



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL CO-TRATAMIENTO CON EL EXTRACTO METANÓLICO DE
CYRTOCARPA PROCERA Y OMEPRAZOL EN LA RESOLUCIÓN DE LA ÚLCERA
GÁSTRICA EN RATONES.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MIGUEL ÁNGEL GONZÁLEZ TÉLLEZ



CD.MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Elia Brosla Naranjo Rodríguez

VOCAL: Profesor: José Fausto Rivero Cruz

SECRETARIO: Profesora: Irma Romero Álvarez

1er. SUPLENTE: Profesor: José Eduardo Roa Coria

2° SUPLENTE: Profesor: Ignacio González Sánchez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 2, EDIFICIO D, 1^{ER} PISO, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. ERIKA GÓMEZ CHANG

SUSTENTANTE: MIGUEL ÁNGEL GONZÁLEZ TÉLLEZ

AGRADECIMIENTOS

Al programa DGAPA-PAPIIT No. IN214317 (2017-2018) “Evaluación del extracto metanólico de la corteza de *Cyrtocarpa procera* como terapia coadyuvante de la úlcera gástrica y su potencial antineoplásico” por la beca Licenciatura/Titulación otorgada para la realización de este trabajo.

A la Dra. Irma Romero Álvarez, por ser mi tutora y darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por ser tan paciente y tolerante conmigo y con todos los asuntos que se presentaron en la realización de esta tesis.

A la Dra. Erika Gómez Chang, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina por fungir como Supervisora Técnica en la realización de la presente tesis.

Al jurado asignado: Dr. Ignacio González Sánchez, Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez, Dr. José Fausto Rivero Cruz, Dr. José Eduardo Roa Coria y Dra. Irma Romero Álvarez.

A la Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez y al Dr. José Fausto Rivero Cruz por sus comentarios y correcciones con respecto a la tesis que permitieron mejorarla.

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

ÍNDICE.

Lista de figuras.	5
Lista de abreviaturas.	7
1. Introducción.	9
1.1. Anatomía e histología del estómago humano.	9
1.2. Fisiología de la secreción ácida en el estómago.	13
1.3. Estructura y mecanismo de la ATPasa K ⁺ / H ⁺ gástrica.	16
1.4. Mecanismos de defensa de la mucosa gástrica.	18
1.5. Generalidades de la úlcera péptica, factores y etiología.	20
1.6. Tratamientos para la úlcera péptica.	24
1.7. Calidad de resolución de úlcera péptica.	30
1.8. Modelos de ulceración.	32
1.9. Histología gástrica del ratón.	32
1.10. Daños a la mucosa gástrica y consecuencias del etanol.	35
1.11. Terapias alternativas a base de plantas medicinales.	36
1.12. <i>Cyrtocarpa procera</i> .	36
1.13. Usos medicinales tradicionales.	38
1.14. Información farmacológica de <i>Cyrtocarpa procera</i> .	38
1.15. Antecedentes directos.	39
2. Justificación del trabajo.	41
3. Objetivo general.	42
3.1. Objetivos particulares.	42
4. Metodología.	42
4.1. Extracto metanólico de <i>Cyrtocarpa procera</i> .	42
4.2. Animales de experimentación; cuidados y manejo.	43
4.3. Evaluación del efecto resolutorio de úlcera gástrica.	43
4.4. Determinación del área de ulceración.	44
4.5. Técnicas histológicas e histoquímicas.	45
4.6. Modelos estadísticos.	45
5. Resultados y discusión.	45

5.1. Control negativo de ulceración.	45
5.2. Controles positivos de ulceración.	46
5.3. Tratamientos.	49
5.3.1. Análisis macroscópico.	49
5.3.2. Análisis histológico.	54
5.3.2.1 Comparación de las preparaciones histológicas	54
6. Conclusiones.	62
7. Perspectivas	63
8. Referencias.	64

LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1. Anatomía del estómago.
- Figura 2. Capas del estómago.
- Figura 3. Estructura de una glándula gástrica del cuerpo del estómago.
- Figura 4. Estímulos de la secreción de ácido.
- Figura 5. Célula parietal en reposo y durante la secreción.
- Figura 6. Mecanismos de transporte de iones en la célula parietal.
- Figura 7. Estructura de la ATPasa H^+/K^+ .
- Figura 8. Ciclo catalítico de la ATPasa H^+/K^+ .
- Figura 9. Tipos de herida de la mucosa gástrica.
- Figura 10. Causas de la úlcera péptica.
- Figura 11. Forma en que *H. pylori* infecta la mucosa gástrica.
- Figura 12. Efecto de *H. pylori* sobre la secreción de ácido clorhídrico (HCl) en el estómago humano.
- Figura 13. Acción de los fármacos que influyen en la secreción ácida.
- Figura 14. Espectro de absorción de UV del omeprazol.
- Figura 15. Ratones de laboratorio.
- Figura 16. Estómago de un ratón.
- Figura 17. Tipos de glándulas de la mucosa gástrica de un ratón.
- Figura 18. Descripción de las partes de *Cyrtocarpa procera*.

Figura 19. Características del estómago de un ratón sin algún tratamiento.

Figura 20. Comparación de estómagos de 2 y 24 h.

Figura 21. Área de úlcera (mm²) de los tiempos 2 y 24 h.

Figura 22. Imágenes representativas con microscopía de campo claro de preparaciones histológicas de estómagos de ratón 2 y 24 h de ulceración.

Figura 23. Variación del área de úlcera (mm²) a través del tiempo de todos los tratamientos.

Figura 24. Variación del área de úlcera (mm²) a través del tiempo de los tratamientos SSI y OME.

Figura 25. Vista macroscópica de estómagos representativos de los tratamientos SSI y OME.

Figura 26. Variación del área de úlcera (mm²) a través del tiempo de los tratamientos SSI y CpMet.

Figura 27. Variación del área de úlcera (mm²) a través del tiempo de los tratamientos SSI y CpMet+OME.

Figura 28. Vista macroscópica de estómagos representativos de los tratamientos CpMet y CpMet+OME.

Figura 29. Imágenes representativas con microscopía de campo claro de preparaciones histológicas de estómagos de ratón al tiempo cero y con el tratamiento con SSI.

Figura 30. Imágenes representativas con microscopía de campo claro de preparaciones histológicas de estómagos de ratón al tiempo cero y con el tratamiento con OME.

Figura 31. Imágenes representativas con microscopía de campo claro de preparaciones histológicas de estómagos de ratón al tiempo cero y con el tratamiento con CpMet.

Figura 32. Imágenes representativas con microscopía de campo claro de preparaciones histológicas de estómagos de ratón al tiempo cero y con el tratamiento con CpMet+OME.

LISTA DE ABREVIATURAS.

AH2R.....	Antagonistas de los receptores a histamina tipo 2.
AINES.....	Antinflamatorios no esteroideos.
ATP.....	Trifosfato de adenosina.
ATPasa H ⁺ /K ⁺	Adenosin trifosfatasa transportadora de H ⁺ y K ⁺ .
APS.....	Ácido peryódico de Schiff.
cAMP.....	Adenosín monofosfato cíclico.
CCK-B.....	Receptor B a colecistocinina activado por la gastrina.
COX.....	Ciclooxigenasa.
CpMet.....	Extracto metanólico de <i>Cyrtocarpa procera</i> .
Cys.....	Cisteína (aminoácido esencial).
DE50.....	Dosis efectiva 50.
DL50.....	Dosis letal 50.
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico.
ECL.....	Célula tipo enterocromafín.
EGF-R.....	Receptor al factor de crecimiento epidérmico.
EROS.....	Especies reactivas del oxígeno.
H ⁺	Protón ácido.
HCO ₃ ⁻	Anión bicarbonato.
HCl.....	Ácido clorhídrico.
HYE.....	Hematoxilina y Eosina.
5HT.....	5-Hidroxitriptamina (Serotonina).
IL-1 β	Interleucina 1-beta.
IL-8.....	Interleucina 8.
IBP.....	Inhibidor de la ATPasa H ⁺ /K ⁺ .
K ⁺	Catión potasio.
KCl.....	Cloruro de potasio.
M3.....	Receptor muscarínico tipo 3.
MCP-1.....	Proteína quimiotáctica de monocitos 1.
NaCl.....	Cloruro de sodio.

OME.....Omeprazol.
PBS.....Solución de fosfatos amortiguada.
PGD2.....Prostaglandina Tipo D 2.
PGE2.....Prostaglandina Tipo E 2.
PGF2 αProstaglandina Tipo F 2 α .
PGI2.....Prostaglandina Tipo I 2.
SH.....Sulfhidrilo (Grupo funcional de aminoácidos).
SSI.....Solución salina isotónica NaCl 0.9 %.
TNF αFactor de necrosis tumoral α .
TXA2.....Tromboxano tipo 2.
VEGF.....Factor de crecimiento endotelial vascular.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Anatomía e histología del estómago humano.

El tubo digestivo, continuación de la cavidad oral, se subdivide en regiones morfológicamente reconocibles: esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso. El estómago (un órgano en forma de J) es la parte más distensible del tubo digestivo; arriba de él, se encuentra el esófago y está conectado por abajo con la primera parte del intestino delgado (el duodeno). Las funciones del estómago son almacenar alimentos, continuar con la digestión de las proteínas y suprimir el desarrollo de bacterias por la potente acidez del ácido gástrico (ácido clorhídrico, HCl) y hacer progresar los alimentos hacia el intestino delgado como un material pastoso llamado quimo (Fox, 2011).

El estómago tiene dos aberturas el esfínter pilórico por la parte inferior y el cardias por la parte superior, dos curvaturas (mayor y menor), está dividido en tres partes, el cuerpo, el fondo y el antro (Figura 1). La superficie interior del estómago está organizada en largos pliegues llamados arrugas (Daniels y col., 2006; Fox, 2011).

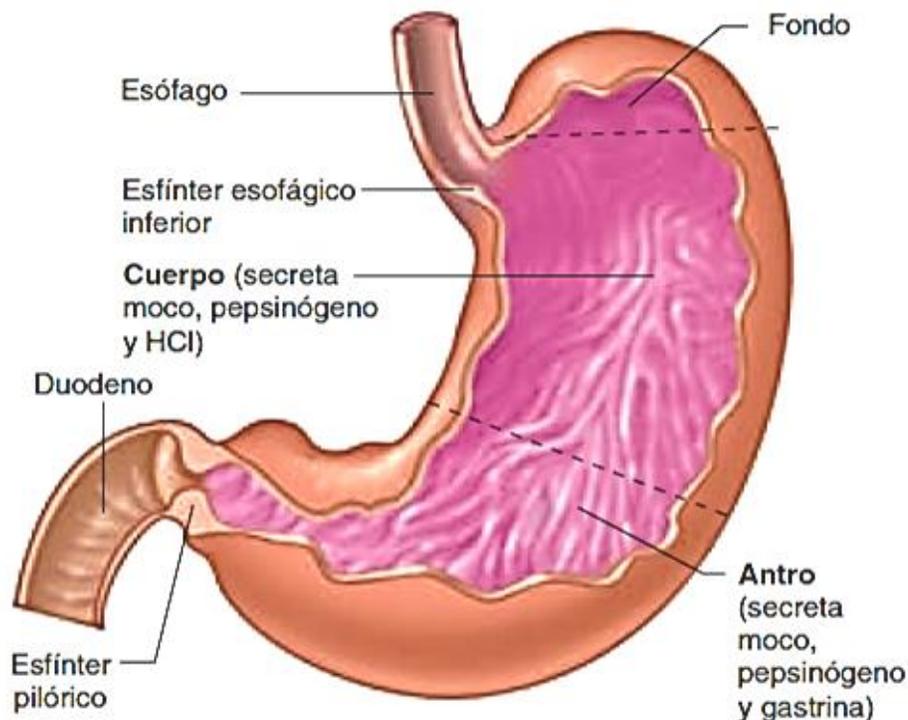


Figura 1. Anatomía del estómago. (Tomado y modificado de Barrett, 2010)

El estómago está cubierto por una serie de capas que forman una barrera selectiva entre el ambiente exterior (lumen) y el cuerpo. Esta barrera está compuesta de cuatro capas (Figura 2) y del interior del organismo hacia el lumen se organizan de la siguiente manera:

La serosa formada por el peritoneo (capa delgada de tejido conectivo libre cubierto con mesotelio).

La muscular compuesta por tres capas: la externa longitudinal, la circular intermedia y la interna oblicua.

La submucosa está constituida por tejido conectivo colagenoso denso de distribución irregular, fibras elásticas y una abundante red vascular y linfática (rico en mastocitos, macrófagos y neutrófilos) contiene fibras elásticas que se encuentran entre la muscular de la mucosa y la muscular externa.

La mucosa consiste de 3 componentes:

- La muscular de la mucosa: Capa delgada de musculo liso, que forma un borde entre la mucosa y la submucosa.
- La lamina propia: Consiste en una red de colágeno y fibras reticulares. Es delgada en el fondo y el cuerpo; y prominente en las zonas del cardias y del píloro.
- La cubierta epitelial: Células columnares simples que cubren toda la superficie luminal de la mucosa la cual contiene varias invaginaciones tubulares y fosas gástricas (Gomes y col., 2011; Daniels y col., 2006).

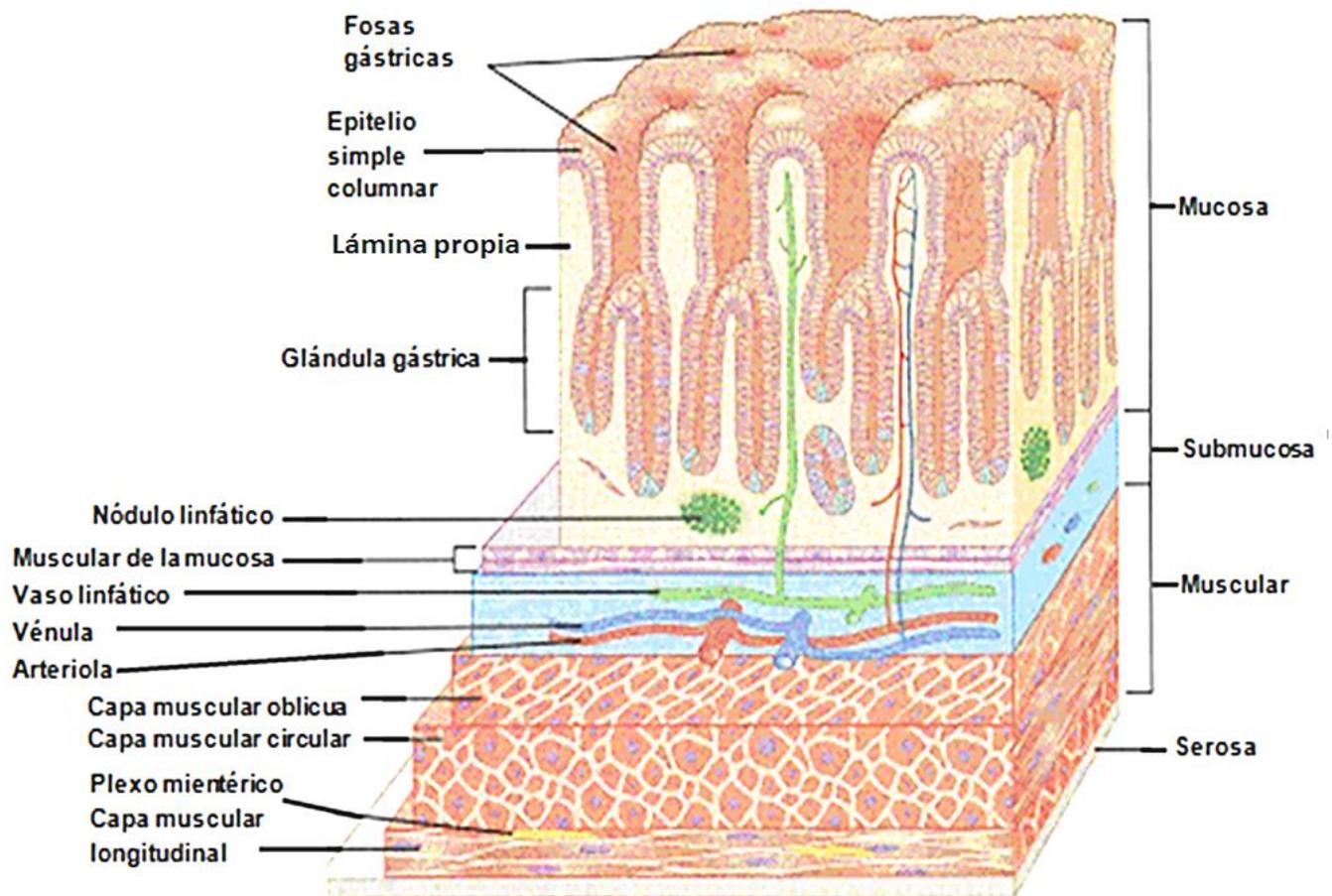


Figura. 2. Capas del estómago. (Tomado y modificado de Fox, 2011)

El examen microscópico de la mucosa gástrica muestra que está asimismo plegada. Las aberturas de tales pliegues en la luz del estómago se denominan fosas gástricas. Las células que revisten los pliegues secretan varios productos hacia el estómago; dichas células forman las glándulas gástricas que contienen varios tipos de células que secretan diferentes productos (Figura 3):

1. **Células mucosas del cuello**, las cuales secretan moco. Estas células revisten la superficie luminal del estómago y las fosas gástricas.
2. **Células parietales (oxínticas)**, las cuales secretan HCl.
3. **Células principales (o zimógenas)**, las cuales secretan pepsinógeno, una forma inactiva de la pepsina, enzima que hidroliza a las proteínas.

4. **Células tipo enterocromafines (ECL)**, situadas en el estómago y el intestino. Secretan histamina y 5-hidroxitriptamina (5-HT) como reguladores parácrinos del tubo digestivo.

5. **Células G**, que secretan la hormona gastrina hacia la sangre.

6. **Células D**, que secretan la hormona somatostatina.

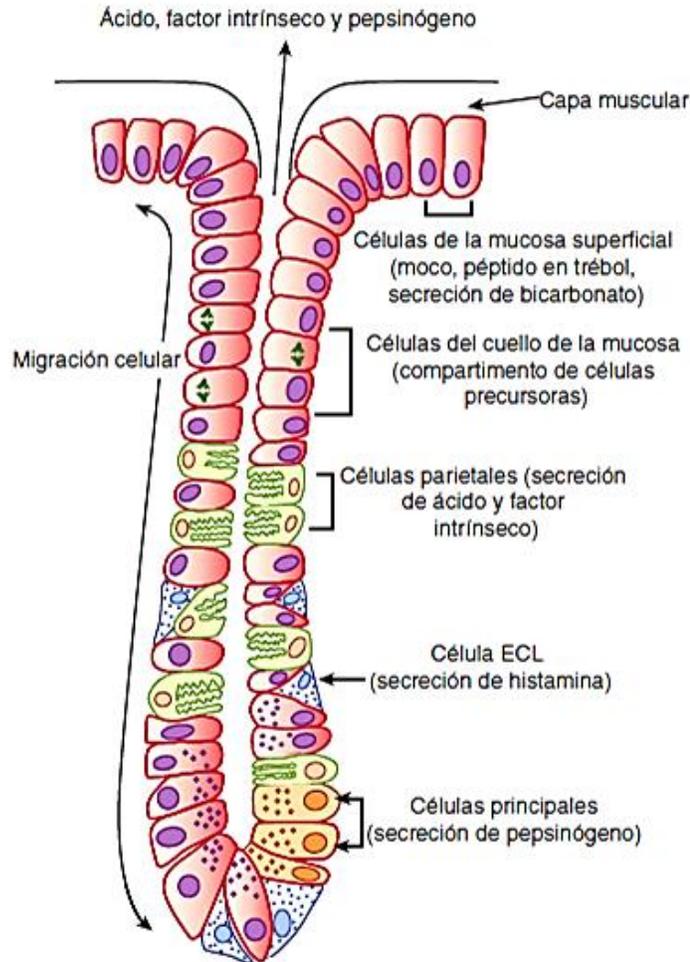


Figura 3. Estructura de una glándula gástrica del cuerpo del estómago. Se observan 4 tipos de células, las ECL, células principales, células parietales y las células mucosas del cuello. Con líneas se resalta la migración celular en el epitelio. (Tomado y modificado de Barrett, 2010).

La mucosa gástrica está compuesta por las glándulas ya mencionadas, en todo el estómago. En el cardias y la región pilórica, las glándulas secretan mayor cantidad de moco. En el cuerpo del estómago, las glándulas contienen mayor cantidad de células parietales, células principales y células tipo enterocromafines. En el antro y píloro del estómago se presentan con mayor frecuencia células G (Pérez y col., 2017; Daniels y col., 2006; Fox, 2011).

1.2. Fisiología de la secreción ácida en el estómago.

Se pueden distinguir tres fases en el proceso de secreción de jugo gástrico del estómago: la cefálica, la gástrica y la intestinal.

Fase cefálica. Tiene lugar antes de la entrada de los alimentos, la secreción es activada de modo predominante por los impulsos vagales que se originan en la región encefálica, en consecuencia el estómago libera péptido liberador de gastrina y acetilcolina iniciando con ello la función secretora (Fox, 2011). Las neuronas parasimpáticas del nervio vago estimulan también a las ECL; esta fase aporta el 30% de la secreción ácida.

Fase gástrica. Cuando los alimentos penetran en el estómago excitan los reflejos vagales, los reflejos entéricos locales y la liberación de la gastrina, esta fase representa el 50 % de la secreción gástrica.

Fase intestinal. La presencia de alimentos en el duodeno, induce la secreción de pequeñas cantidades de jugo gástrico. Está secreción supone el 20% de la secreción gástrica.

Existen tres estímulos principales para la secreción gástrica, la gastrina, la acetilcolina y la histamina; cada uno de ellos desempeña una función específica.

La gastrina es una hormona liberada por las células G del antro gástrico tanto en respuesta a un neurotransmisor específico secretado por las terminaciones nerviosas entéricas, conocido como péptido liberador de gastrina, como en respuesta a la presencia de oligopéptidos en la luz gástrica. La gastrina es transportada a través de la circulación sanguínea hasta las glándulas del fondo gástrico, donde se une a los receptores no sólo en las células parietales para la secreción activa de ácido, sino también en las ECL, que se hallan en la glándula y liberan histamina, que también estimula la secreción de ácido de la célula parietal al unirse a los receptores de histamina. Además, las células parietales y las principales también pueden ser estimuladas por la acetilcolina, la cual es liberada por las terminaciones nerviosas entéricas en el fondo gástrico (Figura 4). (Fox, 2011; Barrett, 2010)

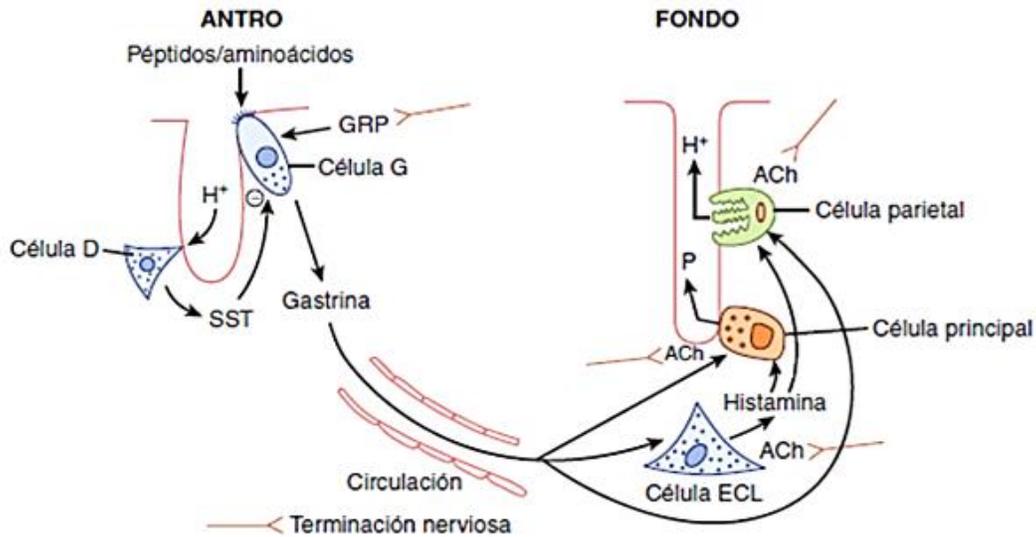


Figura 4. Estímulos de la secreción de ácido. SST: Somatostatina, ACh: Acetilcolina, P: Pepsinógeno, GRP: Péptido liberador de Gastrina. (Tomado y modificado de Barrett, 2010)

Cada uno de los tres agonistas de la célula parietal (gastrina, histamina y acetilcolina) se une a receptores diferentes en la membrana basolateral (“mirando” hacia los capilares sanguíneos de la lámina propia). La gastrina y la acetilcolina se unen a sus receptores que están acoplados a proteína G tipo q. Por la activación de esta proteína, su subunidad alfa se desprende y activa a la fosfolipasa C que se encuentra en la membrana, esta enzima va a liberar de los esfingolípidos de la membrana celular diacilglicerol e inositol trifosfato, este último eleva las concentraciones citosólicas de Ca²⁺ el cual junto con el DAG activan a la proteína cinasa C que fosforila y cambia la actividad de otras proteínas. Por su parte, la histamina se une a su receptor que está acoplado a una proteína G tipo s, por la activación de esta proteína, su subunidad alfa se desprende y activa la adenilato ciclasa que aumenta la concentración intracelular del segundo mensajero 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), este segundo mensajero activa la proteína cinasa A la cual fosforila y activa a su vez a varias otras enzimas. Así los tres mecanismos proceden a tener a la célula en un estado dinámico y activo durante la secreción gástrica.

Las células parietales llevan a cabo la secreción de ácido gracias a la ATPasa H⁺/K⁺. Estas células parietales están llenas de mitocondrias que suministran energía para impulsar a la ATPasa H⁺/K⁺. En reposo, las bombas de H⁺ están

secuestradas dentro de la célula parietal en una serie de compartimentos de membrana, los cuales se conocen como túbulo-vesículas, estas vesículas se fusionan con las invaginaciones de la membrana apical conocidas como canaliculos, con amplificación sustancial del área de la membrana apical y con posicionamiento de las ATPasas H^+/K^+ para comenzar la secreción de ácido (Figura 5).

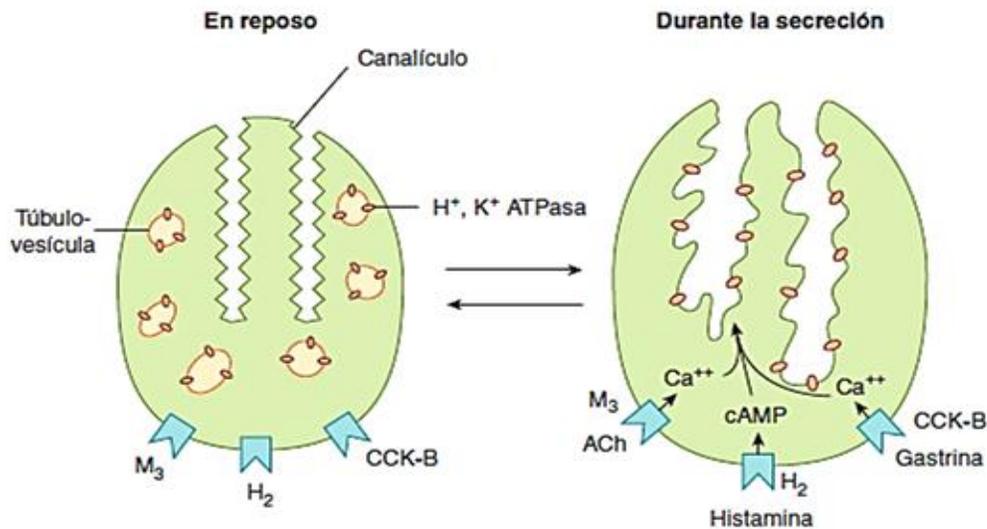


Figura 5. Célula parietal en reposo y durante la secreción. CCKB: Receptor B a Colecistocinina, M_3 : Receptor Muscarínico 3, cAMP: 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico. (Tomado y modificado de Barrett, 2010)

Al mismo tiempo, las membranas basolaterales de las células parietales introducen Cl^- contra su gradiente electroquímico al acoplar su transporte al movimiento descendente del bicarbonato (HCO_3^-) que producen tras disociar el ácido carbónico, formado por la enzima anhidrasa carbónica a partir de CO_2 y H_2O (Figura 6).

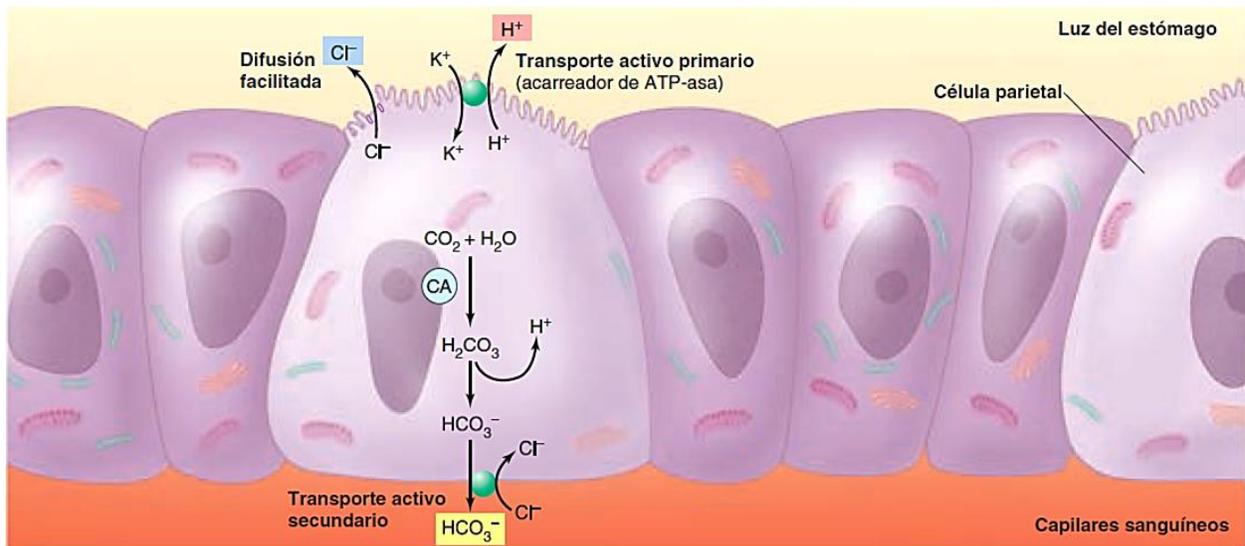


Figura 6. Mecanismos de transporte de iones en la célula parietal. CA: Anhidrasa carbónica.
(Tomado y modificado de Fox, 2011)

Las células parietales secretan H^+ hacia la luz gástrica por transporte activo primario (y hacen descender el pH hasta 0.8). La poderosa acidez producida sirve para las siguientes funciones:

1. Un pH bajo desnaturaliza las proteínas ingeridas, dejándolas en su estructura nativa volviéndolas más digeribles.
2. Bajo condiciones ácidas, el zimógeno pepsinógeno digiere en forma parcial a otras moléculas de pepsinógeno, lo que libera la actividad completa de la enzima pepsina (Fox, 2011; Barrett, 2010; Hall, 2016; Lehninger, 2005).

1.3. Estructura y mecanismo de la ATPasa K^+/H^+ gástrica.

En el canalículo de la célula parietal, la ATPasa puede tener acceso a KCl de la región extracelular e intercambiar un H^+ intracelular por el K^+ extracelular. La ATPasa es una enzima α,β -heterodimérica (Figura 7A) La subunidad α contienen los centros catalíticos de la enzima y forman el poro de la membrana a través del cual tiene lugar el transporte de iones. Contiene 10 segmentos transmembranales y 3 dominios citosólicos: N unión a nucleótido, P sitio de fosforilación y A sitio de activación (Figura 7B). La subunidad β tiene un segmento transmembranal además de 3 puentes disulfuro en su región luminal (Shin y col., 2013).

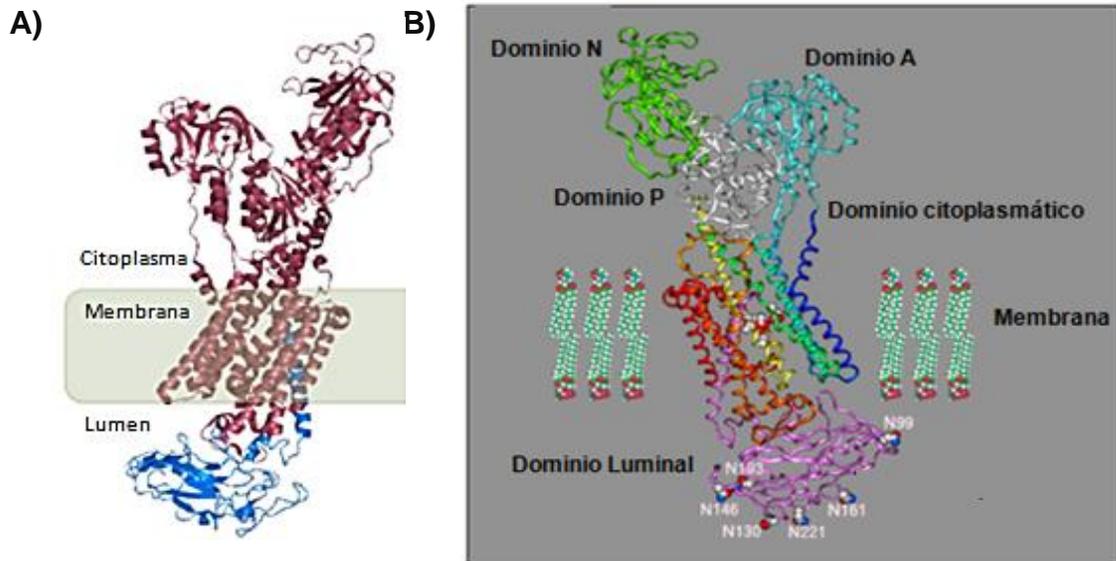


Figura 7. Estructura de la ATPasa H^+/K^+ . En A) la subunidad α se muestra en color rosa; la subunidad β se muestra en azul. En B) se muestran los dominios de cada una de ellas (Tomado y modificado de Shin y col., 2013)

La ATPasa H^+/K^+ tiene una vida media de 54 h y cerca del 20% de las nuevas ATPasas son sintetizadas después de 24 h además de que es mejor la síntesis en la noche que durante el día (Shin y col., 2013).

Estas ATPasas de H^+/K^+ , transportan H^+ contra un gradiente de concentración de un millón a uno hacia la luz del estómago (Fox, 2011).

En la figura 8 se puede observar el mecanismo de reacción de la enzima. En el lado citoplasmático, un H^+ se une a la ATPasa con gran afinidad en una conformación llamada E_1 , el paso inicial es la unión reversible de ATP a la enzima seguido de la transferencia de un fosfato del ATP con Mg^{2+} y el H^+ (E_1-P-H^+). Después, se lleva a cabo un cambio de conformación a E_2-P-H^+ que es un estado que tiene mayor afinidad por K^+ y baja afinidad por H^+ . Esto permite la liberación del H^+ y la unión de K^+ de la superficie extracitoplasmática de la enzima (E_2-P-K^+). Al desfosforilarse la enzima, se presenta un nuevo cambio conformacional a (E_1-K^+), con baja afinidad a K^+ lo que permite su liberación de la parte citoplasmática de la enzima, permitiendo el reenlace de otro H^+ (Shin y col., 2013).

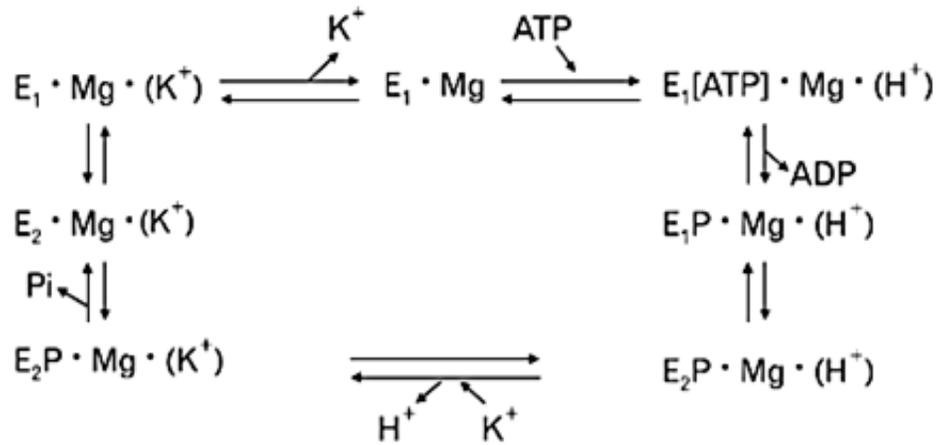


Figura 8. Ciclo catalítico de la ATPasa H⁺/K⁺. (Tomado y modificado de Shin y col., 2013)

1.4. Mecanismos de defensa de la mucosa gástrica.

El variado rango de funciones realizadas por el estómago se mantienen en un ambiente luminal hostil (HCl y proteasas agresivas). Debido a esto son necesarios un gran número de mecanismos de defensa para prevenir el daño local y mantener la integridad funcional y estructural del tejido gástrico (Ham y col., 2012; Gomes y col., 2011).

Los mecanismos de defensa de la mucosa incluyen la integridad de la mucosa gástrica, la secreción de moco, la producción de bicarbonato, el óxido nítrico, la síntesis de las prostaglandinas gastroprotectoras y una adecuada microcirculación (Ham y col., 2012).

La primera línea de la defensa gástrica está formada por el moco, el bicarbonato y los fosfolípidos surfactantes; que cubren la superficie de la mucosa. El moco gástrico consiste de un gel viscoso elástico adherente y transparente formado por 95 % agua y 5 % glicoproteínas de mucina (Gomes y col., 2011). El gel está compuesto por polímeros de 4 subunidades de mucina unidas por puentes disulfuro. (Pérez y col., 2017, Ham y col., 2012).

La siguiente línea de protección es la capa continua de células epiteliales superficiales mencionada anteriormente. Es posible la reepitelización por el reemplazamiento de células dañadas o envejecidas por una bien controlada y coordinada proliferación de células progenitoras y la migración celular regulada

por la familia de factores de crecimiento secretados abundantemente en la superficie epitelial (Gomes y col., 2010). Esto permite el reemplazo de todo el epitelio cada tres días, de manera que las células dañadas pueden sustituirse con celeridad (Fox, 2011).

Cuando los tejidos son expuestos a diversos estímulos fisiológicos y patológicos, los ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido araquidónico, son liberados de los fosfolípidos de la membrana por la acción de la fosfolipasa A2. Éste ácido puede ser metabolizado por tres vías, una de ellas es la de la ciclooxigenasa en donde el ácido araquidónico es convertido a una variedad de eicosanoides incluyendo las prostaglandinas (PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2) y el tromboxano (TXA_2) (Ham y col., 2012).

Las prostaglandinas estimulan la secreción de moco y bicarbonato, aumentan el flujo sanguíneo y la cantidad de compuestos sulfhidrilos (Gomes y col., 2010).

Hay 2 isoformas de ciclooxigenasa COX-1 y COX-2. La COX-1 es constitutiva y es expresada en una amplia gama de células y tejidos, mientras que la COX-2 es una enzima que se sintetiza como una respuesta media-temprana. La COX-2 está ausente normalmente en la mayoría de las células pero es altamente inducible en respuesta a un estímulo inflamatorio como endotoxinas, citocinas y hormonas.

La PGI_2 es el tipo principal de prostaglandina en el tracto gastrointestinal y juega un papel clave en la citoprotección de las superficies de la mucosa gástrica y de la vasculatura normal (Ham y col., 2012).

La modulación de la microcirculación de la mucosa gástrica juega un rol esencial en el mantenimiento de la integridad de la mucosa al entregar oxígeno y nutrientes y remover las sustancias tóxicas, en la restitución epitelial, y justo en la exposición de la mucosa gástrica a la fuga de ácido ya que promueve un aumento en el flujo sanguíneo de la mucosa, para diluirlo (Gomes y col., 2010).

Varios compuestos químicos con estructura no relacionada dañan la mucosa gástrica, induciendo lesiones que tienen elementos histopatológicos comunes

como hemorragia y necrosis del epitelio de la mucosa. Los radicales libres están involucrados en muchos procesos patológicos como la inflamación, el daño del tejido causado por isquemia y reperfusión, radiación o químicos (Pihan y col. 1987).

1.5. Generalidades de la úlcera péptica, factores y etiología.

La **úlcera péptica** es una herida de la mucosa del estómago o del duodeno que se extiende a la muscular de la mucosa o más allá de la muscular de la mucosa, si la profundidad es menor y solo afecta a la mucosa se llama erosión y en ocasiones una úlcera puede profundizar aún más e incluso puede perforar el estómago (Figura 9).

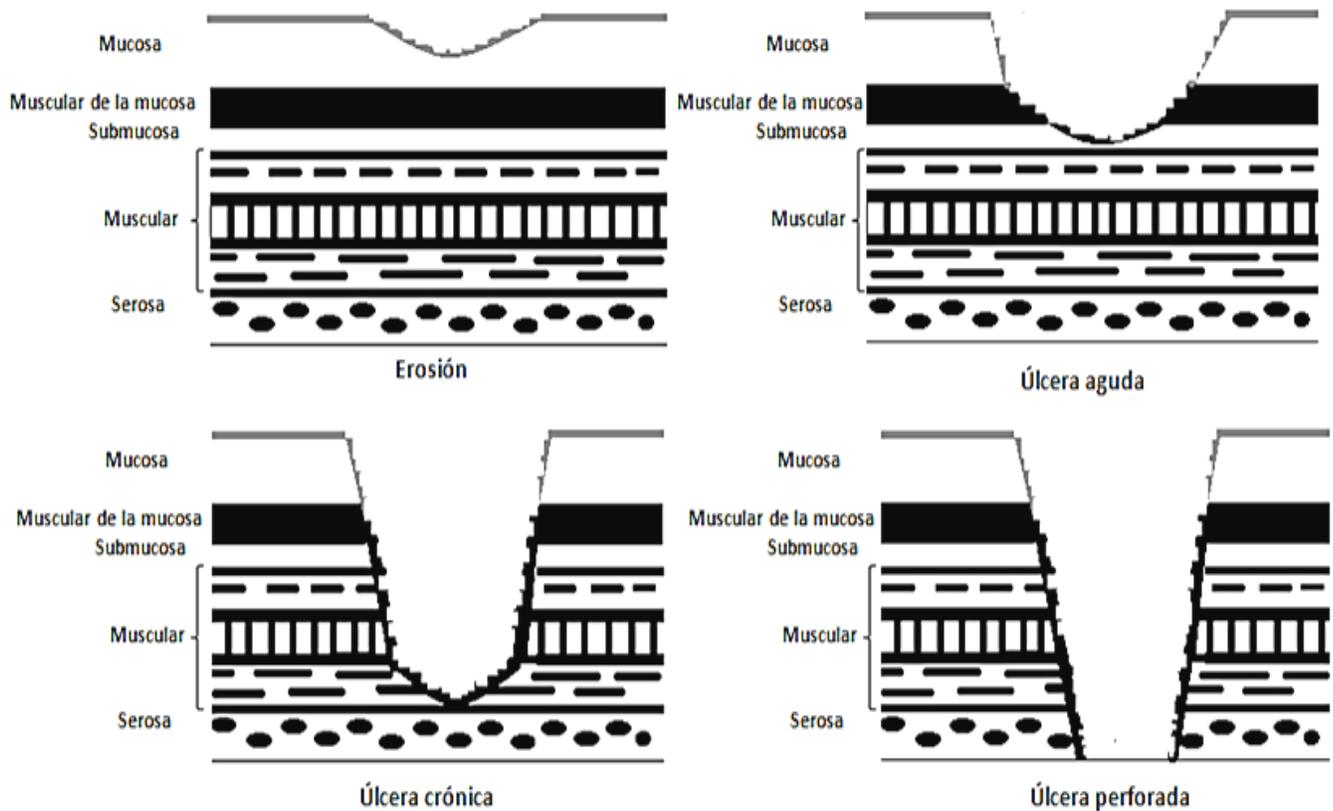


Figura 9. Tipos de herida de la mucosa gástrica. (Tomado y modificado de Frison, 1990)

No se cree que las úlceras del estómago se deban a una secreción ácida excesiva, sino a mecanismos que reducen las barreras de la mucosa gástrica a la autodigestión; ya que cuando esta barrera gástrica contra la autodigestión se

daña, el ácido puede fugarse hasta la submucosa, causar un daño directo y estimular la inflamación. La histamina liberada por las células cebadas (o mastocitos) durante la inflamación puede estimular aún más la secreción ácida y así causar un daño adicional a la mucosa.

En general la úlcera péptica es causada por un desequilibrio entre los mecanismos protectores de la mucosa y los factores nocivos para la mucosa que son entre otros, la secreción de HCl y pepsinógeno, las sales biliares, las especies reactivas del oxígeno, la infección con *Helicobacter pylori*, la ingesta de alcohol y el consumo prolongado de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) (Figura 10) (Fox, 2011; Frison, 1990; Malfertheiner y col., 2009; Barrett, 2010; Gomes y col., 2010; Pérez y col., 2017).

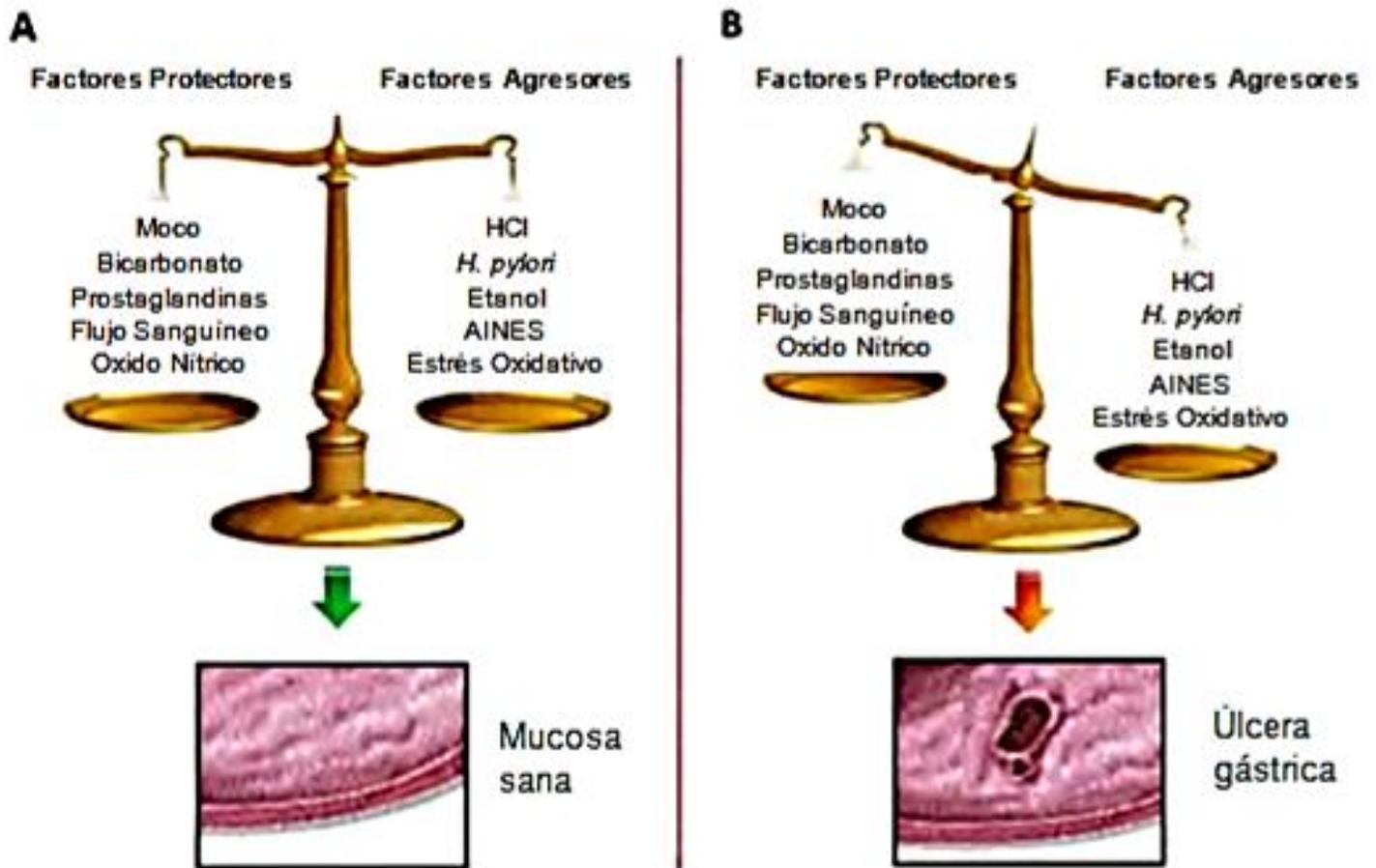


Figura 10. Causas de la úlcera péptica. A) Equilibrio entre factores protectores y factores agresores = mucosa sana, B) Desequilibrio entre estos factores = úlcera gástrica. (Tomado y modificado de Gomes y col., 2010)

Las úlceras pépticas pueden clasificarse en primarias y secundarias. Las primarias son usualmente crónicas con heridas fibrinopurulentas sobre infiltrado inflamatorio activo, tejido de granulación y fibrosis, estas son más frecuentes en el duodeno; las secundarias son aquellas que ocurren en la presencia de una enfermedad sistémica subyacente, usualmente son más agudas al comienzo y frecuentemente son inducidas por estrés fisiológico o consumo de medicamentos y son más frecuentes en el epitelio gástrico (Dohil y col., 2011). Entre los síntomas de la úlcera péptica están el dolor epigástrico, sensación de plenitud, distensión abdominal, saciedad precoz, náuseas (Pérez y col., 2017). Las úlceras pépticas pueden transcurrir con necrosis del tejido provocada por la isquemia de la mucosa, formación de radicales libres y el cese de la distribución de los nutrientes, todos causados por una herida vascular o microvascular como trombos, constricción u otras oclusiones (Tarnawski y col., 2005).

Actualmente los dos factores etiológicos más importantes asociados al desarrollo de la úlcera péptica son la infección por *H. pylori* y el uso excesivo de AINES (Pérez y col., 2017).

Más del 50% de la población mundial tiene una infección crónica de la mucosa gástrica por *H. pylori* y solo el 10-15% de ésta proporción generan úlceras, mientras que del 1-2% de estos sujetos, a la larga, presentan linfoma tipo MALT o adenocarcinoma gástrico (Malfertheiner y col., 2009; Gomes y col., 2010).

H. pylori es una bacteria con forma de bacilo, Gram (-), multiflagelada lo que le permite impulsarse en el moco de la mucosa y con esto colonizar el epitelio del antro en el estómago y es capaz de neutralizar el HCl con amoníaco producido por su ureasa.

La producción de amoníaco por *H. pylori* en el epitelio superficial y en las glándulas del antro evita que las células D en las glándulas detecten el verdadero nivel de acidez, lo que lleva a una liberación inapropiada de somatostatina, provocando una hipergastrinemia y a su vez un aumento de secreción de ácido por las células parietales (Malfertheiner y col., 2009).

nivel de acidez, lo que lleva a una liberación inapropiada de somatostatina, provocando una hipergastrinemia y a su vez un aumento de secreción de ácido por las células parietales (Malfertheiner y col., 2009).

La lesión gástrica causada por *H. pylori* se desarrolla por la destrucción de la mucosa, la inflamación y la muerte celular de la mucosa.

H. pylori libera ciertos factores quimiotácticos que causan una respuesta inflamatoria, promoviendo la liberación de IL-8 y IL-1 β de las células epiteliales, lo que promueve la infiltración de neutrófilos y macrófagos lo que potencia la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS). Además expresa una arginasa, que degrada la arginina, sustrato de la óxido nítrico sintasa para la producción de óxido nítrico por las células del epitelio gástrico. (Pérez y col., 2017) Ya que la integridad de la mucosa gástrica depende de la síntesis de las prostaglandinas por la ciclooxigenasa, los AINES, al actuar como inhibidores de esta enzima, impiden la producción de prostaglandinas y por ende sus efectos beneficiosos (Pérez y col., 2017; Malfertheiner y col., 2009).

1.6. Tratamientos para la úlcera péptica.

El objeto del desarrollo de las terapias medicinales para el tratamiento de la úlcera péptica se ha dirigido en fortalecer los factores defensivos y disminuir los factores agresivos. Así, los tratamientos pueden ayudar a reforzar la barrera de la mucosa (misoпростol, sucralfato, carbenoxolona, y las sales de bismuto) a neutralizar el ácido gástrico (antiácidos) y a reducir la secreción de ácido gástrico [antagonistas de los receptores a histamina H₂ (AH₂R), los antagonistas de la gastrina, los anticolinérgicos y los inhibidores de la bomba de protones (IBP)].

El misoпростol es un análogo de las prostaglandinas y por ende tiene sus mismos efectos en la mucosa gástrica inhibe la secreción basal de ácido gástrico, y la estimulación de la síntesis estimulada por alimentos, histamina, gastrina y cafeína, también incrementa la irrigación de la mucosa y potencia la secreción de moco y bicarbonato; sus efectos adversos engloban diarreas, contracciones abdominales y puede provocar contracciones uterinas, por lo que no se debe

administrar a mujeres embarazadas; **el sucralfato** es un complejo de hidróxido de aluminio y sacarosa sulfatada que en medio ácido produce un gel viscoso que se adhiere a las glicoproteínas de los bordes de la úlcera, protegiéndola; los efectos adversos son escasos, siendo el más habitual el estreñimiento, otras reacciones menos frecuentes son la xerostomía, las náuseas, los vómitos, las cefaleas y los exantemas; **la carbenoxolona** es un derivado del ácido glicirretínico con estructura similar a los esteroides de la raíz del regaliz que aumenta la secreción de prostaglandinas y estimula la secreción de moco a nivel local; entre sus efectos adversos están diarreas y retortijones abdominales; **las sales de bismuto** forman un complejo con las proteínas en medio ácido y poseen la capacidad de fijar los aniones cloruro del jugo gástrico, con esto son capaces de cubrir y proteger del HCl a la mucosa gástrica, además de tener cierto efecto antimicrobiano contra *H. pylori*; los efectos adversos consisten en náuseas, vómitos y coloración negruzca de la lengua y las heces.

Los antiácidos son sustancias que al ser ingeridas reaccionan *in situ* con HCl del estómago disminuyendo la acidez y se clasifican en dos grupos: **los sistémicos (bicarbonato y citrato sódico)** que por sus características de solubilidad se absorben a nivel gastrointestinal y pasan a la circulación donde se eliminan vía renal, en grandes dosis normalmente presentan problemas como alcalosis sistémica, desequilibrios electrolíticos, alcaliuria, litiasis renal y retención de fluidos; y los **no sistémicos** que por su insolubilidad no se absorben y por lo tanto se eliminan vía fecal, los cuales a su vez se dividen en 2 tipos, **los tamponados** que limitan la elevación del pH a valores próximos a 4, entre otros están el **carbonato de aluminio, gel de hidróxido de aluminio, gel de fosfato de aluminio, trisilicato de magnesio**, son compuestos que en tratamientos prolongados pueden provocar una deficiencia de fósforo y por ende debilidad de la estructura ósea, esto debido a que el tricloruro de aluminio que se forma reacciona con el fosfato de la dieta, el aluminio retarda el vaciamiento gástrico y tiene efecto astringente sobre el colon, el magnesio tiene un efecto laxante, su eliminación depende totalmente del riñón, por lo tanto pacientes con falla renal pueden

desarrollar hipermagnesemia, sed, hipotensión y depresión respiratoria; y **los no tamponados** que son capaces de elevar el pH por encima de 7 que entre otros están el **carbonato de calcio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, óxido de magnesio**, el carbonato presenta el problema de rebote, hipersecreción continua de HCl debido a que estimula la secreción de gastrina y también tiene una acción astringente, entre otros problemas se presentan hipercalcemia, alcalosis sistémica, nefroalcalosis, litiasis renal y calcificación metastásica.

Entre los inhibidores de la secreción ácida (Figura 13) están **los AH₂R** como **la cimetidina, ranitidina, nizatidina y famotidina** que inhiben competitivamente la acción de la histamina sobre todos los receptores H₂, su principal utilidad clínica es como inhibidores de la secreción ácida gástrica. Estos fármacos reducen la secreción ácida basal y estimulada por los alimentos en un 90% o más y favorecen la cicatrización de las úlceras duodenales. No obstante, las recurrencias son frecuentes tras la interrupción del tratamiento.

Los efectos adversos son poco frecuentes, se han descrito diarreas, mareos, mialgias, alopecia, exantemas transitorios e hipergastrinemia. La cimetidina puede ocasionar ginecomastia en varones y, rara vez, disminución de la función sexual, debido probablemente a una ligera afinidad por los receptores androgénicos. Este AH₂R inhibe al citocromo P450, puede retrasar el metabolismo y potenciar el efecto de diversos fármacos, como anticoagulantes orales y antidepresivos tricíclicos.

Los antagonistas de la gastrina promueven una inhibición competitiva de la secreción de ácido gástrico, su máximo representante es **la proglumida**, este fármaco favorece la cicatrización de la úlcera péptica, sin embargo, su eficacia es claramente inferior a la de otras medicaciones disponibles, por lo que ha tenido muy escasa divulgación.

Los anticolinérgicos como **la pirenzepina y la atropina** tuvieron un máximo de difusión en la década de los 60, poseen una acción bloqueadora muscarínica, inhiben la influencia neurógena sobre la célula parietal reduciendo la secreción de HCl y pepsina con menor potencia que los AH₂R; su problema es que se requieren

de dosis altas para lograr estos efectos deseados y originan varias reacciones adversas derivadas del bloqueo adrenérgico como sequedad de boca, taquicardia, retraso en el vaciamiento gástrico, visión borrosa y problemas para la micción (Martin y col., 1993; Malfertheiner y col., 2009; Rang y col., 2008).

Los IBP, entre ellos **el omeprazol, lansoprazol, esoprazol, pantoprazol, rabeprazol** son profármacos que se degradan rápidamente en niveles bajos de pH, si se administran oralmente se presentan en cápsulas o tabletas con revestimiento entérico. Tras ser absorbidos en el intestino, pasan a la sangre y de la sangre a las células parietales y posteriormente pueden acumularse en el espacio ácido del canalículo secretor de la célula parietal, esto es su primera propiedad importante, dándoles una concentración en la superficie luminal 1000 veces mayor que en la sangre. El segundo paso vital es la conversión a su forma activada y ya activados inhiben a la ATPasa H^+/K^+ por una unión covalente a las cisteínas cercanas a la entrada del ión. Es recomendado que se tomen 30 min antes de la comida para asegurarse que las ATPasas H^+/K^+ estén activas.

Asumiendo que cerca del 70% son activadas por el desayuno y que los IBP son suministrados 30-60 min antes, se puede calcular que un estado de inhibición estable en una dosis diaria es cercano al 66% de la secreción ácida máxima. La vida media de los IBP unidos es la misma que la de la enzima, pero la vida media de la restauración de la actividad de la enzima es de 15 h y la vida media del omeprazol unido a la enzima es de 12 h. Los efectos adversos son infrecuentes y consisten en cefaleas, diarrea y exantemas. Se han descrito también mareos, somnolencia, confusión mental, impotencia, ginecomastia y artromialgias (Al-Badr, 2010; Shin y col., 2013; Rang y col., 2008).

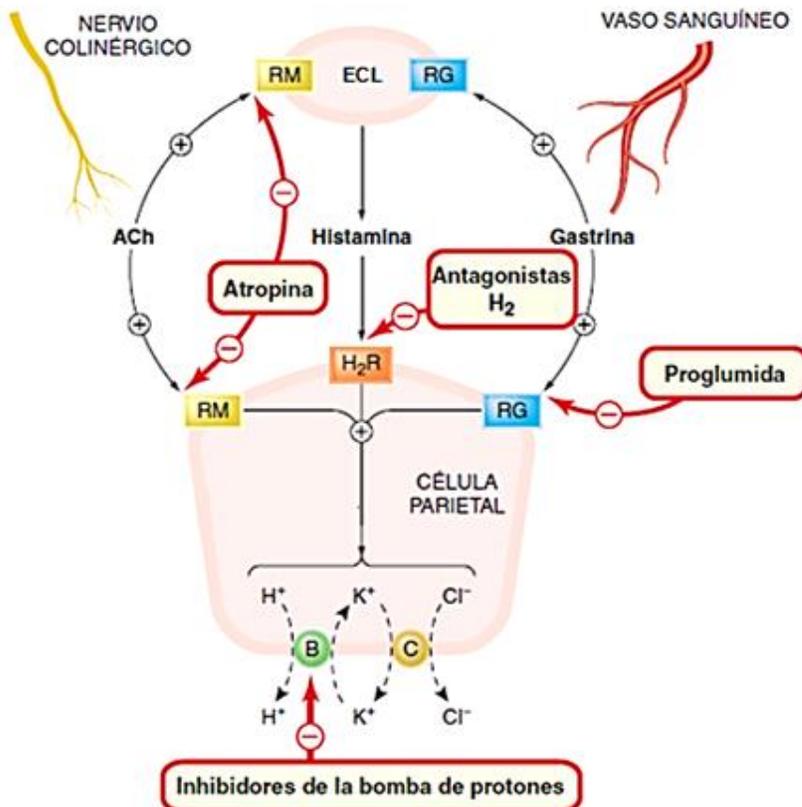


Figura 13. Acción de los fármacos que influyen en la secreción ácida. Además se señala la acción de los secretagogos sobre la célula parietal y la célula tipo enterocromafin (ECL). Receptor Muscarínico, RG: Receptor de Gastrina (CCKB), H₂R: Receptores a Histamina, B: ATPasa H⁺/K⁺, C: Simportador para K⁺ y Cl⁻, PGE₂: Prostaglandina E₂, ACh: Acetilcolina. (Tomado y modificado de Rang y col., 2008.)

El primer IBP usado clínicamente fue el omeprazol que es una base débil con pKas de 4.61 y 9.08, presenta dos máximos de absorción en espectroscopía ultravioleta a 276 nm y 302 nm (Figura 14)

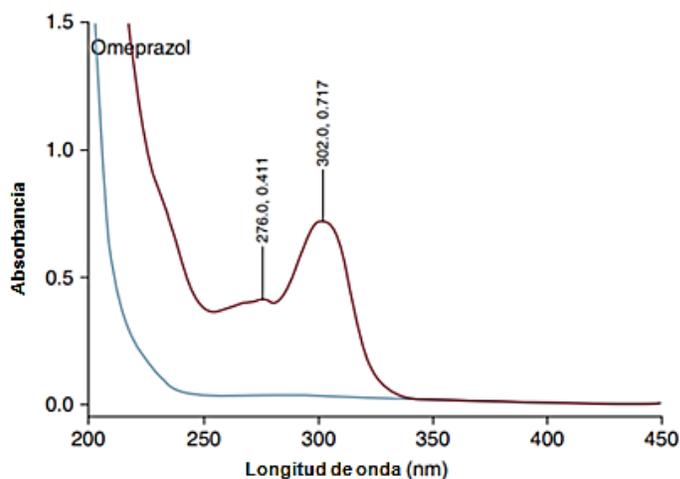


Figura 14. Espectro de absorción de UV del Omeprazol. (Tomado y modificado de Al-Badr, 2010.)

En un pH de 1 puede ser activado y formar sulfenamidas o ácido sulfénico, estos compuestos tiofílicos reaccionan con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas en la ATPasa para formar disulfuros relativamente estables.

La estequiometría del omeprazol es de 2 moles de omeprazol unido a un mol de la fosfoenzima y solo se une a la subunidad α en los sitios Cys 813 y Cys 892. El Lansoprazol se une en los sitios Cys 813 y Cys 321, el Pantoprazol se une en los sitios Cys 813 y Cys 822 (Al-Badr, 2010; Shin y col., 2013).

La infección por *Helicobacter pylori* se ha implicado como factor etiológico en la aparición de úlceras gástricas y duodenales como ya se mencionó anteriormente y representa un factor de riesgo del cáncer gástrico. Por supuesto, la erradicación de la infección por *H. pylori* favorece la resolución rápida y prolongada de las úlceras y habitualmente se efectúa una prueba para detectar a este microorganismo en pacientes con síntomas indicativos. Si los resultados son positivos, el patógeno se puede erradicar por medio de una pauta de triple terapia de 1 o 2 semanas de duración. La triple terapia suele combinar un IBP con los antimicrobianos amoxicilina y metronidazol o claritromicina, aunque también se emplean otras combinaciones.

A veces, en particular en la pauta de 2 semanas, se añaden sales de bismuto. A pesar de que la eliminación de la bacteria puede causar una resolución prolongada de las úlceras, se puede producir una reinfección por el microorganismo.

Para el tratamiento de la úlcera péptica se da una dosis única de 20 mg oral o 40 mg de omeprazol en casos severos por 4 semanas para úlceras duodenales y por 8 semanas para úlceras gástricas. Terapias triples efectivas incluyen 20 mg de omeprazol dos veces al día combinado con amoxicilina 500 mg y metronidazol 400 mg ambos cada 8 h; con claritromicina 500 mg y metronidazol 400 mg ambos cada 12 h, o con amoxicilina 1 g y claritromicina 500 mg ambos cada 12 h (Malfertheiner y col., 2009; Rang y col., 2008; Al-Badr, 2010).

1.7. Calidad de resolución de úlcera péptica.

La úlcera es una enfermedad crónica caracterizada por repetidas curaciones y recurrencias en el lugar original o en cualquier parte de la mucosa durante toda la vida del paciente (Kangwan y col., 2014; Arakawa y col. 2012).

Varios estudios han demostrado que en el proceso de resolución de la úlcera, la inhibición de la secreción de ácido o la erradicación de *H. pylori* son insuficientes para completar este proceso, ya que la disminución de las prostaglandinas y el aumento de EROS conducen a la variación en la calidad de la resolución de la úlcera que está íntimamente relacionada con la recurrencia de la misma (Kangwan y col., 2014).

La persistencia de la inflamación crónica demostrada por la presencia de infiltración aumentada de neutrófilos y macrófagos es la base de la recurrencia de la úlcera (Arakawa y col., 2012).

La resolución de la úlcera es un proceso complejo el cual envuelve migración celular, proliferación, reepitelización y angiogénesis que al final conduce a la formación de la cicatriz (Tarnawski y col., 2005).

Este concepto de calidad de resolución de úlcera se basa en la madurez histológica del tejido regenerado en el área de la úlcera; la cual recientemente se ha conseguido con el uso de productos naturales lo que les ha dado un interés creciente, por los mínimos efectos adversos, el bajo costo y por ser un recurso potencial para el tratamiento anti-úlcera (Kangwan y col., 2014).

Cuando la mucosa gástrica es expuesta a agentes dañinos (alcohol, *H. pylori*, ácido, estrés oxidante) se produce la ruptura de la capa de moco, bicarbonato y fosfolípidos, también la exfoliación del epitelio superficial y con la pérdida de esta barrera y de otras capas de la mucosa más profundas (incluyendo células endoteliales microvasculares) se produce la estasis, el cese de aporte de oxígeno y nutrientes y por ende se genera hipoxia y necrosis.

La hipoxia activa el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1 α), induciendo así la expresión a la alta del factor de crecimiento endotelial vascular VEGF, el cual es necesario para la angiogénesis, proceso esencial para la

restauración de la microcirculación en la mucosa y crucial para el aporte de nutrientes y oxígeno (Kangwan y col., 2014).

Numerosos neutrófilos y macrófagos persisten en y por debajo de un epitelio regenerado incluso después de la resolución de la úlcera. Cuando existen muchos macrófagos infiltrados en el tejido de la cicatriz es mayor la probabilidad de una futura recurrencia de la úlcera ya que estos producen cantidades aumentadas de IL-1 β , TNF α y MCP-1 que activan y estimulan macrófagos, lo que es un circuito de auto perpetuación de la inflamación. Esta estimulación aumentada puede causar que estos macrófagos liberen estas citocinas que pueden atraer y acumular a neutrófilos que liberan proteasas y EROS que dañan el tejido de la cicatriz e inducen la recurrencia de la úlcera (Kangwan y col., 2014; Arakawa y col., 2012).

La resolución de este daño es un proceso organizado de llenado del defecto de la mucosa con células epiteliales y de tejido conectivo, incluyendo la proliferación celular, migración, diferenciación, regeneración, angiogénesis activa y la reposición de la matriz extracelular, llevando así a la formación de la cicatriz (Kangwan y col., 2014).

La mucosa del margen de la úlcera forma una característica zona de resolución donde las glándulas comienzan a dilatarse, las células que las cubren experimentan una desdiferenciación, expresan receptores a factores de crecimiento como el EGF-R y proliferan activamente lo que es esencial para la resolución de la úlcera gástrica ya que esto suplirá a las células epiteliales, proceso crucial para la reepitelización de la capa de la mucosa y la reconstrucción de las glándulas gástricas ya que estas células migran desde el margen de la úlcera hasta el tejido de granulación. Ésta migración depende de los rearrreglos citoesqueléticos (filamentos de actina, microtúbulos, etc) que juegan un papel importante en la estructura, forma y movilidad de la célula.

El tejido de granulación se genera en la base de la úlcera 48-72 h después de la ulceración, el cual está conformado por células de tejido conectivo proliferantes como macrófagos, fibroblastos y células endoteliales proliferantes que formarán

los microvasos durante el proceso de angiogénesis. Este tejido es un componente importante en la resolución de la úlcera ya que provee células de tejido conectivo para restablecer la lámina propia y microvasos para la restauración de la microcirculación dentro de la cicatriz de la úlcera (Tarnawski y col., 2005).

El resultado final del proceso de resolución refleja una interacción dinámica entre el componente epitelial de la zona de resolución en el margen de la úlcera y el componente de tejido de granulación (Kangwan y col., 2014).

1.8. Modelos de ulceración.

La resolución de la úlcera y la prevención de la recurrencia en el tratamiento de la úlcera gástrica pueden ser estudiadas utilizando varios modelos animales, entre ellos, las úlceras inducidas por la administración de AINES, etanol, ácido acético y la ligación del píloro (Bi y col., 2014).

Los modelos experimentales en animales del daño gástrico generalmente se separan en dos categorías. Por un lado, aquellos que implican varias agresiones que rápidamente producen abundantes y profundas heridas, por ejemplo, la administración intragástrica de NaCl 1-4 M, de etanol absoluto o de agua hirviendo. Este exceso de daño está más allá de cualquiera encontrado en la patofisiología de la úlcera gástrica, no obstante, aporta información de confianza en la rápida respuesta celular y tisular al daño. Por otra parte, están los modelos donde otras cuantas agresiones producen lesiones diseminadas de magnitud y localización variable en un tiempo de horas a meses, como la infección por *Helicobacter*, la administración de AINES y el estrés físico (Ham y col., 2012).

1.9. Histología gástrica del ratón.

Los mamíferos del laboratorio son ampliamente usados para la investigación biomédica moderna, frecuentemente son también utilizados como modelos para la investigación en humanos.



Figura 15. Ratones de laboratorio. Miguel Ángel González Téllez 2017

La morfología de los estómagos de los mamíferos difiere considerablemente entre especies, aunque exhiben varias similitudes básicas estructurales. Esta morfología está ampliamente influenciada por la adaptación, la naturaleza del alimento, la frecuencia con la que se alimentan, duración y necesidad de guardar alimento, tamaño y forma del cuerpo. El estómago de ratón consiste en dos distintas partes, la no glandular o *forestomach* (estómago delantero) que es grisáceo de pared delgada y un poco transparente y la parte del estómago verdadero, glandular y de pared gruesa (Ghoshal y col., 1989).

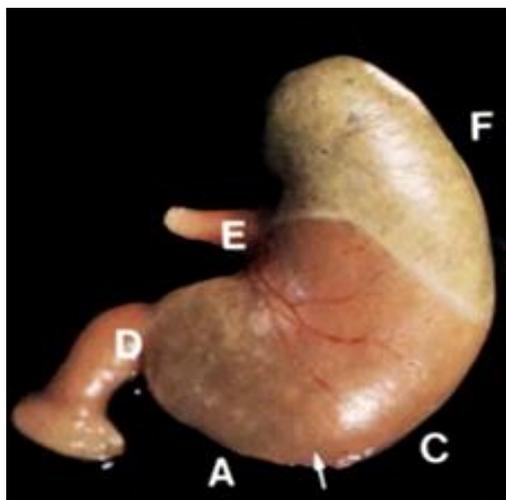


Figura 16. Estómago de un ratón. En donde se muestra la conexión con el esófago (E), la conexión con el Duodeno (D), la parte del *Forestomach* (F), el antro (A) y el cuerpo (C), con la flecha blanca se señala la separación del Antro y el Cuerpo. (Tomado y modificado de Ghoshal y col., 1989)

La mucosa del estómago no glandular está compuesta de un epitelio estratificado y escamoso y una lámina propia sin glándulas. La mucosa del estómago glandular está conformada por un epitelio columnar, la lámina propia está a su vez formada por glándulas gástricas tubulares simples, las células que constituyen a las glándulas se distribuyen en tres zonas: células principales con una intensa basofilia ocupan la tercera parte inferior de la glándula, las células parietales que se presentan en la mitad superior de la glándula y las células de cuello que se encuentran más cercanas a la abertura de los pozos en la parte superior de las glándulas tubulares. Estas glándulas se dividen a su vez en dos tipos: zimogénicas y mucosas (Figura 17). La capa muscular de la mucosa es delgada, la submucosa consiste de tejido conectivo con vasos sanguíneos, la túnica muscular es gruesa y consiste de una capa interior espiral y una capa exterior oblicua circular (Ghoshal y col., 1989; Lee y col., 1892).

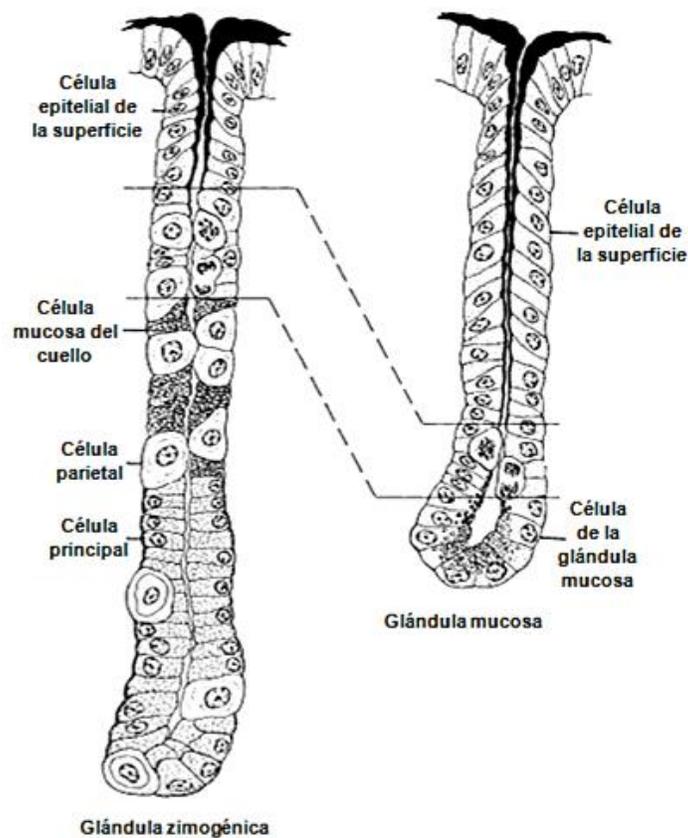


Figura 17. Tipos de glándulas de la mucosa gástrica de un ratón. Glándulas con las principales células que las componen. (Tomado y modificado de Lee y col., 1892)

1.10. Daños a la mucosa gástrica y consecuencias del etanol.

El etanol causa lesiones en la mucosa del estómago, bandas hemorrágicas que, macroscópica e histológicamente, están constituidas de áreas necróticas con erosiones y úlceras rodeadas por hemorragia y edema en la submucosa (Pihan y col., 1987).

Algunos de los factores involucrados en estas lesiones provocadas por el etanol son: disminución de la producción de moco, incremento de la generación de radicales libres, disminución de la motilidad gástrica, disminución de la cantidad de glutatión reducido y compuestos sulfhídricos (unidos a proteínas y libres), aumento en la liberación de histamina, disminución de la producción de prostaglandinas, disminución del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica, estasis y fuga de plasma (Glavin y col., 1992; Gomes y col., 2011; Peskar y col., 1896; Mutoh y col., 1990; Loguercio y col., 1993).

El etanol causa gastritis hemorrágica aguda, generando un edema en la mucosa gástrica y congestión vascular. Inmediatamente después de la administración intragástrica de etanol a una alta concentración se produce una vasoconstricción en la submucosa gástrica y subsecuentemente la dilatación arteriolar, lo cual resulta en la disminución del flujo sanguíneo de la mucosa, alterando la microcirculación de la mucosa. El etanol estimula la liberación de la endotelina 1 y la endotelina 2 de las células endoteliales de la vena umbilical, la endotelina 1 tiene acción vasoconstrictora en la mucosa gástrica (Masuda y col., 1995).

La administración oral e intragástrica de etanol tiene una doble acción en la función secretora de la célula parietal. A bajas concentraciones aumenta la secreción de gastrina y con esto de ácido y a altas concentraciones no tiene efecto en la secreción de ácido (Gomes y col., 2011; Chari y col., 1993).

El metabolismo del etanol por la alcohol deshidrogenasa produce acetaldehído y el metabolismo de este compuesto por oxidasas como la xantina oxidasa genera radicales superóxido, los cuales pueden promover peroxidación lipídica, movilizar el hierro de la ferritina y alterar el glutatión hepático (Shaw y col., 1991).

Las EROS son productos biológicos del metabolismo normal celular. Bajas cantidades de EROS tienen efectos beneficiosos en muchos procesos fisiológicos incluidos daño a patógenos, resolución de heridas y proceso de reparación de tejido; sin embargo, una generación desproporcionada de EROS plantea un serio problema en la homeostasis del cuerpo y causa daño oxidativo en el tejido (Bhattacharyya y col., 2014).

La sobreproducción de las EROS es uno de los factores más patogénicos que resultan en ciertos daños oxidativos como la peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y daño a DNA lo que puede llevar a la muerte celular (Gomes y col., 2011). Las estirpes celulares que están en contacto con el oxígeno tienen diferentes sistemas para protegerse del efecto toxico de las EROS como la superóxido dismutasa, las catalasas y las peroxidasas, entre otras enzimas (Szelenyi y col., 1988).

1.11. Terapias alternativas a base de plantas medicinales.

Se ha demostrado que los remedios herbolarios solos son efectivas en el tratamiento de las úlcera gástrica y la combinación de estas medicinas con regímenes convencionales exhiben un efecto sinérgico en la resolución de la úlcera. Estos efectos beneficiosos se generan por medio de varios mecanismos: activación antioxidante, la estimulación de la proliferación de la mucosa, la inhibición de la producción y secreción de ácido, el aumento de la producción de moco así como la inhibición de la inflamación, y en algunas ocasiones, por su propiedad antimicrobiana (Bi y col., 2014).

1.12. *Cyrtocarpa procera*.

Cyrtocarpa procera es un árbol de aproximadamente 6 metros de altura, su tronco robusto con corteza es color grisáceo, sus hojas parecen plumas que miden de 4 a 7 cm de largo, con abundante pelo en ambas caras, parecen de terciopelo. Posee flores blancas de 3 mm de largo. Su fruto es de color amarillo, mide 1.5 cm de largo y tiene semilla (Figura 18). Su fruto es comestible, aunque tiene un sabor agarroso.

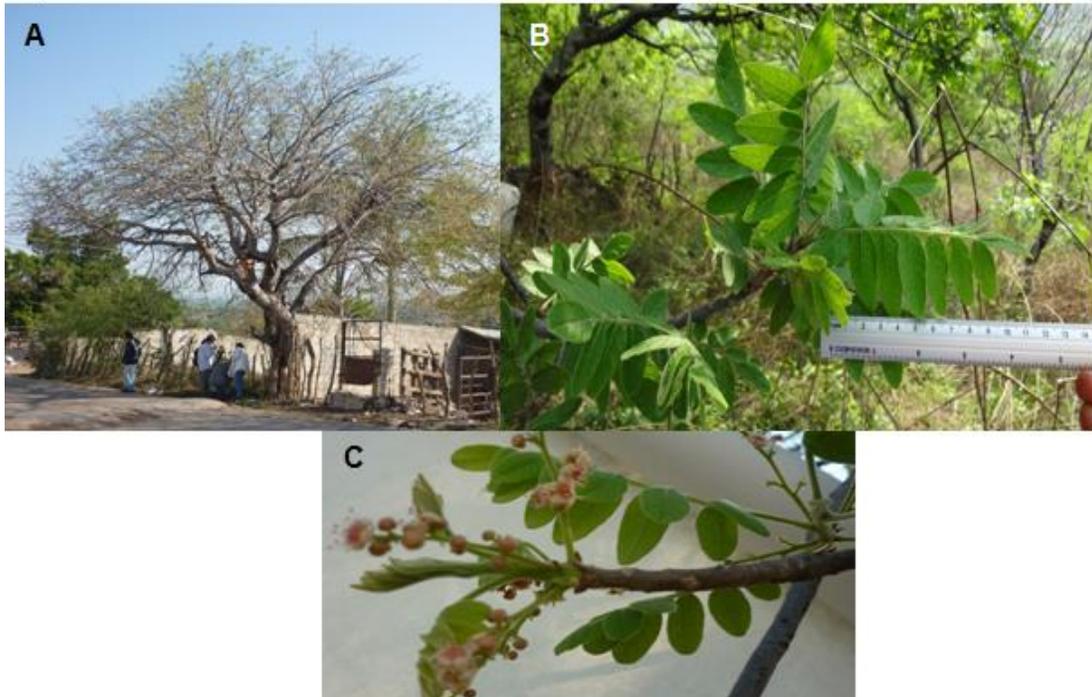


Figura 18. Fotografías de las partes de *Cyrtocarpa procera*. A) Tronco de *C. procera*, B) Hojas en forma de pluma de *C. procera*, C) Flores y fruto de *C. procera*. Colecta del laboratorio 2 del Departamento de Bioquímica, Medicina, UNAM, 2018.

C. procera es una planta originaria de México, habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado entre los 600 y los 1100 m a nivel del mar. Está asociada con bosques tropicales, caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino y de pino.

Se distribuye ampliamente en los estados de Aguascalientes, Baja California Sur, Colima, Durango, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro y Tabasco. Se le sitúa dentro de la familia Anacardiaceae que comprende unas 600 especies (árboles y arbustos principalmente) y se ubican en climas templados y subtropicales.

C. procera tiene varios nombres comunes dependiendo de la región en donde se encuentre como “chupandilla” en Puebla, “coco de cerro” en Alto Balsas, “copalcojote”, “baricoca”, “copalcocote” en Guerrero, “machocote” o “palo de chupandia” en Oaxaca, “chucum-pum” en el Estado de México, “chucumpuz” o “chupandia” en Michoacán y en Nayarit como “puei” (Argueta y col., 1994).

1.13. Usos medicinales tradicionales.

La corteza de *C. procera* es utilizada en algunos estados de la República Mexicana con fines terapéuticos para trastornos del aparato digestivo como diarrea y disentería; dolor de cintura, cicatrización de heridas; dolor de muelas, tos, enfermedades de la piel y dolor del riñón. (Argueta, 1994; Rodríguez-López y col., 2011; Canales y col., 2005)

Se sabe que es empleada para adulterar la corteza del “Cuachalalate” o “cuachalala” (*Amphipterygium adstringens*), una especie medicinal ampliamente utilizada en nuestro país para tratar trastornos del aparato digestivo como la gastritis y las úlceras. (Hersch-Martínez, 1995)

La corteza de la planta es la parte que más se utiliza y su modo de empleo varía entre la población, ya que en algunos lugares se cuece un puñito de la corteza en un litro de agua y se toma como agua de uso; durante cuatro días o el tiempo necesario para la diarrea y soltura. En San Rafael Coxcatlán, Puebla se utiliza en forma de té combinada con biznaga y el cuachalala para padecimientos renales (Canales y col., 2005). En el estado de Nayarit se emplea junto con la corteza del cuachalalate para lavar heridas y llagas y lograr una cicatrización más rápida; preparada en forma de decocción (Argueta y col., 1994).

1.14. Información farmacológica de *Cyrtocarpa procera*.

En trabajos previos se reportó que el extracto de cloroformo-metanol (1:1) obtenido de la corteza de *C. procera* no tiene actividad espasmolítica frente a las contracciones espontáneas del ileum de rata. (Rodríguez-López y col., 2003) También se ha demostrado que los extractos hexánico, cloroformo-metanol (1:1) y metanólico no mostraron actividad frente a algunas bacterias Gram(+) (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y Gram(-) (*Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) (Canales y col., 2005).

Posteriormente, se demostró que los extractos hexánico, diclorometánico y acetónico de la corteza de *C. procera* muestran una importante actividad tóxica sobre *Artemia salina*, determinándose una dosis letal media (DL₅₀) de 0.21, 2.1 y

22.75 µg/mL respectivamente, (Rodríguez-López y col., 2006). Se ha determinado la actividad antiulcerogénica de diferentes extractos de *C. procera* en un modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto, donde el extracto metanólico fue el más activo con una DE_{50} = 45.54 mg/kg. (Rosas y col., 2011). Así mismo, se ha reportado el aislamiento de una serie de compuestos como la β-amirina, β-sitosterol y una mezcla de ácidos grasos (Rodríguez-López y col., 2006; Rosas y col., 2011).

1.15. Antecedentes directos.

En el laboratorio donde se realizó la presente tesis se ha trabajado a detalle con diferentes extractos de la corteza de *C. procera*. Los de mayor rendimiento fueron los resultantes de los solventes de mayor polaridad como el acuoso, el de metanol y el de diclorometano-metanol (17.7 %, 13.2 % y 12.8 %, respectivamente), mientras que los de menor polaridad diclorometano y hexano generaron rendimientos muy bajos 1.07 % y 0.9 %, respectivamente. Se determinó la actividad anti-*H. pylori*, y los cinco extractos presentaron buena actividad, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 7.8, 15.6, 62.5, 62.5 y 125 µg/mL, respectivamente. Se demostró que ninguno de los extractos es letal bajo administración aguda a las dosis de 10, 100, 1600, 2900 y 5000 mg/kg, por lo que la DL_{50} es mayor a los 5000 mg/kg. Los extractos hexánico y metanólico a una dosis de 300 mg/kg tuvieron un efecto gastroprotector bueno al compararlo con la carbenoxolona con una DE_{50} de 1.06 y 0.53 mg/kg, respectivamente. El extracto hexánico ha demostrado tener actividad antiedematogénica con un máximo de inhibición de 57 % a la dosis de 3 mg/oreja lo cual se considera un efecto moderado, si se le compara con los fármacos de referencia indometacina y dexametasona. Dado que el extracto metanólico tiene un buen rendimiento, buena actividad anti-*H. pylori* y la mejor actividad gastroprotectora se decidió continuar con éste para los siguientes estudios (Escobedo-Hinojosa y col., 2012).

Por otra parte, se demostró que el efecto gastroprotector del extracto metanólico está relacionado principalmente a la producción de óxido nítrico endógeno y

prostaglandinas y en menor grado a la producción de grupos sulfhídrido y canales dependientes de potasio.

Se realizó la determinación de la toxicidad subaguda del extracto, administrando a los ratones vía intraesofágica una dosis por día de 10, 100 y 1000 mg/kg por 20 días y después en otros ratones dos dosis por día de 100 y 300 mg/kg por 20 días. Los resultados mostraron que ninguno de los animales de experimentación murió a lo largo del experimento. Se les realizó a los animales antes de sacrificarlos estudios sanguíneos como el hemograma para saber el número de hematíes, hematocrito, hemoglobina e índices eritrocitarios, recuento y fórmula leucocitaria y número de plaquetas también se les realizó estudios de bioquímica sanguínea para analizar alteraciones de glucosa, colesterol, triglicéridos transaminasas, fosfatasa alcalina, bilirrubina, ácido úrico y urea y no reflejaron alteraciones significativas en ninguno de los parámetros, con respecto a los individuos control incluso ratones sacrificados 15 días después de la última administración tampoco mostraron variaciones, estos resultados muestra la inocuidad de CpMet administrado de forma oral.

Así mismo, en un estudio en el cual se evaluó el efecto de resolución de úlcera del extracto metanólico, donde se administró dos veces al día el extracto por 20 días con una dosis de 300 mg/Kg vía intraesofágica se logró una resolución de la úlcera del 63% (Escobedo-Hinojosa y col., 2018).

Finalmente, se demostró que el extracto no tiene un efecto antisecretor que afecte el pH gástrico ya que el extracto no modifica el pH del estómago de ratones ulcerados con etanol absoluto, a diferencia del efecto del omeprazol que si neutraliza la acidez producida por el agente injuriante (etanol) (Escobedo-Hinojosa y col., 2018). Con este resultado y considerando el buen efecto gastroprotector y de resolución de úlcera del extracto metanólico, se podría plantear la hipótesis de que el uso conjunto del extracto con algún inhibidor de la secreción ácida debe potenciar los efectos resolutorios de la úlcera y de su calidad.

2. Justificación del trabajo.

En diferentes estudios se ha demostrado que los medicamentos y remedios herbolarios son efectivos en el tratamiento de la úlcera gástrica y que la combinación de estas medicinas con tratamientos convencionales exhibe un efecto sinérgico en la resolución de la úlcera.

La mayoría de los efectos beneficiosos de estos medicamentos y remedios herbolarios se generan por medio de varios mecanismos, la estimulación de la proliferación del epitelio de la mucosa, por su actividad antioxidante, la inhibición de la producción y secreción de ácido, el aumento de la producción de moco, la inhibición de la inflamación, así como la modulación de la microcirculación y en algunas ocasiones por su propiedad antimicrobiana.

Entre los tratamientos convencionales están los antagonistas del receptor a histamina (H_2) y los IBP ambos blancos localizados en la célula parietal. El omeprazol es el primer IBP que se usó en la clínica, y ahora es un medicamento de amplio uso en enfermedades como la úlcera péptica, gastritis, entre otras; así como en terapias conjugadas con antibióticos y protectores de la mucosa.

Estas terapias conjugadas pueden tener menor eficacia o no lograr la resolución de la úlcera con la calidad requerida para evitar la recurrencia de esta, debido a distintas circunstancias como la multiresistencia de cepas de *Helicobacter pylori* a los antibióticos de las terapias y al cese del tratamiento.

Se han demostrado en varios estudios preclínicos la nula toxicidad y varios efectos beneficiosos del extracto metanólico de la corteza de *Cyrtocarpa procera*, entre ellos un excelente efecto de gastroprotección, un efecto anti-*H. pylori*, un efecto antiinflamatorio, y una buena resolución de la úlcera gástrica, los cuales convierten a este extracto en un candidato para desarrollar una terapia para el tratamiento de la úlcera gástrica. Teniendo en cuenta que la neutralización o inhibición de la secreción gástrica no es su mecanismo de acción se propone que se pueda utilizar como coadyuvante con un antiácido convencional como los IBP o los AH_2R

para observar un efecto sinérgico, permitiendo alcanzar una mejor calidad de resolución.

Teniendo en cuenta las dificultades de las terapias actuales y con el requerimiento de nuevos tratamientos se propone este trabajo para evaluar el co-tratamiento del omeprazol con el extracto metanólico de *C. procera*.

3. Objetivo general

Determinar el efecto de la administración concomitante del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* y el omeprazol durante 20 días en la resolución de la úlcera gástrica inducida con etanol absoluto en ratones CD1.

3.1. Objetivos particulares

Evaluar el área de ulceración (en mm²) producida a nivel macroscópico con el programa ImageJ[®] de los estómagos a las 2 h y 1, 5, 10, 15 y 20 días posteriores a la inducción de la úlcera bajo los tratamientos ensayados, para determinar su efecto.

Evaluar histológicamente el efecto producido por los tratamientos mediante el análisis microscópico de cortes de estómagos representativos de cada tiempo y condición experimental.

Analizar los resultados estadística y comparativamente.

4. Metodología.

4.1. Extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera*.

El extracto metanólico (CpMet) fue preparado previamente en el laboratorio, a partir de corteza seca y molida, por maceración exhaustiva de 1.5 kg de material vegetal (1:10 p/v) (Escobedo-Hinojosa y col., 2018). El disolvente se separó del residuo por filtración y luego se evaporó a sequedad a presión reducida. El extracto se mantuvo a temperatura ambiente en la oscuridad hasta que se usó.

4.2. Animales de experimentación, cuidados y manejo.

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 en un intervalo de peso de 35-45 g que fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar (temperatura 24°C, ciclos de 12 h luz/obscuridad, agua y alimento *ad libitum*) y de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 que indica las especificaciones técnicas para la reproducción, cuidado y uso de animales de laboratorio. La eutanasia, se llevó a cabo en cámara de CO₂. Previo a cada ensayo de sacrificio, los animales fueron privados de alimento por 8 h con libre acceso a agua y trampa para evitar la coprofagia.

El bioterio en el que se tuvieron a los animales cuenta con las medidas sanitarias que asegura el control absoluto de los animales en experimentación. Las jaulas en las que permanecieron proporcionaron el espacio adecuado para permitir los movimientos normales conforme a las necesidades biológicas de la especie.

4.3. Evaluación del efecto resolutorio de úlcera gástrica.

Se determinó el efecto de la administración concomitante del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* (CpMet) con omeprazol (OME) mediante el modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto en ratón.

Se distribuyeron los ratones en 4 grupos de 5 individuos cada uno con los siguientes tratamientos: Grupo 1) Solución Salina Isotónica (0.9% NaCl) (SSI), Grupo 2) Omeprazol (OME), Grupo 3) CpMet y Grupo 4) CpMet+OME.

Los tiempos a los cuales se realizó la evaluación fueron: para los controles positivos de úlcera 2 h y 24 h; Para los animales experimentales, se realizó la evaluación a los 5, 10, 15 y 20 días. Adicionalmente se realizaron controles negativos, que se tratan de animales de experimentación sin ningún tratamiento, únicamente aclimatados en el bioterio.

Se realizó la inducción de la úlcera con una sola administración vía intraesofágica de etanol absoluto a una dosis de 7 mL/ Kg (19:00).

Veinticuatro horas después de la inducción de la úlcera y por 20 días consecutivos se les administró vía intraesofágica los siguientes tratamientos:

Grupo 1) SSI 200 μ L/ 12 h (07:00 y 19:00 h)

Grupo 2) SSI 200 μ L/ 24 h (07:00 h) y OME 20 mg/kg / 24 h (19:00 h)

Grupo 3) CpMet 300 mg/kg / 12 h (07:00 y 19:00 h)

Grupo 4) CpMet+OME, CpMet 300 mg/kg/ 12 h (07:00 y 19:00 h) y OME 20 mg/kg/ 24 h (19:00 h)

Tanto el omeprazol como el extracto se prepararon en el momento previo a la administración disolviéndolos en SSI cada uno. El extracto se sometió a un proceso de sonicación (40 kHz) a 35°C por 3 min, seguido de agitación en vórtex por 10 min repetidos 3 veces, para lograr la mejor suspensión del mismo. En el caso del tratamiento CpMet+OME, se agregó el omeprazol al extracto justo antes de la administración.

4.4. Determinación del área de ulceración.

En cada tiempo se sacrificó a los ratones correspondientes en una cámara de CO₂. Una vez sacrificados los animales se insuflaron oralmente con formaldehído al 10% en PBS pH= 6.8. Se extrajeron los estómagos y se colocaron en la misma solución de formaldehído amortiguado, se dejaron reposando por 2 h, después se disecaron a lo largo de la curvatura mayor, se lavaron con SSI para eliminar el contenido estomacal y se colocaron entre dos laminillas de vidrio para poder escanearlos y determinar el área total de úlcera (mm²) con el programa ImageJ®.

Para cada tiempo, de cada tratamiento, se obtuvo un promedio del área total de úlcera de todos los individuos experimentales.

El porcentaje de resolución de úlcera alcanzado a cada tiempo (t = x), se determinó tomando como el 100% de ulceración el promedio de área total de ulceración al t = 0 de la siguiente manera:

$$\% \text{ Resolución de Úlcera} = 100 \% - \frac{\text{mm}^2 \text{ t} = \text{x} * 100}{\text{mm}^2 \text{ t} = 0}$$

4.5. Técnicas histológicas e histoquímicas.

Se seleccionaron estómagos de cada tiempo y de los controles para realizar cortes de áreas con daño visible macroscópicamente. La técnica histológica se realizó en el Laboratorio de Histología del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina UNAM, en donde se llevó a cabo el tren de deshidratación y los procesos de infiltración e inclusión en parafina. Se realizaron cortes sagitales en micrótomo, de un espesor de 5 μm , y posteriormente se les realizó las tinciones de Hematoxilina y Eosina (HYE) y de ácido peryódico de Schiff (APS).

Las variables histopatológicas analizadas para los tejidos, obtenidos de los ensayos de resolución de úlcera gástrica, fueron básicamente: integridad hística (uniformidad/disrupción del epitelio de la mucosa gástrica), infiltrado eritrocitario e inflamatorio, positividad en APS (presencia de fucsia intenso que denota presencia de moco neutro),

4.6. Modelos estadísticos.

El experimento se llevó a cabo por duplicado con una $n \geq 10$ total por condición experimental. Se realizó un análisis de varianza de una vía para cada tratamiento y entre cada tiempo para identificar grupos con diferencias significativas en cada caso según aplicara, tomando en cuenta a α con un valor de 95% de confianza.

5. Resultados y discusión.

5.1. Control negativo de ulceración.

Se observó macroscópicamente y microscópicamente el estómago de un ratón aclimatado en el bioterio sin inducirle úlcera, para reconocer el estado natural de la mucosa gástrica del ratón sin ningún daño o agresión.

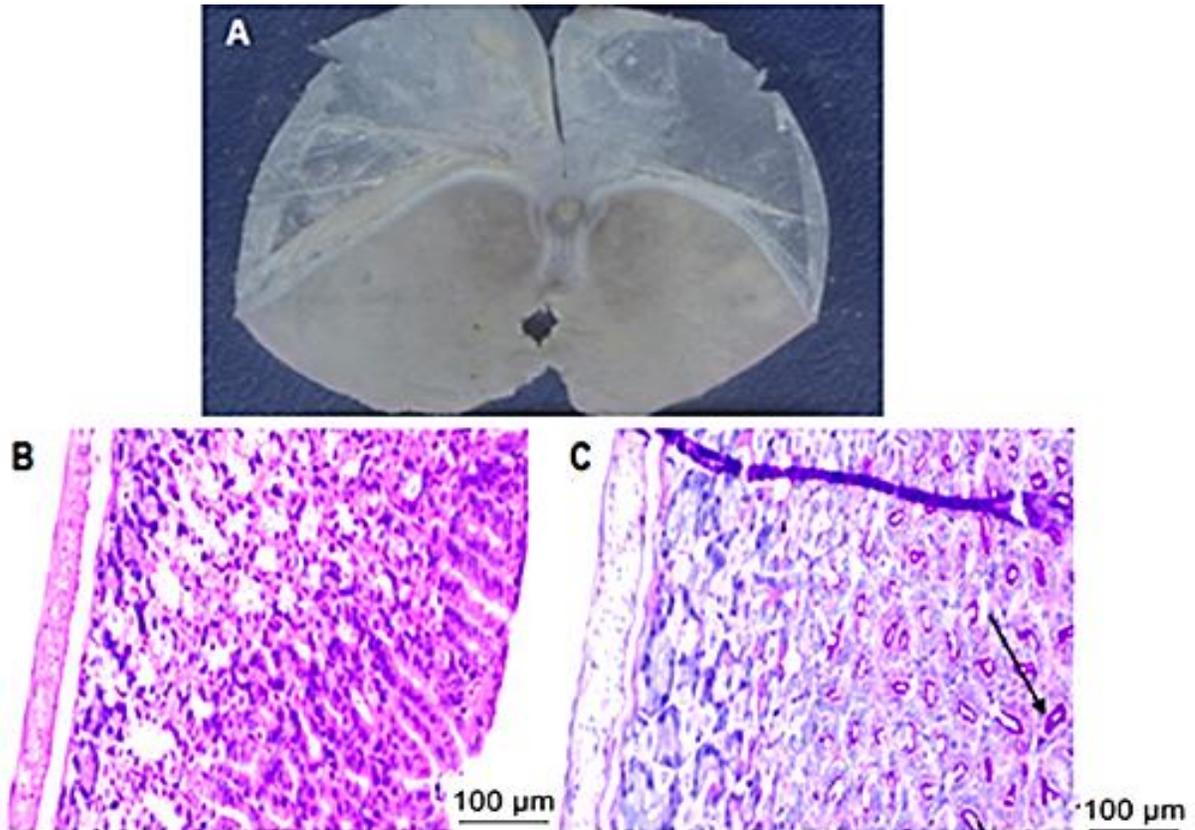


Figura. 19. Características del estómago de un ratón sin algún tratamiento. A) Vista macroscópica del estómago. B) Tinción Hematoxilina y Eosina (HyE) de la mucosa gástrica, C) Tinción con ácido peryódico de Schiff (APS) de la mucosa gástrica. La flecha negra en C señala la secreción de moco.

En la Figura 19 se puede distinguir a nivel macroscópico la ausencia de daño en el estómago del ratón que se muestra como una superficie lisa (A), microscópicamente se observa la uniformidad de las glándulas en la mucosa gástrica y el nulo infiltrado eritrocitario e inflamatorio (B) y la producción basal de moco (C).

5.2. Controles positivos de ulceración

Para definir el tiempo a considerar como cero se realizó una comparación de los valores promedio de área total de ulceración entre los estómagos de los ratones a las 2 y 24 h después de la inducción de la úlcera con etanol absoluto (Figura 20).

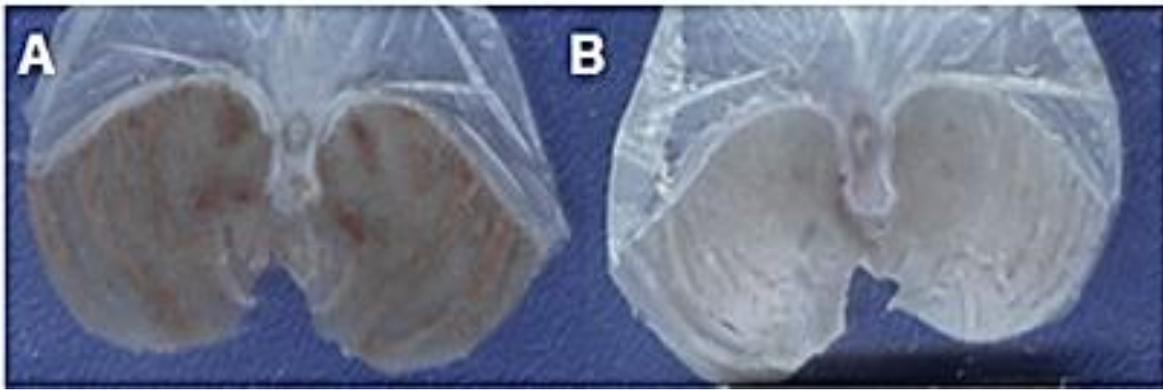


Figura 20. Comparación de estómagos de 2 y 24 h. A) Estómago del ratón de tiempo 2 h B) Estómago del ratón de tiempo 24 h. A las 24 h ya no se observa la sangre en las bandas hemorrágicas mostradas a las 2 h, sin embargo, persisten las bandas de ulceración.

Al medir el área de úlcera de cada estómago utilizando el programa ImageJ se obtuvo que, para el tiempo de 2 h, el promedio de área total es de $31.87 \pm 2.76 \text{ mm}^2$ y para el tiempo de 24 h un promedio de área total de $26.30 \pm 3.17 \text{ mm}^2$ (Figura 21). Considerando que el análisis estadístico mostró que estos dos valores no tienen diferencia significativa, se decidió usar el tiempo 2 h como el tiempo cero o control positivo de la ulceración máxima.

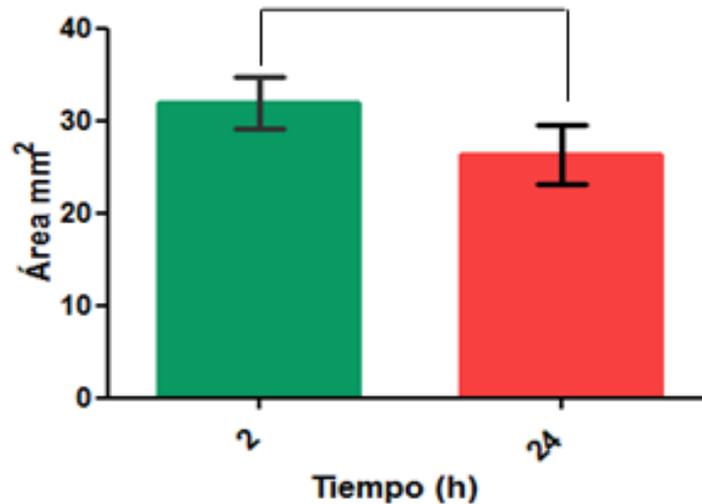


Figura 21. Área de úlcera (mm²) de los tiempos 2 y 24 h. No tienen diferencia estadística significativa entre sí.

Al comparar las tinciones histológicas de los estómagos a las 2 y 24 h (Figura 22) se observó también un daño similar a nivel histológico de la mucosa gástrica, ambos presentando todas las variables de daño a evaluar, edema, falta de uniformidad de las glándulas y tanto infiltrado inflamatorio como eritrocitario.

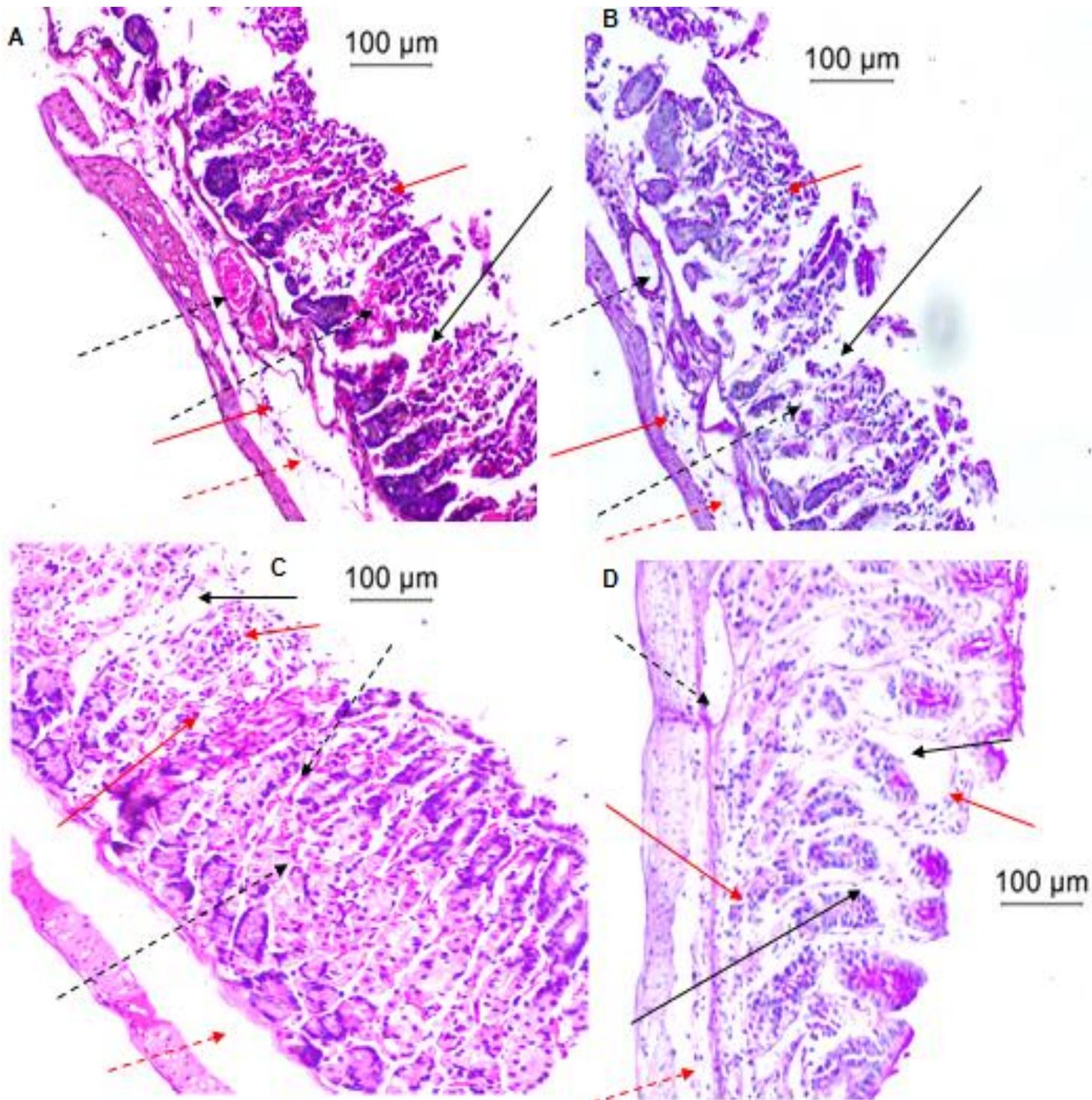


Figura 22. Imágenes representativas con microscopía de campo claro de preparaciones histológicas de estómagos de ratón 2 y 24 h de ulceración. A) y B) estómago de ratón 2 h después de la administración de etanol C) y D) estómago de ratón 24 h después de la administración de etanol. A) y C) Tinción con ácido peryódico de Schiff (APS) de la mucosa gástrica. B) y D) Tinción Hematoxilina y Eosina (HyE) de la mucosa gástrica. Las flechas rojas señalan el infiltrado inflamatorio, las rojas punteadas el edema, las negras la falta de la uniformidad de la mucosa y las negras punteadas el sangrado.

5.3. Tratamientos.

5.3.1. Análisis macroscópico

La figura 23 muestra el promedio de área total (mm^2) de ulceración para cada tratamiento (SSI, OME, CpMet y CpMet + OME) en cada tiempo analizado (5, 10, 15 y 20 días). A continuación se irá analizando cada uno de estos resultados de una manera más desglosada.

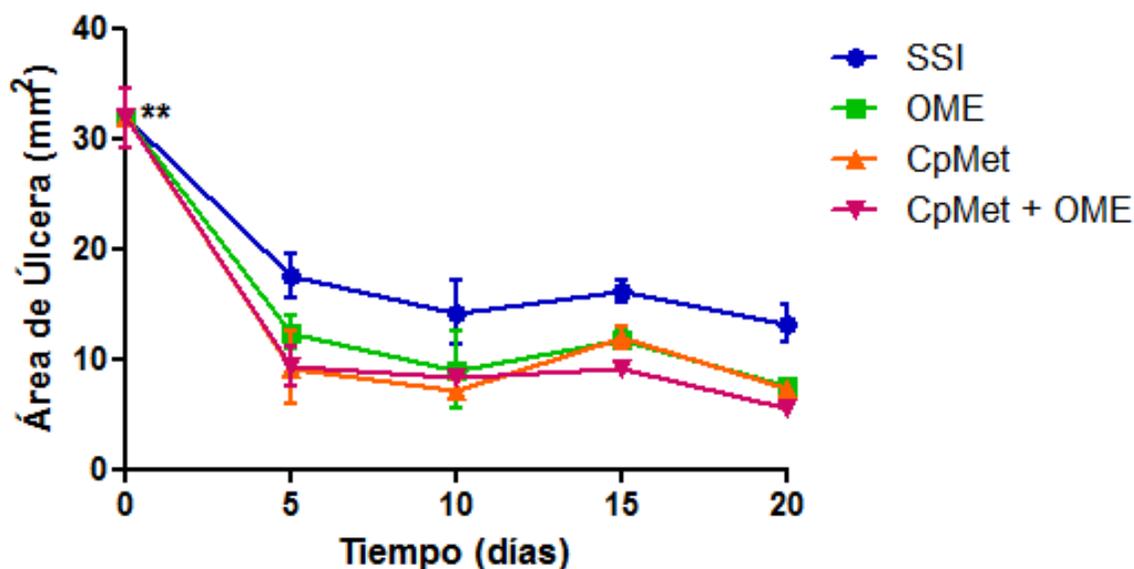


Figura 23. Variación del Área de úlcera (mm^2) a través del tiempo de todos los tratamientos.

** es $p > 0.05$ en el análisis de varianza entre los valores de área de todos los tiempos con respecto al tiempo 0.

Con respecto a los datos de SSI, se puede apreciar que existe una resolución espontánea de la úlcera del 58.49% a los 20 días, con respecto al $t = 0$, en el caso del tratamiento con OME, el porcentaje de resolución alcanzado a los 20 días es de 76.33%, valores que se alcanzan prácticamente desde los 5 días.

Al comparar estadísticamente el promedio de área total de los tiempos 5, 10, 15 y 20 días del grupo SSI (con valores de 17.56 ± 1.99 , 14.70 ± 2.56 , 16.12 ± 1.00 y $13.22 \pm 1.77 \text{ mm}^2$, respectivamente), se encuentra que no tienen diferencia significativa entre ellos mismos. A su vez, en el caso de OME, los tiempos 5, 10, 15 y 20 días (con valores de área total promedio de 12.38 ± 1.47 , 9.02 ± 1.53 ,

11.79 ± 0.89 y 7.54 ± 0.50 mm², respectivamente) tampoco tienen diferencia significativa entre estos. Indicándonos que el efecto se logra desde los 5 días a partir de la ulceración.

Al analizar las varianzas de los resultados correspondientes de 5, 15 y 20 días entre ambos tratamientos, se encuentra que sí hay diferencia significativa (Figura 24), este aumento en la resolución de la úlcera es lo que se esperaría para un IBP como lo es el omeprazol.

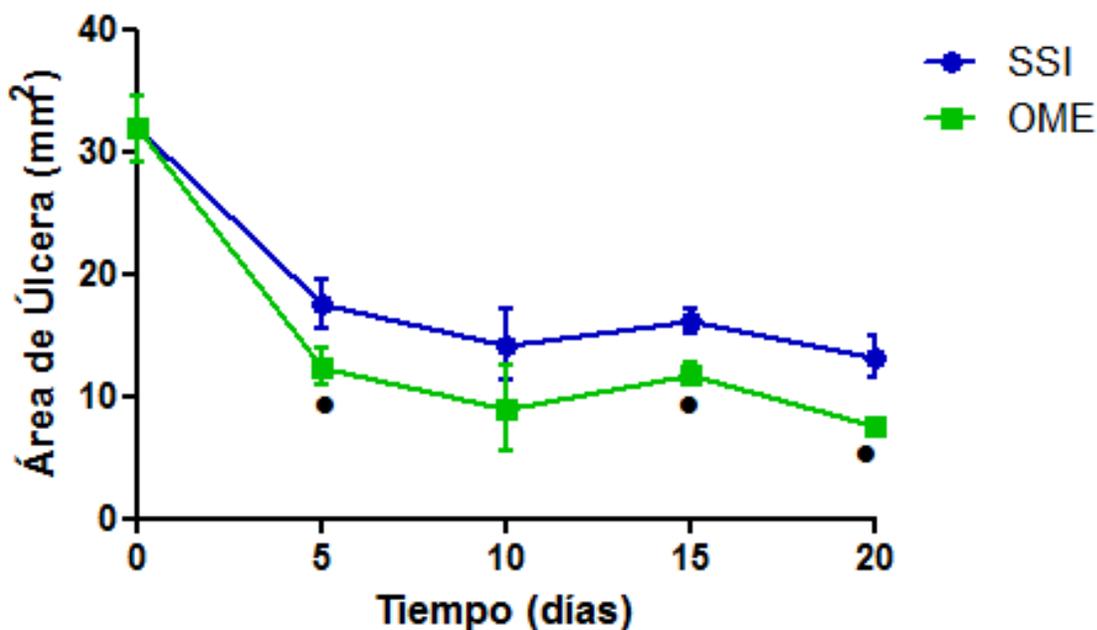


Figura 24. Variación del Área de úlcera (mm²) a través del tiempo de los tratamientos SSI y OME. • indica $p > 0.05$ en el análisis de varianza entre los valores de área de los tiempos de OME con respecto a los de SSI.

Los estómagos representativos de cada tiempo de estos tratamientos SSI y OME se muestran en la Figura 25 con los que es posible robustecer la información mostrada en la gráfica anterior.

En el caso del tratamiento con CpMet, el porcentaje de resolución alcanzado a los 20 días es de 76.87% con respecto al control positivo de ulceración, valores que se alcanzan prácticamente desde los 5 días.

Al comparar estadísticamente el promedio de área total de los tiempos 5, 10, 15 y 20 días del grupo CpMet (con valores de 9.22 ± 3.27, 7.17 ± 0.91, 11.91 ± 1.05, 7.37 ± 0.27 mm², respectivamente), se encuentra que no tienen diferencia

significativa entre ellos mismos. Al analizar las varianzas de los resultados correspondientes de 5, 10, 15 y 20 días entre ambos tratamientos, CpMet y SSI, observamos que los datos sí presentan diferencia significativa en todos los casos (Figura 26).

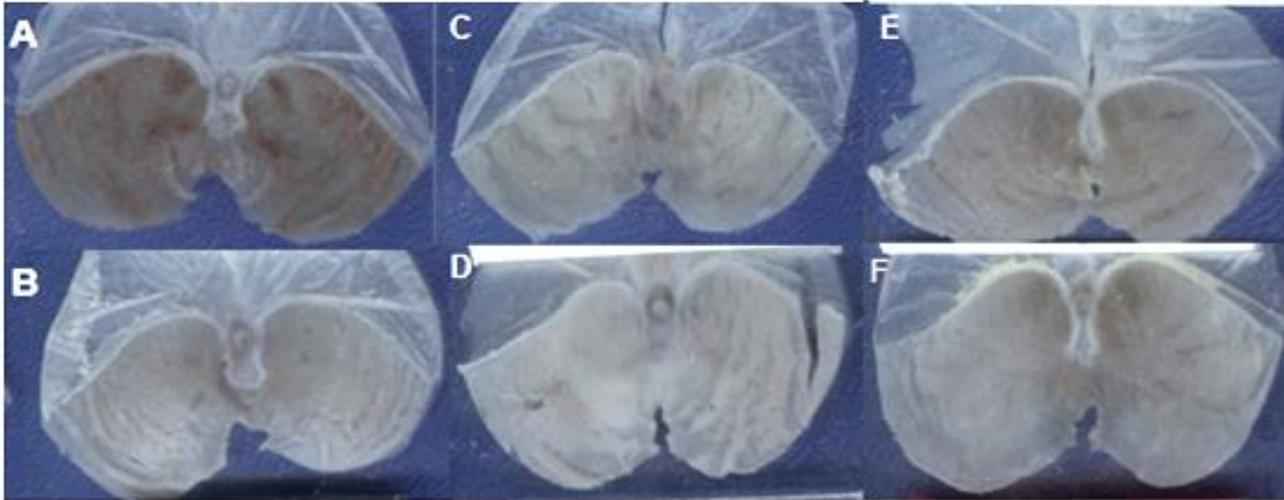


Figura 25. Vista macroscópica de estómagos representativos de los tratamientos SSI y OME. Estómagos de los controles positivos: A) 2 h, B) 24 h. C) estómagos de SSI a los 5 días y D) a los 20 días de la ulceración. E) estómagos de OME a los 5 días y F) a los 20 días de la ulceración.

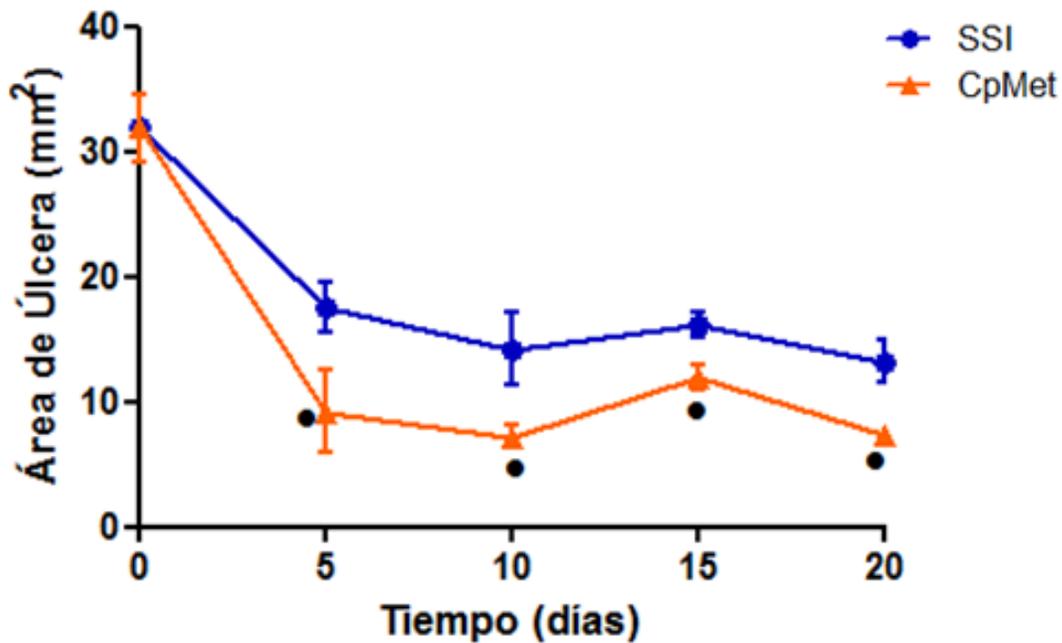


Figura 26. Variación del Área de úlcera (mm²) a través del tiempo de los tratamientos SSI y CpMet. • es $p > 0.05$ en el análisis de varianza entre los valores de área de los tiempos de CpMet con respecto a los de SSI.

En el caso del tratamiento con CpMet+OME, el porcentaje de resolución alcanzado desde los 5 días hasta los 15 días es de 71.07% con respecto al t = 0 o control positivo de ulceración y a los 20 días es de 82.82% con respecto al mismo control .

Al analizar la varianza de área total de los tiempos 5, 10, 15 y 20 días del grupo CpMet+OME (con valores de 9.37 ± 1.74 , 8.33 ± 0.49 , 9.22 ± 0.55 , 5.48 ± 0.75 mm², respectivamente), solamente presenta diferencia significativa el valor del tiempo 20 días con respecto a los demás, y al comparar los datos de 5, 10, 15 y 20 días entre los tratamientos SSI y CpMet+OME todos presentan diferencia significativa (Figura 27).

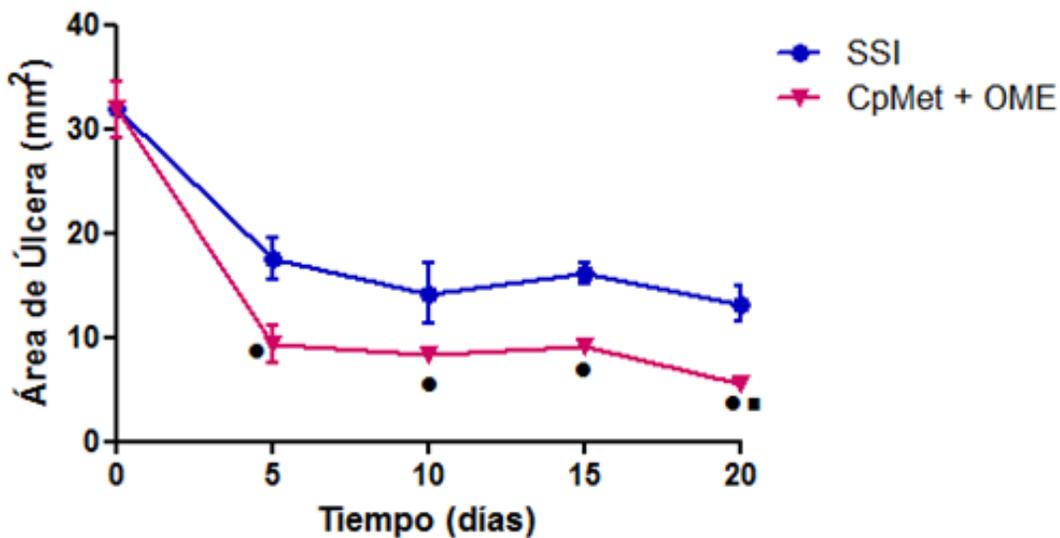


Figura 27. Variación del Área de úlcera (mm²) a través del tiempo de los tratamientos SSI y CpMet+OME. ● es $p > 0.05$ en el análisis de varianza entre los valores de área de los tiempos de CpMet+OME con respecto a los de SSI. ■ es $p > 0.05$ en el análisis de varianza entre los valores de área de 20 días con respecto a los demás tiempos de CpMet+OME.

Los estómagos representativos de cada tiempo de estos tratamientos (CpMet y CpMet + OME), comparados con los controles positivos de ulceración (t=0) se muestran en la Figura 28, con los que es posible corroborar el efecto resolutorio de la úlcera alcanzado con estos tratamientos y mostrado en los gráficos anteriores.

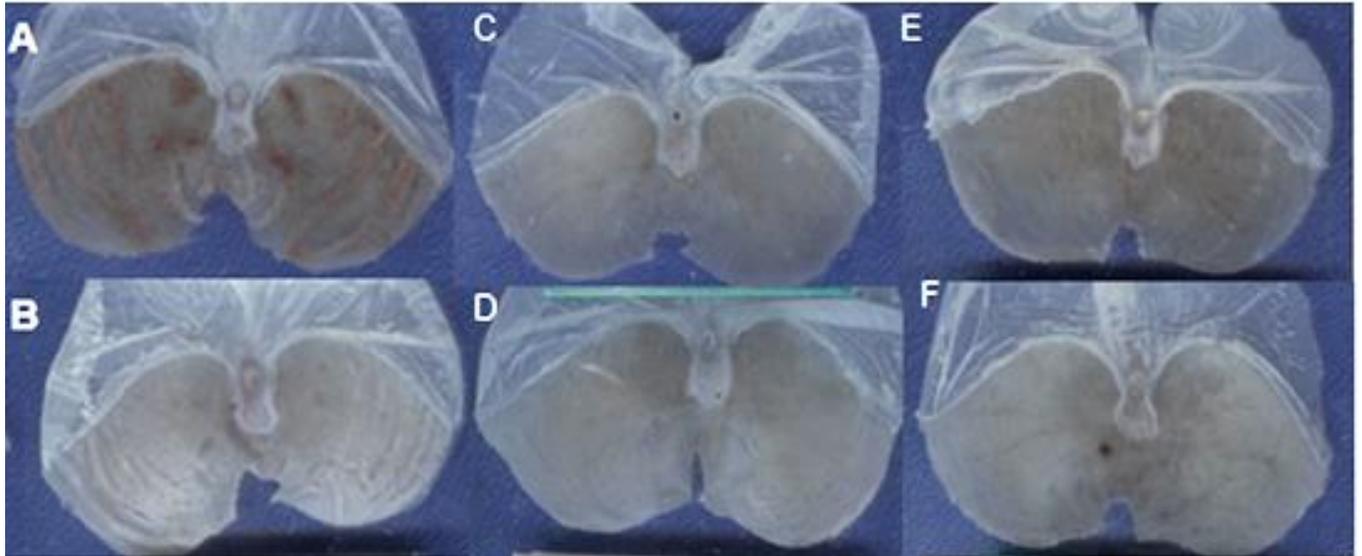


Figura 28. Vista macroscópica de estómagos representativos de los tratamientos CpMet y CpMet+OME. Estómagos de los controles positivos: A) 2 h, B) 24 h. C) estómagos de CpMet a los 5 días y D) a los 20 días de la ulceración. E) estómagos de CpMet+OME a los 5 días y F) a los 20 días de la ulceración.

Al realizar el análisis de varianza de los resultados obtenidos de los tratamientos independientes de CpMet y OME, no existe diferencia significativa en ningún tiempo (de 5 a 20 días), pero al analizar los resultados de CpMet y CpMet + OME existe diferencia significativa únicamente en los valores de área total a los 20 días y lo mismo sucede al hacer el análisis de varianza de los resultados de CpMet + OME y OME.

De manera general, estos resultados nos permiten observar en primer lugar que a los 20 días existe una resolución espontánea de 58% y que con los tratamientos OME, CpMet y CpMet+OME se presentan porcentajes de resolución de la úlcera de: 76%, 77% y 83% respectivamente, valores que, por lo menos a éste tiempo, tienen diferencia estadística significativa entre ellos. Esto nos permite concluir que el tratamiento propuesto en nuestro objetivo (CpMet + OME) fue mejor a nivel macroscópico, que el tratamiento con el extracto solo (CpMet) en un 6%.

Por otra parte, al comparar los resultados reportados previamente con CpMet solo, de 63% (Escobedo-Hinojosa y col., 2018) con los resultados de la presente tesis (77%), encontramos que el CpMet mostró una actividad de resolución muy parecida, indicándonos la reproducibilidad del efecto resolutorio de la úlcera del extracto.

5.3.2. Análisis histológico

Para el análisis microscopico utilizando las tinciones de Hematoxilina y Eosina (HyE) y con ácido peryódico de Schiff (APS) de los cortes de los estómagos de cada tratamiento (SSI, OME, CpMet y CpMet + OME) y a cada tiempo (5, 10, 15 y 20 días) se tomó en cuenta los posibles daños presentes en la mucosa gástrica, su ausencia y su mejora y por ende, el progreso completo en la resolución de la úlcera, con una buena calidad y no solo una resolución superficial.

5.3.2.1 Comparación de las preparaciones histológicas de los estómagos de cada tratamiento con respecto al control positivo.

En la figura 29 se muestra las tinciones histológicas de los estómagos de $t=0$ (control positivo) y del tratamiento con SSI a los 5 y 20 días. Es posible apreciar que aunque macroscópicamente se logró un 58% de resolución de úlcera, solo se tiene una resolución superficial, ya que microscópicamente el daño permanece, tanto a los 5 días como a los 20 días. Estas agresiones de la mucosa están representadas como sangrado, infiltrado inflamatorio, edema, falta de la uniformidad de las glándulas de la mucosa y la ausencia de moco gástrico (ver flechas en cada figura).

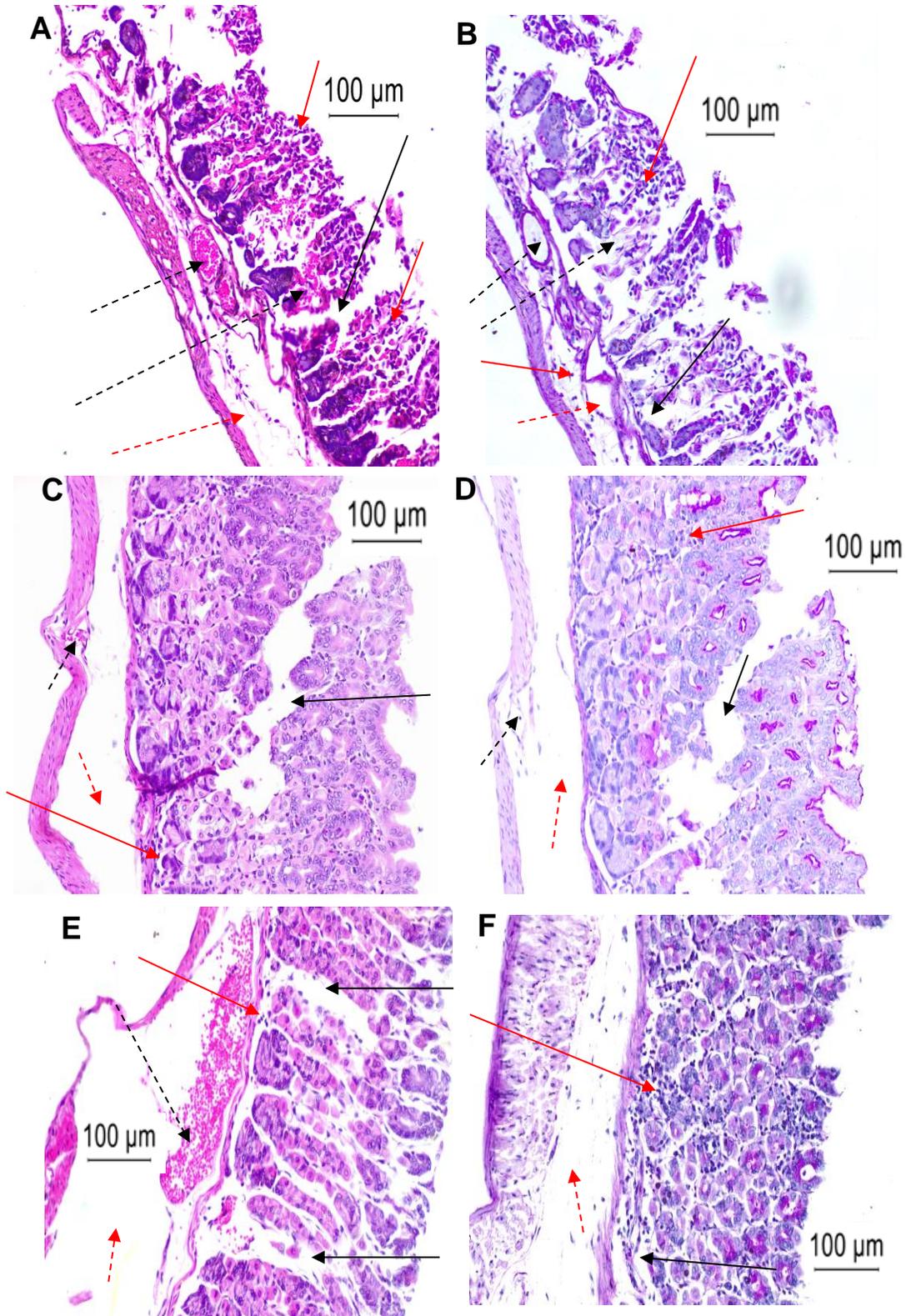


Figura 29. Imágenes representativas con microscopía de campo claro de preparaciones histológicas de estómagos de ratón al tiempo cero y con el tratamiento con SSI. A) y B) t = 0 estómago 2 h después de la administración de etanol C) y D) estómago tratado con SSI por 5 días después de la administración de etanol. E) y F) estómago tratado con SSI por 20 días después de la administración de etanol. A), C) y E) Tinción con ácido peryódico de Schiff (APS) de la mucosa gástrica. B), D) y F) Tinción Hematoxilina y Eosina (HyE) de la mucosa gástrica. Las flechas rojas señalan el infiltrado inflamatorio, las rojas punteadas el edema, las negras la falta de la uniformidad de la mucosa y las negras punteadas el sangrado.

En la figura 30 se muestran las tinciones histológicas de los estómagos de t=0 (control positivo) y del tratamiento con OME a los 5 y 20 días. Es posible observar una ligera mejoría, representado por una mayor uniformidad de las glándulas gástricas, pero de igual manera, se trata de una resolución superficial porque se presentan los mismos daños como el edema, el infiltrado inflamatorio, el infiltrado eritrocitario, además de poca secreción de moco. A pesar de que a los 20 días con este tratamiento encontramos una resolución macroscópica de 76%, el daño a nivel histológico aun es considerable, presentando los signos clave de la persistencia de la inflamación y por ende que aún no hay una buena calidad en la resolución de la úlcera.

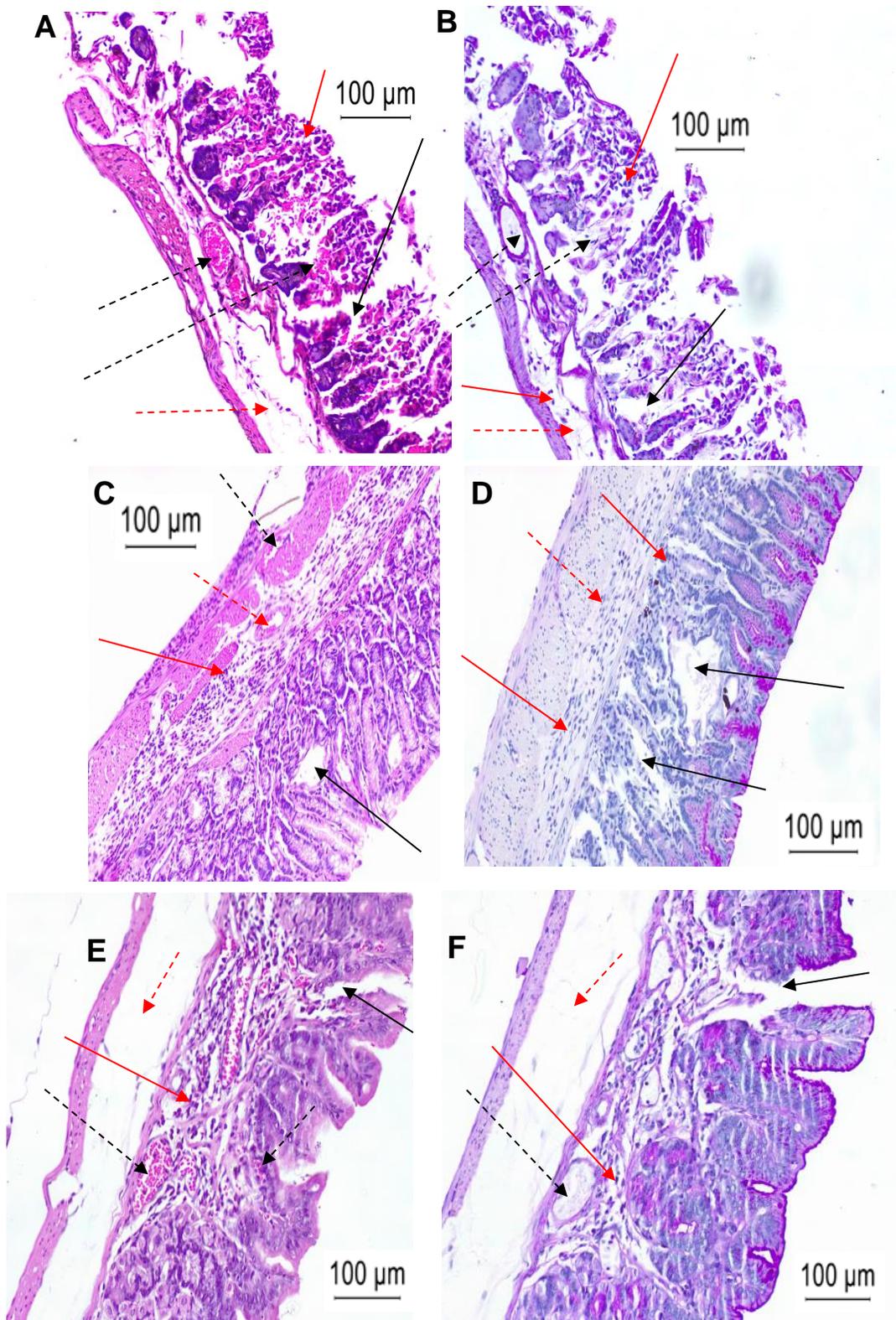


Figura 30. Imágenes representativas con microscopía de campo claro de preparaciones histológicas de estómagos de ratón al tiempo cero y con el tratamiento con OME. A) y B) estómago 2 h después de la administración de etanol C) y D) estómago administrado con OME por 5 días después de la administración de etanol. E) y F) estómago de ratón administrado con OME por 20 días después de la administración de etanol. A), C) y E) Tinción con ácido peryódico de Schiff (APS) de la mucosa gástrica. B), D) y F) Tinción Hematoxilina y Eosina (HyE) de la mucosa gástrica. Las flechas rojas señalan el infiltrado inflamatorio, las rojas punteadas el edema, las negras la falta de la uniformidad de la mucosa y las negras punteadas el sangrado.

En la figura 31 se muestra las tinciones histológicas de los estómagos de t=0 (control positivo) y del tratamiento con CpMet a los 5 y 20 días. Se puede notar una mayor resolución con respecto a SSI y OME. Aún se presenta un poco de edema, se nota un aumento en la secreción de moco gástrico y se ha mejorado la uniformidad de las glándulas. El hecho de que ya no se presenta sangrado y la disminución del infiltrado inflamatorio (factores involucrados en la recurrencia de las úlceras) nos indica que se está logrando una mejor calidad de resolución de las úlceras.

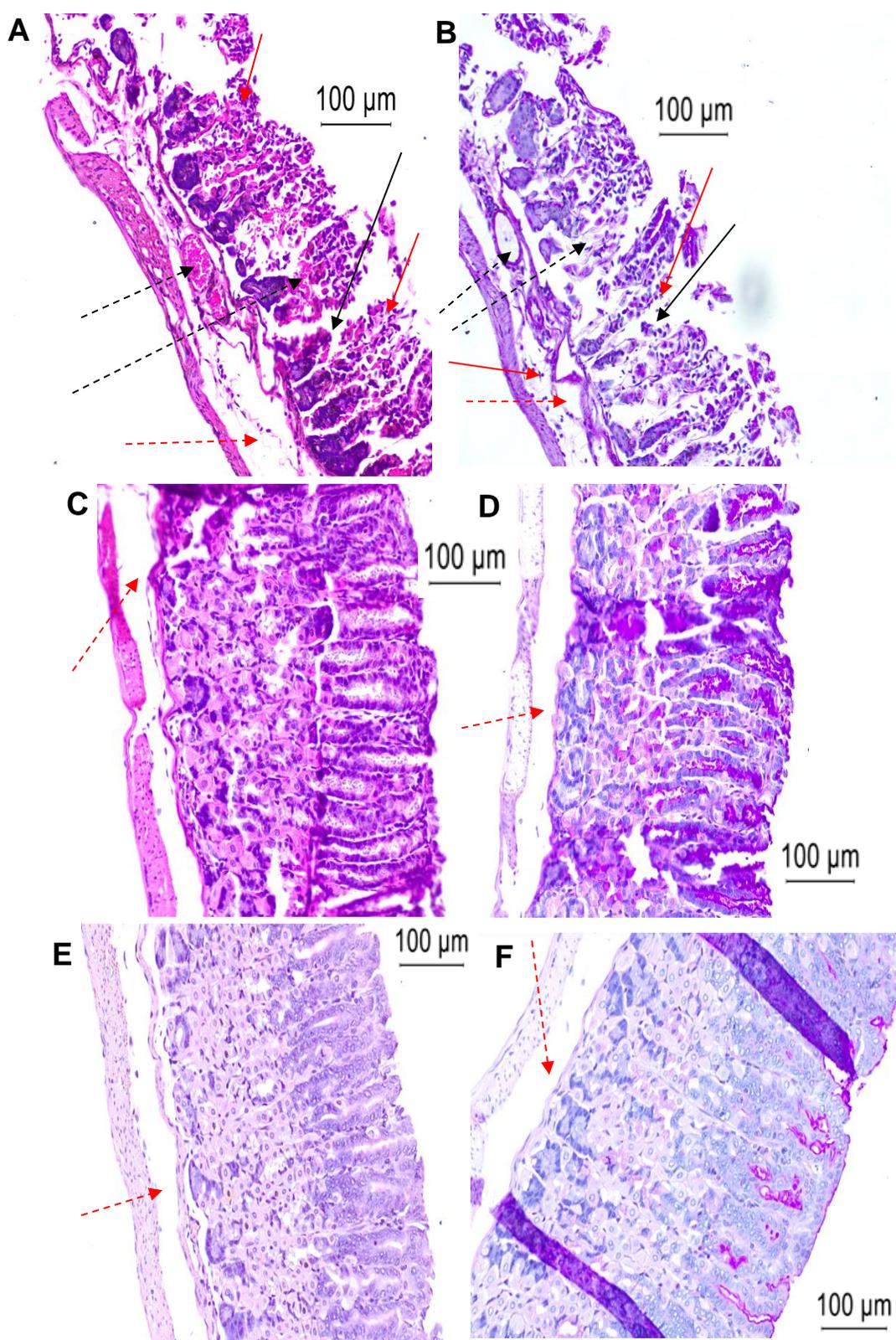


Figura 31. Imágenes representativas con microscopía de campo claro de preparaciones histológicas de estómagos de ratón al tiempo cero y con el tratamiento con CpMet. A) y B) estómago de ratón 2 h después de administrar etanol C) y D) estómago de ratón tratado con CpMet por 5 días después de la administración de etanol. E) y F) estómago tratado con CpMet por 20 días después de la administración de etanol. A), C) y E) Tinción con ácido peryódico de Schiff (APS) de la mucosa gástrica. B), D) y F) Tinción Hematoxilina y Eosina (HyE) de la mucosa gástrica. Las flechas rojas señalan el infiltrado inflamatorio, las rojas punteadas el edema, las negras la falta de la uniformidad de la mucosa y las negras punteadas el sangrado.

En la figura 32 se muestra las tinciones histológicas de los estómagos de t=0 (control positivo) y del tratamiento con CpMet+OME a los 5 y 20 días. Es posible observar la calidad de resolución lograda desde los 5 días, aún con presencia de edema y este desaparece para los 20 días, tiempo en donde se ve una buena calidad de resolución de la úlcera, uniformidad en las glándulas, sin edema, sin infiltrado inflamatorio y eritrocitario y cabe resaltar que en todos los tiempos hay uniformidad de las glándulas y una mayor cantidad de moco gástrico a comparación de con SSI, OME e incluso que con el extracto solo. En este caso, el tratamiento concomitante tiene mucha más congruencia tanto macroscópica (83% de resolución) como microscópicamente, ya que la calidad de resolución a nivel celular es mayor.

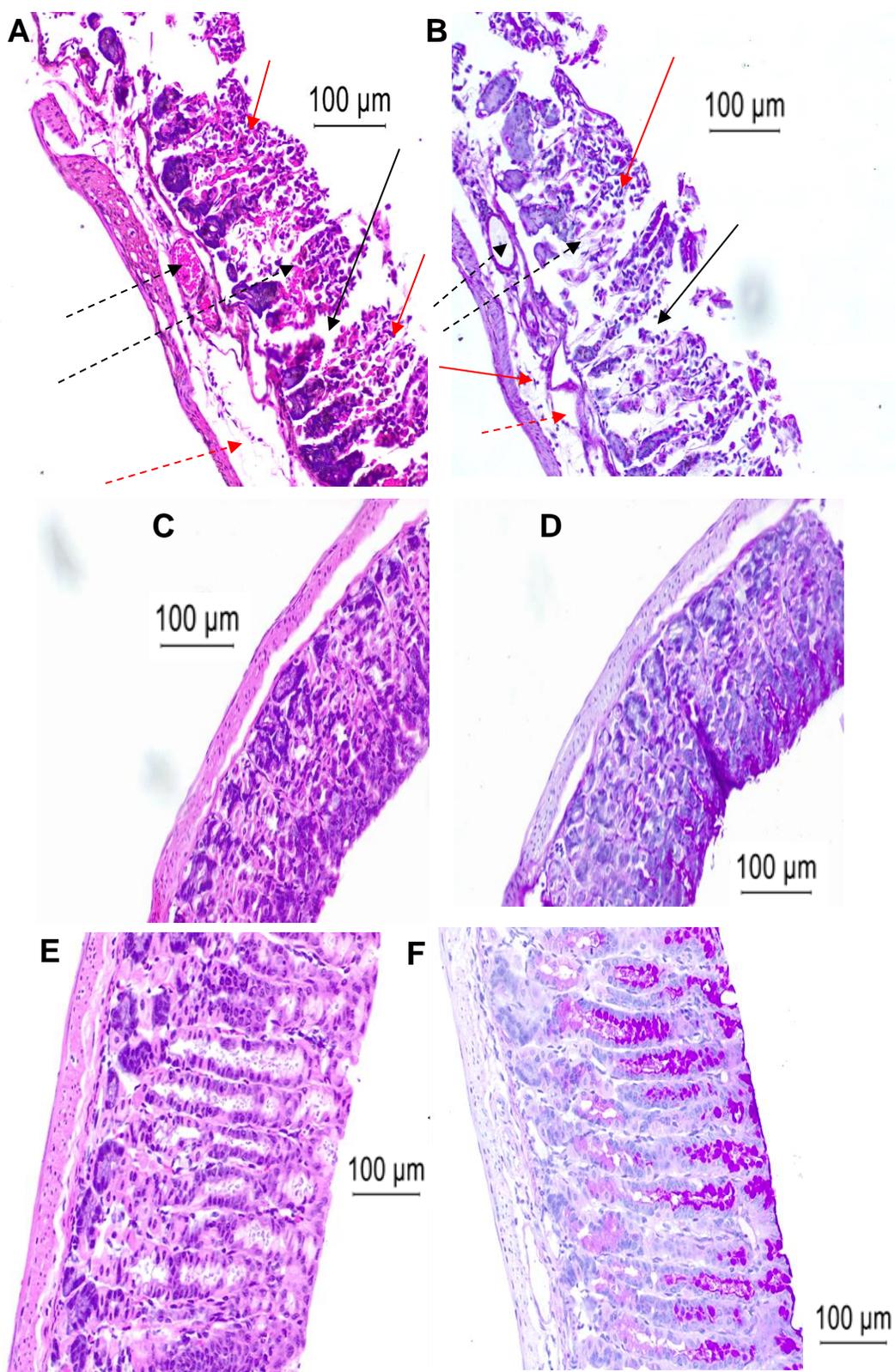


Figura 32. Imágenes representativas con microscopía de campo claro de preparaciones histológicas de estómagos de ratón al tiempo cero y con el tratamiento con CpMet+OME. A) y B) estómago 2 h después de la administración de etanol C) y D) estómago tratado con CpMet+OME por 5 días después de la administración de etanol. E) y F) estómago tratado con CpMet+OME por 20 días después de la administración de etanol. A), C) y E) Tinción con ácido peryódico de Schiff (APS) de la mucosa gástrica. B), D) y F) Tinción Hematoxilina y Eosina (HyE) de la mucosa gástrica. Las flechas rojas señalan el infiltrado inflamatorio, las rojas punteadas el edema, las negras la falta de la uniformidad de la mucosa y las negras punteadas el sangrado.

En resumen y como se ha ido analizando, en algunos casos se complementaron los resultados del estudio macroscópico y microscópico y en otros no. Por ejemplo, con respecto a los resultados de los controles positivos de ulceración hay una concordancia entre ambos análisis, con lo que fue posible seleccionar el tiempo cero (2 h). En cuanto al grupo tratado con SSI, a pesar de alcanzar un 58% de resolución espontánea, los datos microscópicos muestran que esta resolución solo es superficial dada la presencia de infiltrado inflamatorio, infiltrado eritrocitario y edema, lo que puede conllevar a la recurrencia de la úlcera. En el caso del tratamiento con OME las observaciones macro y microscópicas no corresponden, ya que a nivel microscópico no se logra una buena calidad en la resolución de la úlcera. Con respecto a los grupos en los que se administró extracto (CpMet y CpMet+OME) hay una mayor resolución de la úlcera a nivel macroscópico con respecto a los de SSI y OME, así mismo, se observa una gran calidad de resolución de úlcera desde los 5 días en ambos tratamientos CpMet y CpMEt+OME histológicamente.

6. Conclusiones

- 1) La administración concomitante de CpMet+OME analizada macroscópicamente únicamente es mejor que la administración individual de cada uno de ellos a los 20 días de tratamiento (con significancia estadística).
- 2) La administración concomitante de CpMet+OME analizada microscópicamente indica que el co-tratamiento logra una notable resolución de la calidad de la úlcera con respecto al OME solamente.
- 3) La administración concomitante de CpMet+OME analizada microscópicamente indica que el co-tratamiento es muy semejante en cuanto a la calidad histológica de la resolución de la úlcera con respecto a la administración de CpMet solo.
- 4) Considerando las pequeñas diferencias encontradas utilizado el co-tratamiento CpMet-OME y el tratamiento CpMet solo, no se puede considerar como una mejor opción en el tratamiento de la úlcera péptica, pero si con respecto al tratamiento de OME únicamente.

7. Perspectivas

- Conocer la composición fitoquímica completa del extracto mediante análisis espectroscópicos y espectrométricos.
- Lograr identificar compuestos marcadores que nos permitan la estandarización del extracto para cumplir los requerimientos legales para registrarlo como un remedio o medicamento herbolario.
- Seguir con los estudios preclínicos en tratamientos coadyuvantes con otras moléculas que inhiban la secreción ácida y que utilicen mecanismo de acción diferente al omeprazol como los antagonistas a los receptores de Histamina, esto debido a que este extracto ya tiene la actividad gastroprotectora y la actividad anti-*H. pylori* bien caracterizada y un muy buen porcentaje de resolución de úlcera.

8. Bibliografía

Al-Badr, A. (2010). Omeprazole Profile. Editor: Brittain, H. En: Profiles of drug substances, excipients and related methodology. 35, 151-262. Elsevier, Holanda.

Arakawa, T., Watanabe, T., Tanigawa, T., Tominaga, K., Fujiwara, Y. y Morimoto, K. (2012). Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: Its pathophysiology and clinical relevance. *World Journal of Gastroenterology*. 18, 4811-4822.

Argueta, V., Cano, J. y Rodarte, M., (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, Vol. 1. Instituto Nacional Indigenista, México.

Barrett, K. (2010). Ganong Fisiología Médica. 23a ed. McGrawHill Educación, México.

Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S. y Crowe, S. (2014). Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiological Reviews*. 94, 329–354.

Bi, W., Man, H. y Man, M. (2014). Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: A review. *World Journal of Gastroenterology*. 20, 17020–17028.

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

Chari, S., Teysse, S. y Singer, M. (1993). Alcohol and gastric acid secretion in humans. *Gut*. 34, 843–847.

Daniels, I., Allum, W., Fielding, J. y Hallissey, M. (2005) Capítulo 2. The Anatomy and Physiology of the Stomach. Editores: Fielding, J. y Hallissey, M. En: *Upper Gastrointestinal Surgery*. 1, 17-37. Springer, Berlin.

Dohil, R. y Hassall, E. (2015). Gastritis, Gastropathy and Ulcer Disease. Editores: Wyllie, R. Kay, H. y Kay, M. En: *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease Volumen, 5* 277–292. Elsevier, Holanda.

Escobedo, W., Del Carpio J., Palacios, J. y Romero, I. (2012). Contribution to the ethnopharmacological and anti-*Helicobacter pylori* knowledge of *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 143, 363-371.

Escobedo, W., Gomez, E., Guerrero, R., Cardoso, A. y Romero, I. (2018). Gastroprotective Mechanism and Ulcer Resolution Effect of *Cyrtocarpa procera* Methanolic Extract on Ethanol-Induced Gastric Injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1, 1-12.

Fox, S. (2011). *Fisiología humana*. 12ª ed. McGraw-Hill Educación, México.

Frison, J. (1990). *La Úlcera*. 1a ed. Emeká Editores de Difusora Internacional S.A, Barcelona, España.

Ghoshal, N. y Bal, H. (1989). Comparative morphology of the stomach of some laboratory mammals. *Laboratory Animals*. 23, 21–29.

Glavin, G. y Szabo, S. (1992). Experimental Gastric-Mucosal Injury - Laboratory Models Reveal Mechanisms of Pathogenesis and New Therapeutic Strategies. *FASEB Journal*. 6, 825–831.

Gomes M. y Cléa, F. (2011). Gastric Ulcer Etiology, Peptic Ulcer Disease Jianyuan Chai, IntechOpen, Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/peptic-ulcer-disease/gastric-ulcer-etiology>. (última vez consultado el 28 de Octubre del 2018).

Hall, J. (2016). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 13a ed. Elsevier, Barcelona, España.

Ham, M., Akiba, Y., Takeuchi, K., Montrose, H., Marshall, J. y Kaunitz, J. (2012). Chapter 43. Gastroduodenal Mucosal Defense. Editor: Johnson, L. En: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 5, 1169-1208.

Hersch, P. (1995). Commercialization of medicinal plants from southwest Puebla, Mexico, *Economic Botany*. 49, 197-206.

Kangwan, N., Park, J., Kim, E. y Hahm, K. (2014). Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 5, 40–47.

Lee, E., Trasler, J., Dwivedi, S. y Leblond, C. (1982). Division of the mouse gastric mucosa into zymogenic and mucous regions on the basis of gland features. *American Journal of Anatomy*. 164, 187–207.

Lehninger, L., Nelson, D., Cox, M. y Cuchillo, C. (2005). *Principios de Bioquímica*. 4ª. ed. Ediciones Omega S.A, Barcelona, España.

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

Malfertheiner, P., Chan, K. y McColl, E. (2009). Peptic ulcer disease. *The Lancet*. 374, 1449-1461.

Martín, M., Alarcón de la Lastra, C. y Sánchez, V. (1993). *Bases fisiopatológicas y farmacológicas de la úlcera péptica*. 1ª. ed. Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

Masuda, E., Kawano, S., Nagano, K., Tsuji, S., Takei, Y., Tsujii, M. y Nakama, A. (1995). Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Gastroenterology*. 108, 58–64.

Mutoh, H., Hiraishi, H., Ota, S., Ivey, K. J., Terano, A. y Sugimoto, T. (1990). Role of oxygen radicals in ethanol-induced damage to cultured gastric mucosal cells. *The American Journal of Physiology*. 258, G603–G609.

Pérez, S., Taléns-V, R., Rius, S., Finamor, I. y Sastre, J. (2017). Redox signaling in the gastrointestinal tract. *Free Radical Biology and Medicine*. 104, 75-103.

Peskar, M., Lange, K. y Peskar, A. (1986) Ethanol stimulates formation of leukotriene C4 en rat gastric mucosa. *Prostaglandins*. 31, 283–293.

Pihan, G., Regillo, C. y Szabo, S. (1987). Free radicals and lipid peroxidation in ethanol- or aspirin-induced gastric mucosal injury. *Digestive Diseases and Sciences*. 32, 1395-1401.

Rang, H., Dale, M., Ritter, J. y Flower, R. (2008). *Farmacología*. 8ª ed. Elsevier, Barcelona, España.

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

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

Rosas, H., Terrazas, T., Gonzalez, E., Guzman, Y. y Soto, M. (2011). Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 134, 67-73.

Shaw, S., Herbert, V., Colman, N. y Jayatilleke, E. (1990). Effect of ethanol-generated free radicals on gastric intrinsic factor and glutathione. *Alcohol*. 7, 153–157.

Shin, J. y Kim, N. (2013). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the H pump inhibitors. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 19, 25-35.

Szelenyi, I. y Brune, K. (1988). Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 33, 865–871.

Tarnawski, S. (2005). Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Digestive Diseases and Sciences*. 50, S24-S33.