 (*DE*₅₀) de cada fármaco.

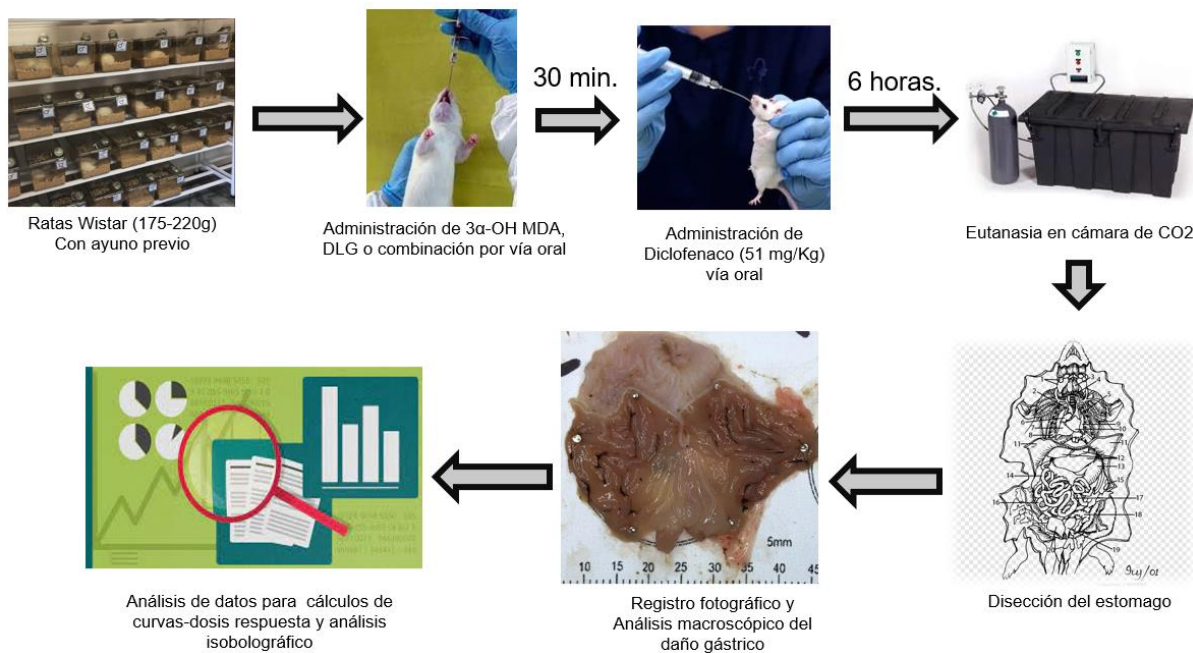


Figura. 11. Metodología general para la evaluación de 3α-OH-MDA, DLG o su combinación ante el daño gástrico por diclofenaco.

Tabla 3. Grupos de experimentación para la evaluación del efecto gastroprotector de la combinación de ácido 3α-OH-MDA con DLG ante el daño gástrico por diclofenaco.

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	
Basal (Solución salina 0.9% + Tween 80 al 0.5%)		
Curva de daño gástrico		
Diclofenaco	10	+ Diclofenaco (51 mg/Kg)
	30	
	56	
	100	
	133	
Curvas gastroprotección		
Ácido 3α-hidroximasticadienónico (3α-OH MDA)	0.333	+ Diclofenaco (51 mg/Kg)
	1	
	3	
	10	
	30	
Diligustílida (DLG)	0.333	+ Diclofenaco (51 mg/Kg)
	1	
	3	
	10	
	30	

8.4.3. Evaluación de la seguridad gástrica de la combinación de los compuestos 3 α -OH-MDA con DLG ante el daño gástrico generado por diclofenaco

Para la evaluación de la seguridad gástrica de la combinación del 3 α -OH-MDA con DLG ante el daño gástrico generado por diclofenaco se probaron las proporciones 1:1, 1:3 y 3:1 calculando dosis teórica (Z_{ad}) a partir de las DE_{50} individuales de estos extractos para obtener la dosis experimental (Z_{ex}), para obtener este dato se construyeron curvas dosis respuesta para cada una de las proporciones, para lo cual es necesario calcular 5 dosis teóricas, dichas dosis son correspondientes a los múltiplos $\frac{1}{4} Z_{ad}$, $\frac{1}{2} Z_{ad}$, Z_{ad} , $2 Z_{ad}$ y $4 Z_{ad}$.

Para propósitos de este trabajo la Z^* de los fármacos se denotarán como A y B respectivamente. Las cantidades en la combinación aditiva son $a = fA$ del fármaco A (Compuesto más potente, 3 α -OH-MDA) y $b = 1-fB$ del fármaco B (Fármaco menos potente, DLG), y para que esta sea una combinación aditiva debe cumplir con la relación pautada en la *Ec.1*.

La cantidad de la suma de estas dos cantidades es denominada como Z_{ad} y se expresa como:

$$Z_{ad} = fA + (1 - fB) \quad \text{Ec.3.}$$

Las proporciones (p) de cada fármaco en la mezcla estará dado por:

$$p(A) = \frac{fA}{Z_{ad}} \quad \text{Ec.4.}$$

$$p(B) = \frac{1 - fB}{Z_{ad}}$$

Ec.5.

Treinta minutos después de haber administrado a los diferentes grupos con las respectivas dosis de las combinaciones se les administró diclofenaco (a dosis ulcerogénica, 51mg/Kg), para generar el daño gástrico y 6 h después de la administración de diclofenaco los animales experimentales fueron sacrificados en cámara de CO₂ y se realizó el análisis macroscópico de las lesiones acorde a lo descrito en los puntos anteriores y utilizando la Ec.2. El procedimiento experimental se explica en la Fig. 11.

8.4.4. Análisis Isoblográfico o análisis de los datos de la combinación de 3α-OH-MDA con DLG.

En cada una de las curvas dosis respuesta, se realizó una regresión lineal, para así obtener la ecuación de la recta ($F(x)=mx+b$), donde las ordenadas toman los valores del porcentaje de respuesta y las abscisas los logaritmos de las dosis, por lo que, para la obtención de la DE_{50} se despeja la ecuación de tal manera que:

$$DE_{50} = \frac{50 - b}{m} \text{ ó } DE_{50} = \frac{0.5 - b}{m}$$

Ec.6.

Donde m es la pendiente y b la ordenada al origen, cada una de las dos se utiliza según la naturaleza de los datos utilizados, ya que la primera es para datos porcentuales y la segunda para datos decimales, de igual manera se calculó sus límites de confianza al 95% utilizando las fórmulas:

$$\text{Límite superior confiable (LSC)} = DE_{50} + (t_{\alpha=0.05}) (EEM(DE_{50}))$$

$$\text{Límite inferior confiable (LIC)} = DE_{50} - (t_{\alpha=0.05}) (EEM(DE_{50}))$$

Donde el Valor de $t_{(\alpha=0.05, g|=16)} = 2.1199$.

Siendo las DE_{50} la dosis que provoca el mismo nivel de efecto para ambas moléculas, es decir la dosis equiefectiva, su obtención previa es necesaria para realizar el análisis isobolográfico.

Para poder conocer la magnitud de la interacción y por lo tanto la relación que existe en la combinación de estos dos compuestos es necesario conocer:

$$M = \left(\frac{pAZ_{ex}}{A} \right) + \left(\frac{pBZ_{ex}}{B} \right) \quad \text{Ec.9.}$$

En donde, Los valores de pA y de pB se calcularon en la Ec. 4 y Ec. 5 respectivamente, si M es menor que 1 significa una relación sinérgica o superaditiva y si M es mayor a 1 una relación de atenuación o subaditividad.

8.4.5. Análisis estadístico

Los valores obtenidos en los experimentos se presentaron como la media \pm SEM las diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados por un análisis de varianza de una vía seguida por la prueba t de Newman's, Keuls y Tukey, respectivamente con el programa GraphPad Prisma.⁶ Los análisis isobolográficos del índice de interacción fueron validados por medio de una prueba t student modificada propuesta por Tallarida.^{49, 50} Se presentaron los datos tomando el valor de la media \pm EEM, se consideraron valores estadísticamente significativos aquellos que presentaron una $p < 0.05$.

9. Resultados

9.1. Modelo experimental de daño gástrico por diclofenaco

Los resultados demuestran que la administración de una dosis única de diclofenaco a dosis de 30, 56, 100 y 133 mg/Kg, genera lesiones gástricas significativas en comparación con el grupo basal ($p < 0.05$) (Tabla 4). Desde la administración de la dosis 30 mg/Kg, se puede observar inflamación, enrojecimiento y lesiones puntuales y hemorrágicas que abarcan todo el cuerpo del estómago y van aumentando conforme lo hace la dosis de diclofenaco (Fig. 12).

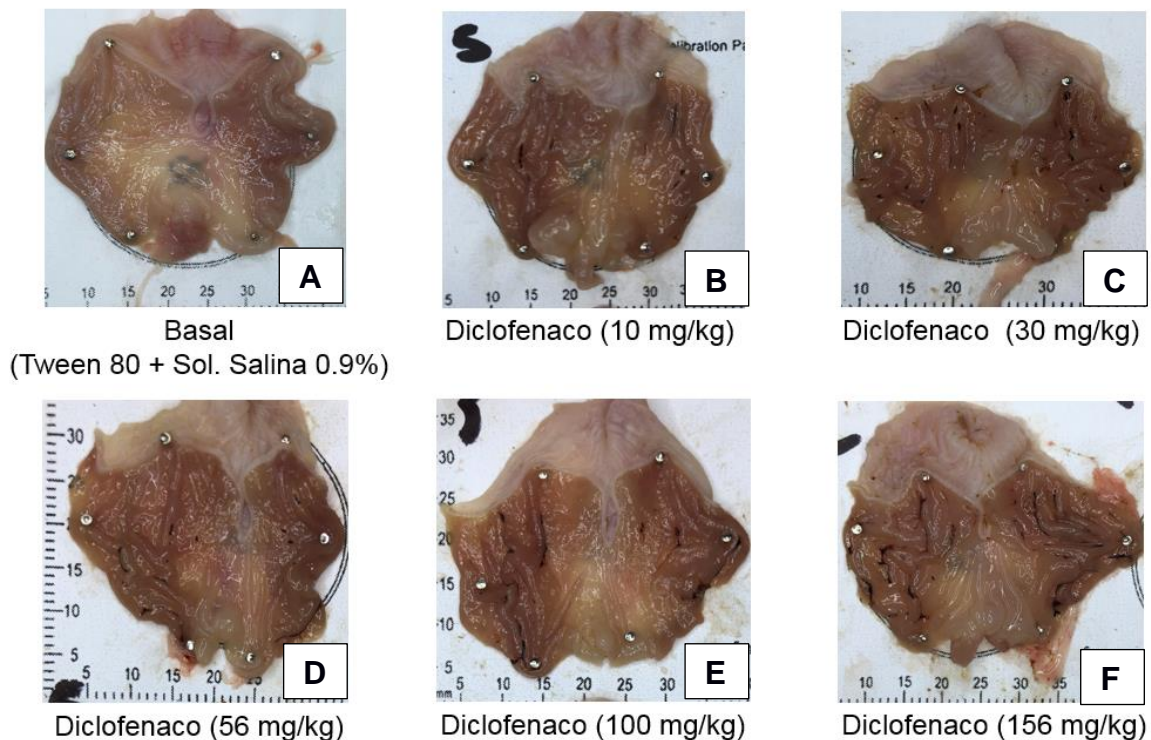


Figura. 12. Imágenes representativas de las lesiones en cuerpo del estómago después de los diversos tratamientos. (A) Basal, (B) diclofenaco 10 mg/Kg, (C) diclofenaco 30 mg/Kg, (D) diclofenaco 56 mg/Kg, (E) diclofenaco 100 mg/Kg y (F) diclofenaco 156 mg/Kg.

Tabla 4. Dosis usadas para el estudio de la curva dosis-respuesta del daño gástrico por diclofenaco.

Tratamiento	Dosis (mg/Kg p.o.)	Índice de ulcera (mm ²)
Basal (solución salina 0.9 %)	--	0 ± 0
Diclofenaco	10	5.317 ± 2.621
	30*	15.513 ± 2.611
	56*	20.142 ± 2.791
	100*	38.352 ± 5.480
	133*	47.591 ± 2.919

Dosis usadas para la construcción de la curva dosis-respuesta del daño gástrico por diclofenaco. Basal = solución salina 0.9%. Los datos son representados como la media ± EEM (n=6). * p<0.05 vs Basal.

A partir de estos resultados (Fig. 13) se obtuvo la dosis ulcerogénica de diclofenaco correspondiente a $50.94 \approx 51$ mg/kg (para fines del trabajo la dosis ulcerogénica se representa como DE_{50} del diclofenaco) y su intervalo, con un límite de confianza de 9.3418-(-0.1458).

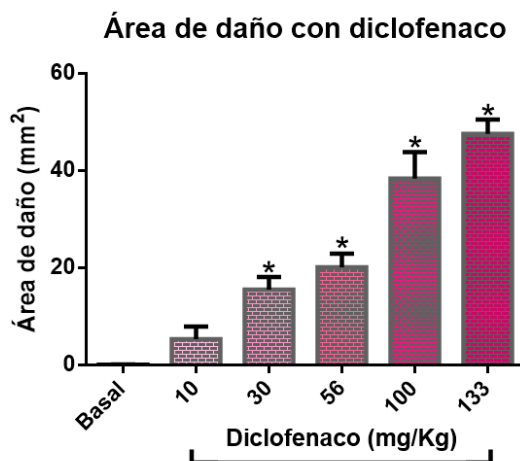


Figura. 13. Grafica del daño gástrico generado en ratas Wistar por diclofenaco a dosis de 10, 30, 56, 100 y 133 mg/kg. Datos expresados como la media ± EEM (n= 6). * p<0.05 vs Basal (solución salina 0.9% +Tween 80).

9.2. Evaluación del efecto protector de DLG y 3 α -OH-MDA de forma individual ante el daño gástrico generado por diclofenaco.

Al evaluar la administración individual de cada compuesto, se observó que el pretratamiento tanto con el 3 α -OH-MDA como con la DLG se genera un efecto gastroprotector significativo ante el daño gástrico agudo causado por la dosis única de diclofenaco ($p < 0.05$ vs daño) (Tabla 5), donde se observa que las lesiones disminuyen en cantidad y tamaño conforme la dosis de cada compuesto se incrementó (Fig. 14).

Tabla 5. Índice de úlcera del pretratamiento del 3 α -OH-MDA y la DLG ante el daño gástrico inducido por diclofenaco.

Grupo	Índice de úlcera (mm ²)		
	Grupo de daño	3 α -OH-MDA	DLG
1 (control)	0	0	0
2	5.317 \pm 2.62	11.11 \pm 2.86	9.55 \pm 1.76
3	15.51 \pm 2.61	10.55 \pm 2.43	5.43 \pm 0.87
4	20.14 \pm 2.79	5.99 \pm 1.92	6.08 \pm 2.38
5	38.35 \pm 5.48	2.89 \pm 1.16(*)	3.54 \pm 1.22
6	47.59 \pm 2.91	1.76 \pm 1.30 (*)	1.33 \pm 1.04(*)

Efecto protector del pretratamiento oral del 3 α -OH-MDA y la DLG de manera individual (a dosis de 0.3, 1, 3, 10 y 30 mg/Kg respectivamente) y ante el daño por diclofenaco (a dosis de 1, 30, 56, 100 y 156 mg/kg respectivamente). Los datos son representados como la media \pm EEM ($n=6$). (*) $p < 0.05$ vs grupo de daño.

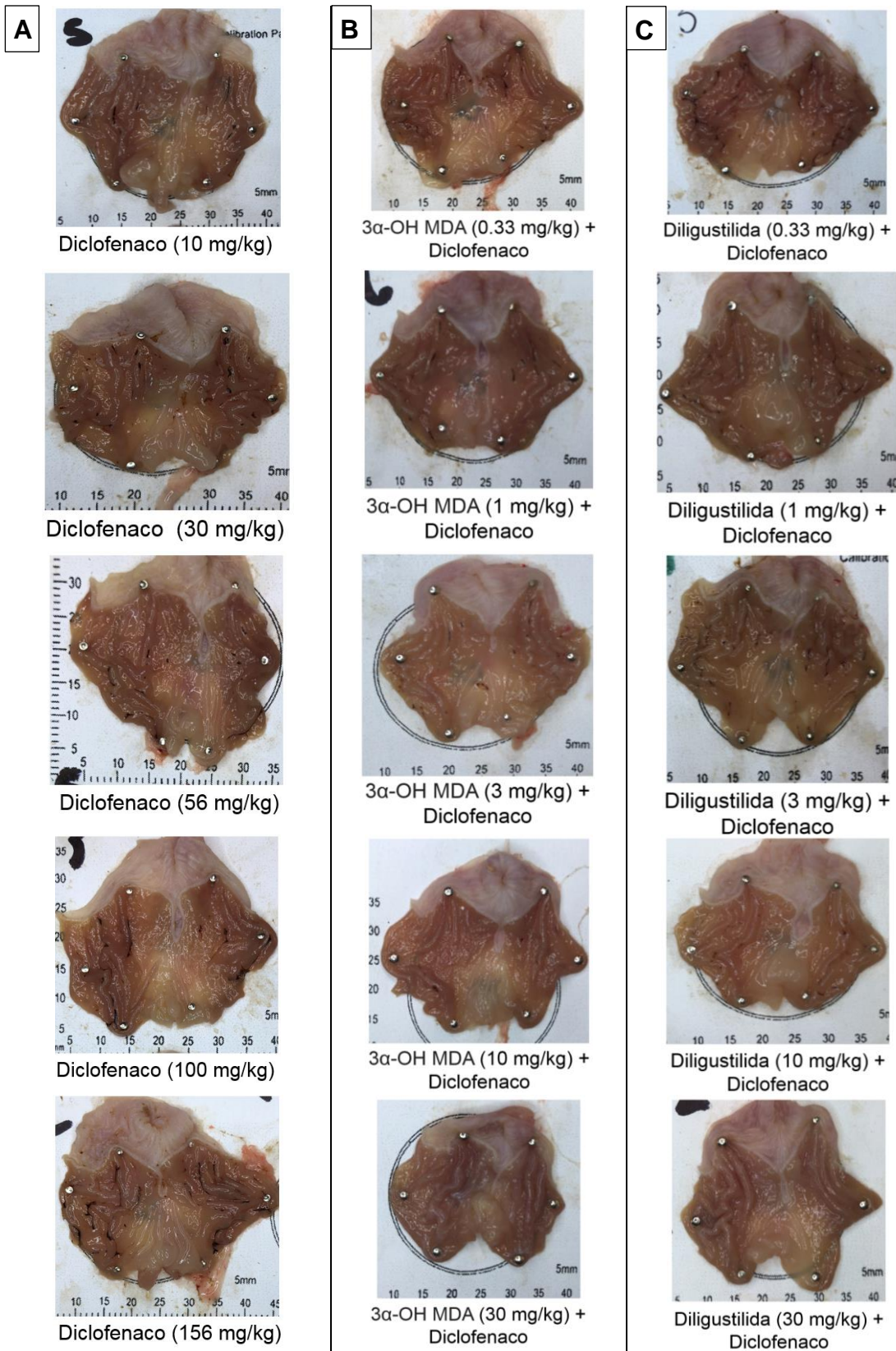


Figura. 14. Comparación de las imágenes representativas de las lesiones en cuerpo del estómago causado por la dosis ulcerogénica del diclofenaco, después de los diversos tratamientos de las ratas correspondientes a el Daño con diclofenaco (columna A) protección con ácido 3α-hidroximasticadienónico (columna B), y con diligustilida (columna C).

A partir de los datos obtenidos, se calcularon las DE_{50} de ambos extractos, siendo estas de 3.857 mg/Kg para ácido 3 α -hidroximasticadienónico y 4.598 mg/Kg para la diligustílida, (Tabla 6).

Tabla 6. Dosis efectivas 50 y sus límites de confianza al 95%.

Compuesto	DE_{50} (mg/Kg, p.o.)	Límites de confianza al 95%
3 α -OH-MDA	3.857	9.3418-0.1458
DLG	4.598	7.0502-0.6637

Al comparar los datos se puede observar que el 3 α -OH-MDA tiene un mayor efecto gastroprotector que la DLG (Fig. 15), debido a que el 50% de la gastroprotección se obtiene a una dosis ligeramente menor a la DLG. Además, la diferencia estadística de 3 α -OH-MDA contra el grupo de daño es significativo a partir de la dosis de 10 mg/Kg; a diferencia de la DLG que muestra una diferencia estadística contra el grupo de daño a partir la dosis a los 30 mg/Kg (Fig. 15). Además, al realizar la comparación del efecto de los compuestos administrados de manera individual contra el fármaco comercial de referencia, Omeprazol (OMZ 30 mg/Kg) se observa que las dosis mas altas de los dos compuestos se acercan mucho al efecto producido por este IBP y no hay diferencia estadística entre sus efectos.

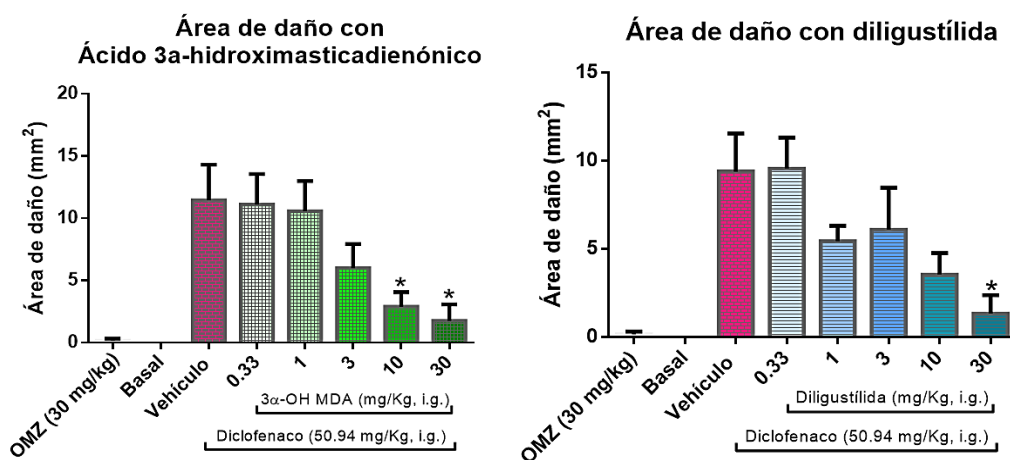


Figura. 15. Grafica del efecto gastroprotector del pretratamiento individual con 3α-OH-MDA y DLG ante el daño gástrico con diclofenaco. Datos expresados como la media ± EEM (n= 6). * p<0.05 vs Basal (solución salina 0.9% + Tween 80).

9.3. Evaluación del efecto protector de la combinación de 3α-OH-MDA con DLG ante el daño gástrico generado por diclofenaco.

Para calcular las proporciones de Z_{ad} fueron necesarias las DE_{50} de la Tabla 6 y, empleando las Ec. 3, 4 y 5, se calcularon los valores para las curvas dosis-respuesta de las combinaciones en las diferentes proporciones mostrados en las Tablas 7, 8 y 9.

Tabla 7. Cálculos para la curva dosis respuesta de la combinación 1:1 de 3α-OH-MDA con DLG

Múltiplo de Z_{ad}	3α-OH-MDA (mg/Kg p.o.)	DLG (mg/Kg p.o.)	Dosis Total (mg/Kg p.o.)
$\frac{1}{4} Z_{ad}$	0.574	0.482	1.056
$\frac{1}{2} Z_{ad}$	1.149	0.964	2.113
1 Z_{ad}	2.299	1.928	4.227
2 Z_{ad}	4.598	3.857	8.455
4 Z_{ad}	9.196	7.714	16.91

Tabla 8. Cálculos para la curva dosis respuesta de la combinación 1:3 de 3α-OH-MDA con DLG

Múltiplo de Z_{ad}	3α-OH-MDA (mg/Kg p.o.)	DLG (mg/Kg p.o.)	Dosis Total (mg/Kg p.o.)
$\frac{1}{4} Z_{ad}$	0.287	0.723	1.011
$\frac{1}{2} Z_{ad}$	0.574	1.446	2.021
1 Z_{ad}	1.149	2.892	4.042
2 Z_{ad}	2.299	5.785	8.084
4 Z_{ad}	4.598	11.571	16.169

Tabla 9. Cálculos para la curva dosis respuesta de la combinación 3:1 de 3 α -OH-MDA con DLG

Múltiplo de Z_{ad}	3α-OH-MDA (mg/Kg p.o.)	DLG (mg/Kg p.o.)	Dosis Total (mg/Kg p.o.)
$\frac{1}{32} Z_{ad}$	0.107	0.031	0.137
$\frac{1}{16} Z_{ad}$	0.215	0.061	0.275
$\frac{1}{8} Z_{ad}$	0.431	0.120	0.551
$\frac{1}{4} Z_{ad}$	0.862	0.241	1.103
$\frac{1}{2} Z_{ad}$	1.724	0.482	2.206
1 Z_{ad}	3.448	0.964	4.412
2 Z_{ad}	6.897	1.928	8.825
4 Z_{ad}	13.794	3.857	17.651

Los resultados obtenidos del área de daño en los estómagos de los grupos de las dosis teóricas planteadas (en el punto 8.4.3.) para la curva dosis-respuesta de la combinación 3:1 evidenciaron una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al daño causado por diclofenaco, tuvieron que agregarse 3 dosis menores más, sombreadas con color gris en la Tabla 9, esto con el fin de observar el comportamiento de dicho tratamiento y poder calcular su DE_{50} . Con los datos obtenidos de todas las proporciones de la combinación se construyeron las siguientes gráficas (Fig.16.) donde se observa la actividad de gastroprotección de cada combinación. Observamos que las dosis más altas de las combinaciones no presentan una diferencia estadística contra el OMZ ($p > 0.05$ vs OMZ)

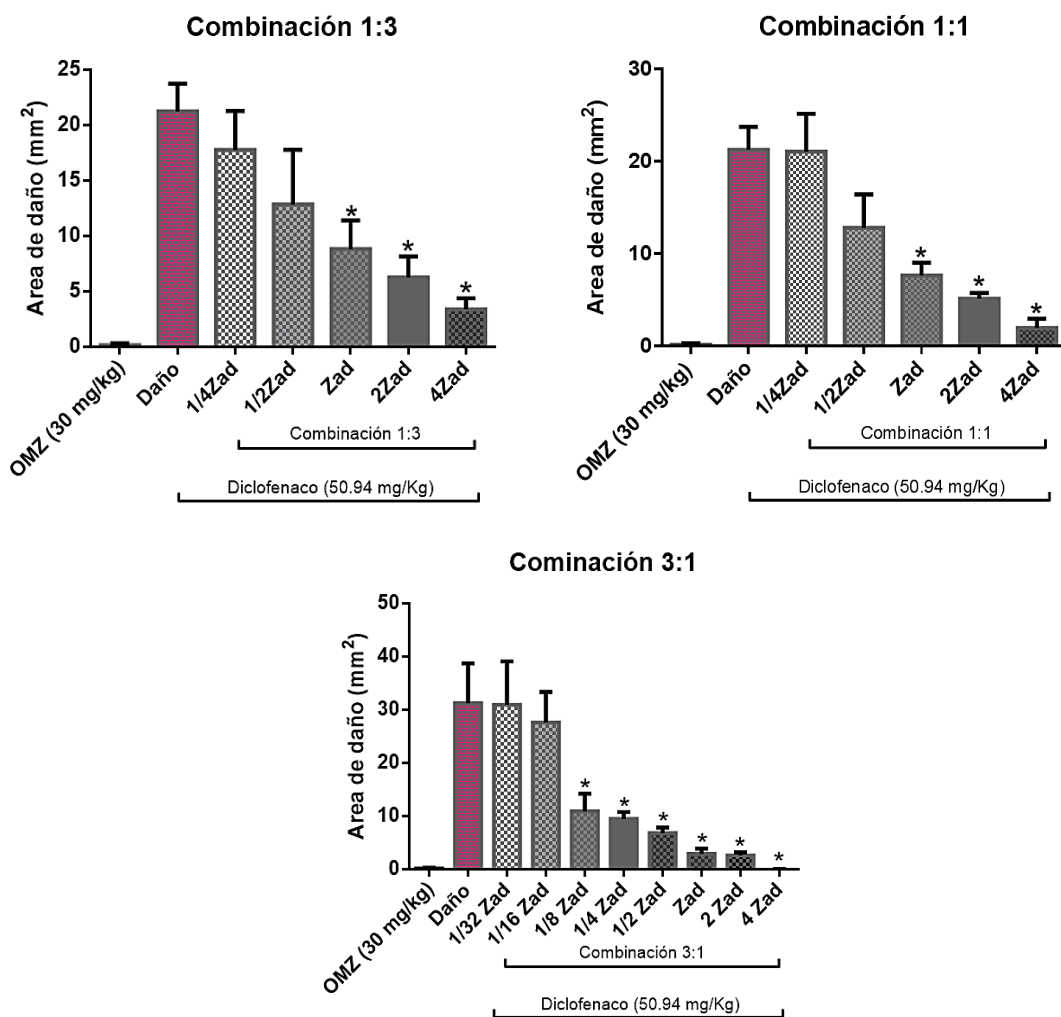


Figura. 16. Resultados gráficos de la combinación 1:1, 1:3 y 3:1 de 3 α -OH-MDA con DLG.
* p<0.05 vs Daño.

El análisis macroscópico de las lesiones gástricas de los grupos de ratas pretratados con la combinación 3 α -OH-MDA con DLG (Fig. 17), permitieron calcular las DE_{50} para cada proporción estudiada. Para la 1:1 fue de 3.27 mg/kg, para 1:3 fue de 3.93mg/kg, mientras que para la combinación 3:1 la DE_{50} fue de 0.91 mg/Kg (Tabla10.). Observando que la combinación 3:1 tiene una DE_{50} menor que las otras proporciones.

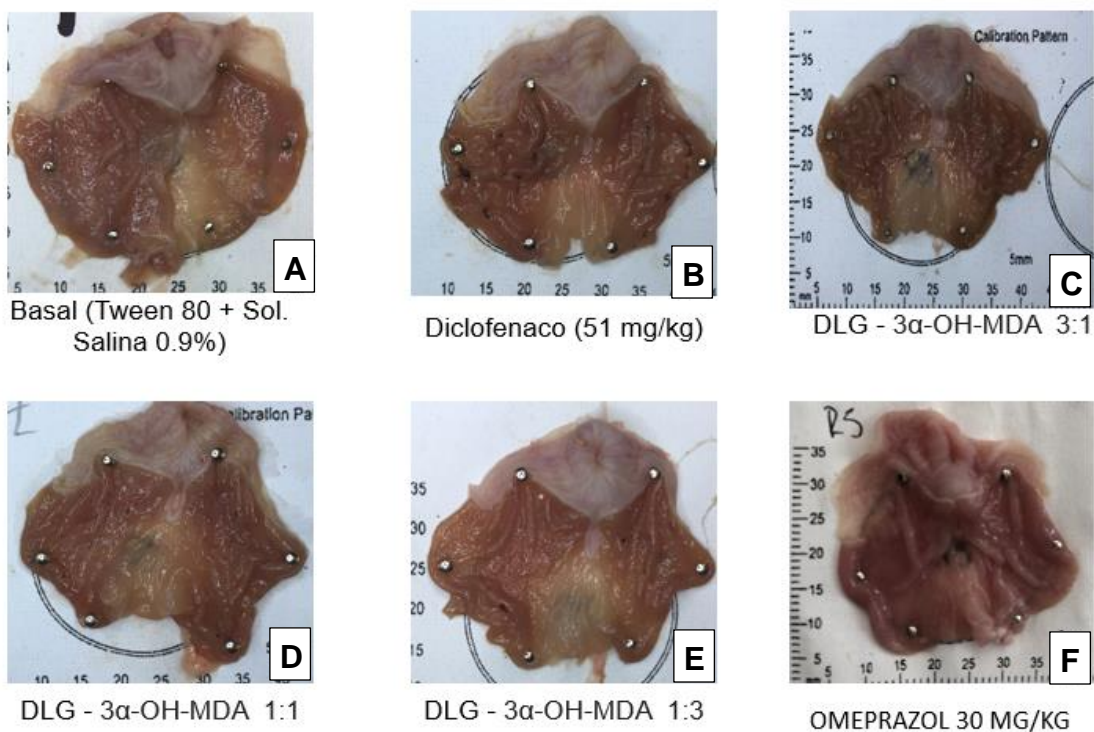


Figura. 18. Imágenes representativas de las lesiones en cuerpo del estómago después del tratamiento combinado de las sustancias. (A) Basal, (B) diclofenaco 51 mg/kg, (C) combinación en proporción 3:1, (D) combinación en proporción 1:1, (E) combinación en proporción 1:3 de los extractos, (F) Omeprazol 30 mg/Kg

Tabla 10. Límites de confianza de las dosis efectivas 50 (Z_{ex}) de la combinación 1:1 y 1:3

Combinación de ácido 3α-hidroxi-masticadienónico-diligustílica		
Tipo de combinación	DE_{50} (mg/Kg, p.o.)	Límites de confianza al 95%
1:1	3.273	4.549-2.095
1:3	3.932	6.150-1.714
3:1	0.9116	1.157-0.666

En la Fig. 18 se muestran todas las curvas dosis-respuesta de los tratamientos, en ella se observa que la proporción 3:1 de la combinación es la más potente y eficaz para generar gastroprotección frente a las otras proporciones o administraciones individuales de los compuestos, ya que la sigmoidea de esta proporción se

encuentra desplazada hacia la izquierda y muy por encima del resto de las curvas.

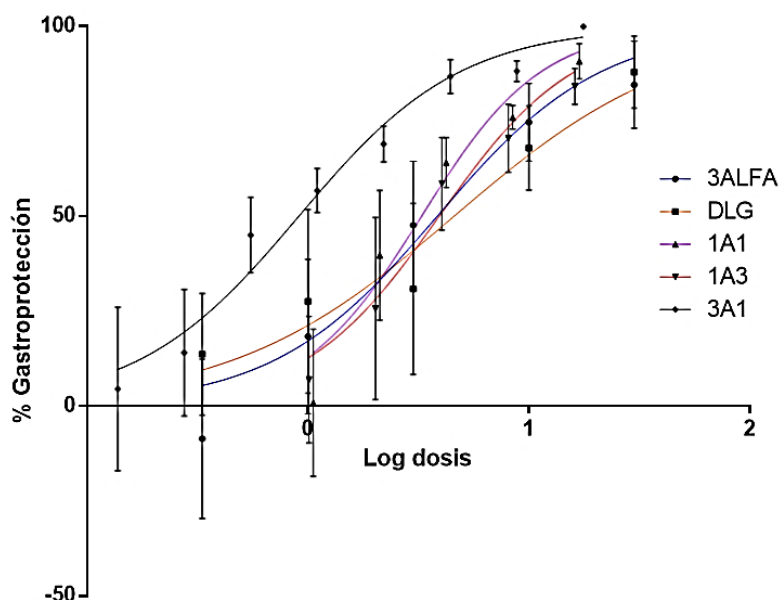


Figura. 19. Porcentaje de gastroprotección vs log de dosis de 3 α -OH-MDA, DLG y sus respectivas combinaciones.

En el isoblograma formado a partir de las combinaciones 1:1, 1:3 y 3:1 (Fig. 20), se observan las Z_{ex} , las cuales se encuentran por debajo del isobolo (línea de aditividad) lo cual refiere a una interacción de súper aditividad o sinérgica, y esta interacción se ve sustentada con el análisis fraccional donde se demostró que la relación $a/A + b/B$ (Ec. 1) fue significativamente menor a 1.

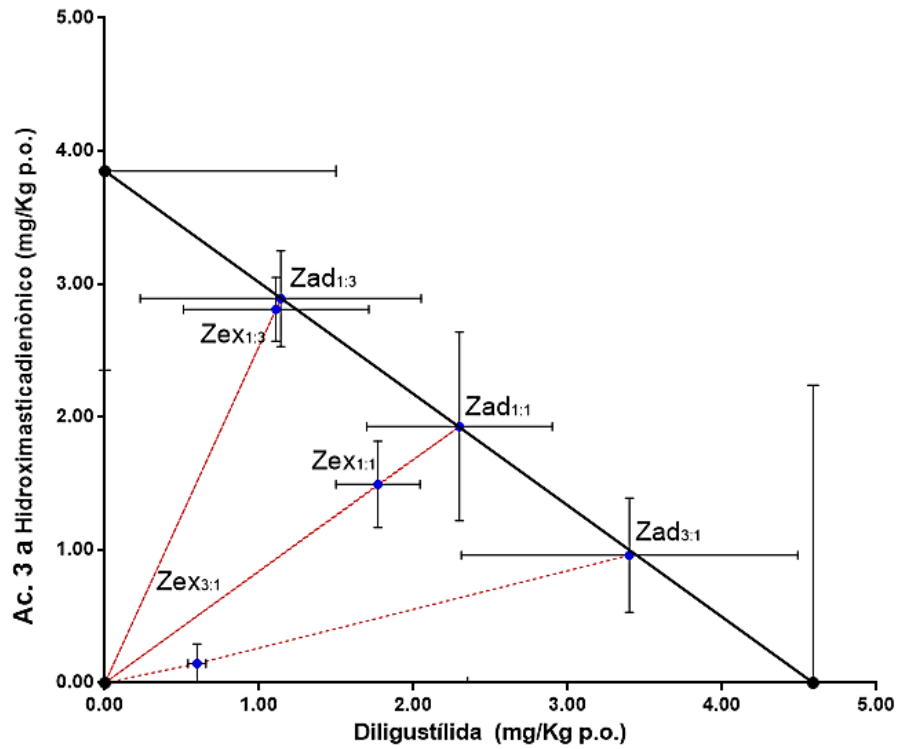


Figura. 20. Isoblograma, Z_{ad} y Z_{ex} , de la combinación de 3 α -OH-MDA con DLG.

Ademas, se calculó la magnitud de las interacciones utilizando la Ec.9

Tabla 11. Valores teóricos (Z_{ad}) y experimentales (Z_{ex}) para combinaciones de ácido 3 α -hidroximasticadienónico-diligustilida y su magnitud de interacción.

Combinación	Z_{ad} (mg/Kg)	Z_{ex} (mg/Kg)	Magnitud de la interacción
1:1*	4.227	3.273	0.774
1:3*	4.042	3.932	0.972
3:1	4.413	0.911	0.122

Magnitud sinérgica < 1.0, magnitud de aditiva = 1.0, magnitud antagónica > 1.0

10. Discusión de resultados:

En la actualidad la polifarmacia es la manera más habitual de mantener la salud de la población urbana (en México representa a más del 50% de la población), pero este fenómeno es paradójico, pues el sobreconsumo de medicamento aumenta la probabilidad de sufrir RAM's o efectos secundarios como las patologías GI causadas por el uso de AINE en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas e inclusive el dolor asociado; donde las posibles co-terapias para prevenir las patologías a nivel gastrointestinal son limitadas.²¹ Por ello la medicina tradicional mexicana, basada en el uso de plantas medicinales, se ha reconocido como una parte esencial en la preservación de la salud de millones de personas, y se han puesto en marcha investigaciones en torno a ella, para hacer de esta una nueva opción terapéutica.⁵⁰

Dos plantas medicinales de gran relevancia en la cultura de la República Mexicana son el cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) y el chuchupate (*Ligusticum porteri*), los cuales han sido utilizados a lo largo del tiempo para combatir problemas GI en las regiones donde estas proliferan. En los últimos años se han emitido diversos reportes sobre el efecto anti-ulceroso de ambas plantas.^{10,43,46} A partir de estos trabajos se ha podido separar el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, uno de sus principales compuestos del *Amphipterygium adstringens*, el cual posee actividad biológica contra el daño gástrico provocado por diferentes AINE.⁴² La evidencia obtenida hasta el momento sugiere que los mecanismos responsables de su actividad gastroprotectora son, la producción de óxido nítrico lo que aumenta la cantidad de prostaglandinas que a su vez provoca el aumento en la secreción de moco en las paredes del estómago.⁴²

Por otro lado, lo ya reportado acerca de diligustílida (proveniente del de *Ligusticum porteri*) sugiere que sus propiedades anti-ulcerosas son mediadas por mecanismos que incluyen a las prostaglandinas y la inhibición de secreción gástrica⁵¹ mediante el aumento en la disponibilidad de sulfuro de hidrogeno por medio de la estabilización de nitrosotioles que a su vez también se ve involucrada en la producción de prostaglandinas y la producción de moco en el interior de la pared estomacal.³⁶

Hasta el momento no existen reportes de efectos adversos debido al uso de *Amphiteryium adstringens* o de *Ligusticum porteri*,^{56, 61, 62} por lo tanto, en el presente trabajo se planteó probarlos de manera individual como gastroprotectores ante el uso de uno de los AINE más usado por la población, el diclofenaco.³²

Los resultados obtenidos dejan en claro que la administración por vía oral, tanto del ácido 3 α -OH-MDA como la DLG, empleados de forma individual disminuyen significativamente las lesiones gástricas en el modelo de daño con diclofenaco, al administrarse en dosis altas, obteniendo que el efecto gastroprotector de la DLG (DE_{50} = 4.60 mg/Kg) es menos efectivo con respecto al efecto del ácido 3 α -OH-MDA (DE_{50} = 3.86 mg/Kg). Estos resultados concuerdan con los reportados previamente en investigaciones donde se evalúa su efecto gastroprotector de forma individual en modelos con daño por etanol,^{46, 56} lo cual podría significar que los extractos son más eficaces previniendo las gastropatías relacionadas a los AINE que a las causadas por el consumo de alcohol.

Debido a que existen pocos estudios que han evaluado las interacciones entre productos naturales, debido a que los extractos obtenidos de plantas medicinales contienen una vasta cantidad de metabolitos, limitando así en gran escala el estudio

de las interacciones de éstos, en el presente proyecto se evaluaron diversas proporciones de estas dos especies, teniendo como antecedente su potencial uso en patologías GI^{56, 63} Respecto a esto, se ha asegurado que dichos compuestos se encuentren puros, para garantizar que la dosis de compuesto administrado sea la correcta, y cabe mencionar que el uso de una combinación farmacológica para la prevención y el tratamiento de toxicidad gastrointestinal relacionada con los AINE es un nuevo enfoque que podría reducir las dosis de los compuestos administrados.

Aun, cuando los extractos administrados de manera individual lograron ser efectivos a dosis relativamente bajas, la combinación de ellos como tratamiento demostró que las combinaciones 1:1 y 1:3 presentan una interacción de tipo aditivo, lo que permite reducir las dosis necesarias para obtener el efecto deseado ($DE_{50}1:1 = 3.27$ mg/kg y $DE_{50}1:3 = 3.93$ mg/kg). Mientras que el comportamiento de la combinación 3:1 es más significativo y ha de resaltarse, pues logro una DE_{50} de 0.54 mg/Kg, la cual puede verse más claramente en el isoblograma, graficado a partir de los resultados (Fig. 20). Por lo tanto, se observa de manera clara y consistente con los demás análisis, que la combinación 3:1 de estos dos compuestos es el tratamiento con mayor potencia de efecto gastroprotector en el modelo de daño gástrico con diclofenaco, y esto puede verse al comparar gráficamente la distancia de los Z_{ex} , las DE_{50} y sus respectivos valores de “ M ” obtenidos ya que este es mayor a 0 (cero).^{49,50} Las combinaciones probadas nos permiten tener un panorama tentativo del tipo de interacción que presentan estos compuestos, pero de esta manera se puede determinar que el empleo de la combinación farmacológica pueda funcionar y ser usada para la prevención y el tratamiento del daño gástrico relacionado a los AINE, y esta podría ser una alternativa

para reducir las dosis individuales de dichos compuestos, disminuyendo los posibles efectos secundarios que podrían presentarse con su uso constante.

11. Conclusión

La administración individual del ácido 3 α -hidroximasticadienónico y de la diligustílida presentan un efecto gastroprotector significativo en el modelo de daño gástrico generado por diclofenaco, el cual se ve potenciado cuando estos se administran de forma combinada, especialmente en proporción 3:1, ya que presentan una relación sinérgica demostrada mediante el análisis isoblográfico. Los resultados obtenidos son alentadores, pues generan evidencia científica sustentada en modelos experimentales, que podrían permitir el desarrollo de una terapéutica basada en dichos compuestos para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (como la úlcera péptica) en la población mexicana. Con ello se resalta la importancia del conocimiento empírico y de las plantas medicinales para el tratamiento de padecimientos comunes, e incluso para la prevención de estos.

12. Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son realmente prometedores por lo que podría plantearse el continuar investigando el posible mecanismo de acción de los compuestos en este modelo de daño. Para ello, sería útil medir los biomarcadores implicados en el daño gástrico como serían aquellos involucrados en la respuesta inflamatoria (TNF α , LTB $_4$, PGE $_2$) y por otra parte aquellos involucrados en la respuesta antioxidante (H $_2$ S, NO, SOD) que, si bien se han cuantificado en modelos como el de etanol e indometacina, sería una gran aportación para comprender el efecto gastroprotector del 3 α -OH-MDA y la DLG.

13. Referencias

1. Coleman JJ, Pontefract SK. Adverse drug reactions. *Clin Med*. 2016;16(5):481-485. doi: 10.7861/clinmedicine.16-5-481.
2. Dunlap JJ, Patterson S. Peptic Ulcer Disease. *Gastroenterology Nurs*. 2019; 42(5): 451- 454. doi: 10.1097/SGA.0000000000000478.
3. Flores KL, López LE, Ávila LB, Alvarado SJ. Hemorragia digestiva alta asociada a AINE. *Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento*. 2019; 3(3): 128-145. doi: 10.26820/recimundo/3.(3.Esp).noviembre.2019.128-145
4. Bielsa MV, Tamay JL, Lizárraga J, Remes JM, Carmona R, Aldana JM, Consenso mexicano sobre diagnóstico, prevención y tratamiento de la gastropatía y enteropatía por antiinflamatorios no esteroideos. *Rev Gastroenterol Méx (Engl Ed)*. 2020;85(2):190–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2019.11.003>
5. Secretaría de Salud, panorama epidemiológico de las enfermedades no transmisibles en México, 2020.
6. SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica). 2019. Boletín epidemiológico. México. 52: 49
7. Torres J., Leal, Y., Pérez, G., Gómez, A., Camorlinga, M., Cedillo, R., Tapia, R., Muñoz, O. A community-based seroepidemiological study of *Helicobacter pylori* infection in México. *The Journal of Infectious Diseases* 1998. 178(4): 1089-1094
8. Cavallini ME, Andreollo NA, Metze K, Araujo MR. Omeprazole and misoprostol for preventing gastric mucosa effects caused by indomethacin and celecoxib in rats. *Acta. Cir. Bras*. 2006; 21:168-176. doi: 10.1590/s0102-86502006000300009.
9. Díaz L. Mucosa gástrica: mecanismos protectores y efectos dañinos del ácido acetilsalicílico. *Enfoques fisiológico y bioquímico. Med Investig*. 2015;3(1):100–3. doi: 10.1016/j.mei.2015.02.011

10. Gao Z, Karfunkle M, Ye W, Marzan TA, Yang J, Lex T, Sommers C, Rodriguez JD, Han X, Florian J, Strauss DG & Keire A. In Vitro Analysis of *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA) Formation from Ranitidine Under Simulated Gastrointestinal Conditions. *JAMA Network Open*. 2021; 4(6) doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.18253
11. Becker JC, Domschke W, Pohle T. Current approaches to prevent NSAID-induced gastropathy-COX selectivity and beyond. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 2004; 58:587-600. doi: 10.1111/j.1365-2125.2004.02198.x.
12. Brooks J, Warburton R, Beales IL. Prevention of upper gastrointestinal haemorrhage: current controversies and clinical guidance. *Ther. Adv. Chronic. Dis*. 2013; 4:206-222. doi: 10.1177/2040622313492188.
13. OMS (Organización Mundial de la Salud). 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Hong Kong
14. Pineda-Peña EA, Orona-Ortiz A, Velázquez-Moyado JA. *et al*. Anti-inflammatory, antioxidant, and gastro-protective mechanism of 3 α -hydroxymasticadienoic acid and diligustilide combination on indomethacin gastric damage. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 393, 1501–1513 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00210-020-01857-7>
15. Compeán DG, Maldonado HJ. Gastroenterología y hepatología: objetivos y su desarrollo. Segunda edición. México: Manual Moderno; 2009.
16. Geneser F. Histología. 3ª edición. México: Editorial Panamericana; 2005.
17. Tsukimi Y, Okabe S. Recent Advances in Gastrointestinal Pathophysiology: Role of Heat Shock Proteins in Mucosal Defense and Ulcer Healing. *Biol. Pharm. Bull*. 2001; 24(1): 1-9. doi: 10.1248/bpb.24.1.
18. Saint-Leu PH, Fortes TB, Santoyo RF, Rodriguez MA. Anatomia integral/ Integral Anatomy. Editorial Trillas; 2008.

19. Schiavone S, Jaquet V, Trabace L, Krause K-H. Severe Life Stress and Oxidative Stress in the Brain: From Animal Models to Human Pathology. *Antioxid Redox Signal*. 2013. 18(12):1475–9)
20. Atay S, Tarnawski A, Dubois A. Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat*. 2000; 61:105-124.)
21. Paul R. Wheeler H. George Burkitt. *Histología funcional*. España. Editorial JIMS; 1980; 185.
22. Serafim C, Araruna ME, Júnior EA, Diniz M, Hiruma-Lima C, Batista L. A Review of the Role of Flavonoids in Peptic Ulcer (2010-2020). *Molecules*. 2020; 25(22):5431. <https://doi.org/10.3390/molecules25225431>
23. Cecilia Gotor, Sulfuro de hidrógeno: una molécula esencial para la vida, SEBBM España. 2020. doi :http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2020.05.1
24. Carretero C. Úlcera péptica. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2016;12(3):111–117. doi: 10.1016/j.med.2016.02.001
25. Kempenich JW, & Sirinek KR. Acid Peptic Disease. *Surgical Clinics of North America*. 2018; 98(5): 933–944. doi: 10.1016/j.suc.2018.06.003.
26. Podein R. Úlcera péptica. *Medicina integrativa*. Elsevier. 2009: 474–484.
27. Patel K.P., Patel S.K., Dixit S.K., Rathore Rz. Gastritis and peptic ulcer diseases in dogs: A review. *Int.J. Current.Microbiol. App.Sci*. 2018. 7(3):2475-2501. Recuperado de la base de datos Research Gate. Disponible en <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.703.288>
28. Navarro-Martínez A, Vidal-Martínez M, García-Rosa I, Lázaro-Gómez MJ, & Brotons-Román J. Perfil de prescripción y adecuación del tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos en el paciente diabético. *Revista de Calidad Asistencial*. 2015: 30(5); 256–264. doi:10.1016/j.cali.2015.06.007.

29. García-Colmenero I, Díaz-Franco SD, Zorrilla-Mendoza JG, Cortés-Chamorro R. Aspectos de seguridad en el tratamiento del dolor con analgésicos antiinflamatorios no esteroideos. 2018; 72(5-6): 324-331.
30. Valsecia M.E., Malgor L.A. Farmacología médica. Volumen 4: Farmacología de la hematopoyesis, farmacología gástrica, farmacología del dolor: AINES y opioides, anestésicos locales y generales, y bloqueadores neuromusculares. Capítulo 7: Analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios no esteroides (AINES). 2019. Consultado en https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/0000cap7_aines.pdf
31. Altman R., Bosch B., Brune K., Patrignani P., Young C. Advances in NSAID Development: Evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. *Drugs*. 2015; 75: 859-877.
32. Gan T.J. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research & Opinion*. 2010; 26 (7): 1715-1731
33. Drugbank [base de datos en Internet]. Canadá:Canadian Institutes of Health Research, [consultado 02 Marzo 2023]. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00586>
34. Lagos Quezada DV, Morales Reyes MJ, Sánchez Hernández SA, Nieto Durón CA, Lanza Euceda EA, Donaire Núñez JC, García Ramírez LF, Andrade Ávila Las reacciones sistémicas causadas por la toxicidad del diclofenaco. *Rev. Cient. Esc. Univ. Cienc. Salud*. 2019;5(1):41-9. doi: <https://doi.org/10.5377/rceucs.v5i1.7209>
35. Hijos-Mallada, G., Sostres, C., & Gomollón, F. AINE, toxicidad gastrointestinal y enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterología y Hepatología*. 2021; doi:10.1016/j.gastrohep.2021.06.003
36. Khazaeinia, T., & Jamali, F. Effect of drug release rate on therapeutic outcomes: formulation dependence of gastrointestinal toxicity of diclofenac in the rat. *InflammoPharmacology*. 2004 ;12(1):69–80. doi:10.1163/156856004773121383

37. Oscanoa-Espinoza, Seguridad de los antiinflamatorios no esteroideos Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, México; vol. 53, núm. 2, marzo-abril, 2015, pp. 172-179,
38. Massó-González EL, Patrignani P, Tacconelli S, García-Rodríguez LA. Variability among nonsteroidal antiinflammatory drugs in risk of upper gastrointestinal bleeding. *Arthritis Rheum.* 2010 ;62(6):1592-1601. doi:. 10.1002/art.27412
39. Fernández-Travieso JC. Incidencia actual de la gastritis: una breve revisión, Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2014; 45(1):10-17
40. Cragg, G., Newman, D. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology.* 2005. 100(1-2): 72-79.
41. Llorente, J., Ocegueda, S.. Estado del conocimiento de la biota, en: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Capital natural de México, vol. I: CONABIO, México 2010.
42. Arrieta J, Benitez J, Flores E, Castillo C, Navarrete A. Purification of Gastroprotective Triterpenoids from the Stem Bark of *Amphipterygium adstringens*; Role of Prostaglandins, Sulfhydryls, Nitric Oxide and Capsaicin-Sensitive Neurons. *Planta Med.* 2003; 69(10). doi:10.1055/s-2003-45098.
43. Chavez-Piña A, Navarrete A. Gastroprotective Triterpenoids: Pharmacological Mechanism. In: Alejandro V, Ibañez J, eds. *Medicinal Plants Classification, Biosynthesis and Pharmacology.* New York; 2009:97-100
44. Velázquez-Moyado JA, Martínez-González A, Linares E, Bye R, Mata R, Navarrete A. Gastroprotective effect of diligustilide isolated from roots of *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) on ethanol-induced lesions in rats. *J Ethnopharmacol.* 2015; 174: 403-409. doi:10.1016/j.jep.2015.08.03.
45. Velázquez-Moyado JA, Balderas-López JL, Pineda-Peña EA, Sánchez-Ortiz BL, Tavares-Carvalho JC, Navarrete A. Diligustilide releases H₂S and stabilizes S-nitrosothiols in ethanol-induced lesions on rat gastric mucosa. *Inflammopharmacology.* 2018;26(2):611-619. doi:10.1007/s10787-017-0392-6

46. Buenor Adinortey M, Ansah C., Galyuon I, Nyarko A. In vivo models used of evaluation of potential antigastroduodenal ulcer agents. *Ulcers*. Vol. 2013, ArticleID796405. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/796405>
47. Mishra, A. P., Bajpai, A., & Chandra, S. A Comprehensive Review On the Screening Models for The Pharmacological Assessment of Antiulcer Drugs. *Current Clinical Pharmacology*, 2019. doi:10.2174/1574884714666190312143846
48. Adinortey, M., Ansah, C., Galyuon, I., Nyarko, A. 2013 In Vivomodels used for evaluation of potential antigastroduodenal ulcer agents. *Ulcers* 2013:1-12
49. Tallarida RJ. Drug combinations: Tests and analysis with isoboles. *Curr Protoc Pharmacol*. 2016. doi:10.1002/0471141755.ph0919s72.
50. Tallarida RJ. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Oct;319(1):1-7. doi: 10.1124/jpet.106.104117. Epub 2006 May 2. PMID: 16670349.
51. Balderas JL. Alfaro A. Navarrete A. Farmacometría: Curvas dosis respuesta de tipo gradual Facultad de Química; Departamento de farmacia Vol.1. PAPIME: 200314.
52. Velasco-Zamora JA, Gómez-Reyes E, Uscanga L. ¿Qué tanto se siguen las recomendaciones de las guías clínicas sobre gastroprotección? Una revisión en enfermos que consumen antiinflamatorios no esteroideos. *Rev Gastroenterol Mex*. 2016;81(3):121–125. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2016.04.001>
53. Takeda, 12% de los mexicanos padece gastritis, según datos del LATAM Gastro Summit organizado por Takeda [Internet]. Com.mx. [Actualizado el 22 de mayo de 2018, citado el 20 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://www.pmfarma.com.mx/noticias/15000-12-de-los-mexicanos-padece-gastritis-segun-datos-del-latam-gastro-summit-organizado-por-takeda.html>.
54. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN.

55. Wallace JL, Vong L. NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDs. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008; 9(11):1151-6. PMID: 18951293.
56. Navarrete A, Oliva I, Sánchez-Mendoza ME, Arrieta J, Cruz-Antonio L, Castañeda-Hernández G. Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2005; 57(12):1629-1636. doi:10.1211/jpp.57.12.0013.
57. Pineda-Peña EA, Meza-Pérez DG, Chávez-Piña AE, Velázquez-Moyado JA, et. al. Pharmacodynamic interaction of 3 α -hydroxymasticadienonic acid and diligustilide against indomethacin-induced gastric damage in rats. *Drug Development Research*. 2019;80(5): 585-594. doi: 10.1002/ddr.21535
58. Paul RK, Jabbar A, Rashid MA. Antiulcer activity of *Mikania cordata*. *Fitoterapia*. 2000 Dec;71(6):701-3. doi: 10.1016/s0367-326x(00)00216-1.
59. Pineda-Peña, E. A., Martínez-Pérez, Y., Galicia-Moreno, M., Navarrete, A., Segovia, J., Muriel, P, Chávez-Piña, A. E. Participation of the anti-inflammatory and antioxidative activity of docosahexaenoic acid on indomethacin-induced gastric injury model. *European Journal of Pharmacology*. 2018; 818, 585–592. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.11.015>
60. Navarrete A, Oliva I, Sánchez-Mendoza ME, Arrieta J, Cruz-Antonio L, Castañeda-Hernández G. Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2005; 57(12): 1629-1636. doi: 10.1211/jpp.57.12.0013
61. Brindis F, Rodríguez R, Bye R, González-Andrade M, Mata R. (Z)-3-butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an α -glucosidase inhibitor. *J Nat Prod*. 2011; 74(3):314-320. doi:10.1021/np100447a.

62. Linares E, Bye RA. a Study of Four Medicinal Plant Complexes of Mexico. J Ethnopharmacol. 1987; 19:153-183. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(87\)90039-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(87)90039-0)
63. Ugalde M, Reza V, González-Trujano ME, Avula B, Khan IA, Navarrete A. Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and Valeriana edulis hydroalcoholic extract in mice*. J Pharm Pharmacol. 2005; 57(5):631-639. doi:10.1211/0022357056000.
64. Navarrete A, Martínez-Urbe LS, Reyes B. Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. Phyther Res. 1998;12(1):1-4. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(19980201)12:1<1::AID-PTR177>3.0.CO;2-H

14. Anexo.

Ciudad de México 11 de diciembre de 2023



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN**
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN



OFICIO No.: FESZ/DEPI/CE/013/22
ASUNTO: APROBACIÓN DE PROYECTO

DRA. ELIZABETH A. PINEDA PEÑA
RESPONSABLE DE PROYECTO
P R E S E N T E

Hago de su conocimiento que por acuerdo del Comité de Investigación y del Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, **Acuerdo No. 22/29-07-SE/2.3** su proyecto "**Estudio de mediadores implicados en la seguridad gástrica de la interacción farmacodinámica entre compuestos de origen natural aislados de plantas medicinales en el daño gástrico por diclofenaco en un modelo murino**", fue **APROBADO**, con registro **FESZ-CE/22-115-12**, ya que cumple con los principios bioéticos para llevar a cabo la investigación y con los lineamientos establecidos por el Comité de Investigación.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 29 de julio de 2022.

MTRO. GENARO MONTAÑO ARIAS
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN

DNEO/GMA/nlsv

Campus I: Av. Guelatao No. 66, Col. Ejército de Oriente, Iztapalapa C.P. 09230, Ciudad de México.

Campus II: Batalla 5 de mayo s/n esquina Fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, Iztapalapa C.P. 09230, Ciudad de México.

Campus III: Ex fábrica de San Manuel s/n, Col. San Manuel entre Corregidora y Camino a Zautla, San Miguel Contla, Santa Cruz Tlaxcala.

