



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Estudio biodirigido de la actividad gastroprotectora de *Calea urticifolia*.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CURRICULAR

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO INDUSTRIAL

Presenta:
CARMEN RUTH SOTO PERULERO

Asesores:

Dra. Ma. Elena Sánchez Mendoza

Biól. Elizabeth Guarneros Bañuelos

ÍNDICE	página
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES.....	3
3.1. Úlcera gástrica.....	3
3.2. Modulación de la secreción de ácido.....	3
3.3. Epidemiología.....	5
3.4. Etiología.....	6
3.4.1. Factores agresores.....	7
3.4.1.1. Factores agresores endógenos.....	7
a) Secreción de ácido y pepsina.....	7
3.4.1.2. Factores agresores exógenos.....	8
a) Infección por <i>Helicobacter pylori</i>	8
b) Alcohol.....	9
c) Anti-inflamatorios no esteroideos.....	9
d) Tabaco.....	10
e) Estrés.....	11
3.4.2. Factores defensivos.....	11

3.4.2.1. Factores funcionales.....	12
a) Producción de moco.....	12
b) Bicarbonato.....	12
c) Flujo sanguíneo.....	12
d) Motilidad.....	13
3.4.2.2. Factores humorales.....	13
a) Prostaglandinas.....	13
b) Óxido nítrico.....	14
3.4.2.3. Factores neuronales.....	14
a) Neuronas sensoriales sensibles a capsaicina.....	14
3.4.2.4. Otros factores.....	15
a) Grupos sulfhidrilo.....	15
b) Proteínas de choque térmico.....	15
c) Sulfuro de hidrógeno.....	16
3.5. Tratamiento.....	17
3.5.1. Tratamiento farmacológico.....	17
3.5.1.1. Neutralizantes de la secreción ácida.....	17
a) Antiácidos.....	17

3.5.1.2. Inhibidores de la secreción ácida.....	18
a) Antagonistas de los receptores de histamina H ₂	18
b) Inhibidores de la bomba de protones.....	19
c) Anticolinérgicos (mayor afinidad M ₃).....	20
d) Antagonistas de la gastrina.....	20
3.5.1.3. Citoprotectores.....	21
a) Análogos de la prostaglandina.....	21
b) Sucralfato.....	21
c) Sales de bismuto coloidal.....	22
d) Acexamato de cinc.....	23
3.5.2. Tratamiento quirúrgico.....	23
3.5.3. Medicina alternativa.....	24
3.5.3.1. <i>Calea urticifolia</i>	25
4. JUSTIFICACIÓN.....	27
5. HIPÓTESIS.....	28
6. OBJETIVOS.....	29
6.1. OBJETIVO GENERAL.....	29
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	29

7. METODOLOGÍA.....	30
7.1. Material vegetal.....	30
7.2. Material biológico.....	30
7.3. Preparación de los extractos de <i>Calea urticifolia</i>	30
7.4. Fraccionamiento del extracto más activo.....	31
7.5. Fraccionamiento de F3 del extracto de diclorometano.....	31
7.6. Dosificación de extractos, fracciones, cristales y fármaco de referencia.....	32
7.7. Inducción de lesiones gástricas con etanol.....	33
8. RESULTADOS.....	34
8.1. Evaluación biológica de los extractos de <i>C. urticifolia</i>	34
8.2. Evaluación biológica de las fracciones del extracto de diclorometano.....	37
8.3. Evaluación biológica de los cristales obtenidos en la fracción F3 del extracto de diclorometano y del fármaco de referencia.....	39
9. DISCUSIÓN.....	41
10. CONCLUSIONES.....	44
11. BIBLIOGRAFÍA.....	45

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	Página
Figura 1. Incidencia de úlceras, gastritis y duodenitis. México, 2008.....	6
Figura 2. Efecto gastroprotector del extracto de diclorometano de <i>C. urticifolia</i> (1-100 mg/kg) en el modelo de lesiones inducidas por etanol en ratas.....	36
Figura 3. Fotografías del efecto gastroprotector del extracto de diclorometano de <i>C. urticifolia</i> . (A) Grupo control, Extracto de diclorometano a dosis de: (B) 30 mg/kg y (C) 100 mg/kg.....	37
Figura 4. Efecto gastroprotector de las fracciones F2 (hexano-acetato 9:1), F3 (hexano/acetato 7:3), F4 (hexano/acetato 5:5) y F5 (acetato 100%) obtenidas del extracto de diclorometano de <i>C. urticifolia</i> a la dosis de 30 mg/kg.....	38
Figura 5. Efecto gastroprotector de los cristales obtenidos de la fracción F3 (hexano/acetato 7:3) obtenida del extracto de diclorometano de <i>C. urticifolia</i> (3-30 mg/kg) y del fármaco de referencia CB (Carbenoxolona, 100 mg/kg).....	40
Tabla 1. Plantas mexicanas con actividad gastroprotectora.....	25
Tabla 2. Efecto gastroprotector de los extractos de hexano, diclorometano y metanol de <i>Calea urticifolia</i>	34
Imagen 1. Fotografía de <i>Calea urticifolia</i>	26
Imagen 2. Compuestos reportados en la bibliografía.....	26

AGRADECIMIENTOS

Con todo mi amor a mis padres Paula Perulero Valente y Guillermo Soto Soubervielle, por su cariño, sacrificios y trabajo y por haberme proporcionado la mejor educación y lecciones de vida. Es por su apoyo incondicional que hoy puedo alcanzar esta meta. Es un privilegio ser su hija.

A mi hermana Soledad por acompañarme siempre y alentarme a seguir adelante.

A mis asesores Dra. Ma. Elena Sánchez Mendoza y Dr. Jesús Arrieta Valencia por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo y por su confianza, afecto y amistad. Sus conocimientos, experiencia, motivación y paciencia han sido fundamentales para lograrlo.

A mi coasesora Biól. Elizabeth Guarneros Bañuelos por su visión crítica como docente, por su cariño, apoyo y consejos que ayudaron en mi formación como persona y como profesional.

Al Instituto Politécnico Nacional por permitirme estudiar y ser una profesional

“La Técnica al servicio de la Patria”

1. RESUMEN

La úlcera gástrica se considera un problema de salud mundial a pesar de que para su tratamiento se cuenta con fármacos que actúan en diferentes niveles como son los citoprotectores, los neutralizantes e inhibidores de la secreción ácida. La mayoría de estos fármacos producen reacciones adversas, lo cual hace evidente la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas, dentro de las cuales se encuentra el estudio de plantas medicinales. En el Estado de Chiapas, se utiliza la planta *Calea urticifolia* para el tratamiento de gastritis y úlcera gástrica, sin embargo, no existe evidencia científica que corrobore su utilidad terapéutica. Es por ello que el objetivo de este estudio fue determinar la actividad gastroprotectora de *C. urticifolia* mediante un estudio biodirigido empleando el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas Wistar. Para ello, hojas secas y molidas de *C. urticifolia* (2.7 kg) fueron extraídas a reflujo (2 h), primero con hexano, posteriormente con diclorometano y finalmente con metanol. De la evaluación de los extractos se determinó que el extracto de diclorometano fue el de mayor actividad, por lo que, fue sometido a una separación por cromatografía en columna, con cambios grandes de polaridad obteniéndose 5 fracciones. Posteriormente las fracciones fueron evaluadas a la dosis de 30 mg/kg en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas Wistar, en donde la fracción F3 (hexano-acetato, 70:30%) presentó la mayor actividad, por lo que se purificó por medio de cromatografía en columna obteniendo una mezcla

de compuestos con punto de fusión de 130-140° C. En este estudio se demostró que *Calea urticifolia* presentó actividad gastroprotectora.

2. INTRODUCCIÓN

La úlcera gástrica se considera un problema de salud mundial, que afecta aproximadamente a 14,5 millones de personas en todo el mundo (Rozza, *et al.*, 2014). Esta enfermedad es vista como resultado de un desbalance entre los factores agresores (ácido, pepsina y *Helicobacter pylori*) y los factores defensivos (mucina, prostaglandinas, bicarbonato y óxido nítrico, entre otros).

Para su tratamiento se cuenta con fármacos entre los cuales se encuentran citoprotectores, inhibidores y neutralizantes de la secreción ácida. Sin embargo, la mayoría de estos fármacos producen reacciones adversas, incluida la toxicidad e incluso pueden alterar los mecanismos bioquímicos del cuerpo con su uso crónico (Sumbul, *et al.*, 2011), lo cual hace evidente la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas. Considerando que algunos de los metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales han proveído una base para el descubrimiento y desarrollo de los fármacos, continúa siendo importante el estudio de las mismas, es por ello que se utilizaron hojas de *Calea urticifolia* como base de este estudio.

Calea urticifolia es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades, tales como cáncer, gastritis y úlcera gástrica (Ohguchi, *et al.*, 2009, Yamada *et al.*, 2004), sin embargo referente a estas

dos últimas enfermedades no existe evidencia científica que corrobore su utilidad terapéutica, por lo que el presente estudio está encaminado a determinar la actividad gastroprotectora de esta planta.

3. ANTECEDENTES

3.1. Úlcera gástrica

La úlcera gástrica es una lesión del tejido gástrico producida por exposición al ácido. Se presenta como una lesión patológica en el tracto digestivo expuesto a agentes ulcerogénicos y se considera como resultado de un desbalance entre los factores agresores y defensivos (Farzaei, *et al.*, 2013).

3.2. Modulación de la secreción de ácido

Existen dos tipos de secreción ácida fisiológica: 1) la basal, cuyo principal estímulo es la acetilcolina y 2) la inducida por el alimento, que en un 90% es debido a la gastrina. La secreción de gastrina es modulada por un mecanismo de retroalimentación negativa como el de la alcalinización; por ejemplo, la alimentación estimula la liberación de gastrina y por ende, la secreción ácida, mientras que la acidificación, como la provocada por el ayuno, inhibe la liberación de gastrina y disminuye la secreción ácida. El ácido es el inhibidor más importante de la liberación de gastrina y por lo tanto de la secreción gástrica (Gennaro, 2003, Lorenzo, 2008).

Las enfermedades como la úlcera gástrica son mediadas por el ácido gástrico. El ácido clorhídrico es secretado por las células parietales del cuerpo

del estómago y es regulado por las células endocrinas, paracrinas y neurocrinas adyacentes. La célula parietal posee receptores de acetilcolina (neurocrina), gastrina (endocrina), histamina (paracrina), somatostatina (endocrina) y prostaglandina E₂ (paracrina). De forma directa la acetilcolina (ACh) liberada por estimulación vagal a partir de fibras postganglionares y la gastrina liberada a partir de las células G del antro pilórico, activan los canales de calcio, interactuando con los receptores M₃ y gastrina-CCK-B, respectivamente, provocando la acumulación intracelular de calcio. El calcio, a su vez, estimula a la proteincinasa que fosforila a la bomba de protones (H⁺/K⁺ ATPasa). Esta bomba intercambia K⁺ extracelular por H⁺ intracelular y es, por lo tanto, la vía final común de la secreción ácida. Tanto la ACh como la gastrina también afectan de manera indirecta a las células parietales al incrementar la liberación de histamina a través de la activación de las células enterocromafines (ECL) presentes en el fondo del estómago. La histamina actúa sobre receptores H₂ localizados en la membrana basolateral de la célula parietal como mediador común y estimula a la adenilatociclase para convertir el ATP en AMP cíclico (AMPc), el cual activa a la proteincinasa, siendo esta última la activadora de la bomba de protones.

Por otra parte, la secreción ácida gástrica es regulada de forma negativa debido a la liberación de mediadores como la somatostatina y la prostaglandina E₂. La somatostatina es sintetizada en las células D del antro pilórico y es liberada principalmente en respuesta a la disminución del pH intragástrico. Una vez liberada, actúa sobre receptores localizados en las

células G y en las células ECL, inhibiendo la liberación de gastrina e histamina, respectivamente, al igual que la prostaglandina E₂ actúa en la célula parietal ejerciendo un potente efecto inhibitor de la secreción ácida gástrica (Gennaro, 2003). Estas enfermedades adquieren gran relevancia debido a que afectan a un gran número de personas hoy en día.

3.3. Epidemiología

En nuestro país el comportamiento epidemiológico de la úlcera, gastritis y duodenitis del 2003 al 2008 fue ascendente (Figura 1). En el año 2008, se reportaron 1 523 116 casos, presentando una incidencia de 1 767.07 por cada 100 000 habitantes, mientras que para el año 2011, la úlcera gástrica ocupó el primer lugar en índices de morbilidad a nivel nacional. Se trata de una enfermedad relativamente frecuente, aproximadamente un 10% de la población presenta síntomas a lo largo de su vida y al menos un 25% de éstos tienen complicaciones graves, que requieren asistencia hospitalaria en muchos casos. Se estima que la prevalencia en personas infectadas por el *Helicobacter pylori* es del 10 al 20%. Se calcula que aproximadamente el 50% de la población adulta, el 20% de niños menores de diez años y el 80% de las personas mayores de 70 años, están infectados por *Helicobacter pylori*.

Por otro lado, se ha reportado que no existen diferencias en la úlcera gástrica, en lo que al género se refiere y la máxima incidencia alcanza una meseta a los 25 años en el varón y a los 45 en la mujer.

Actualmente, debido a la mejora en las terapias disponibles, apenas afecta a la esperanza de vida de los pacientes, siendo su tasa de mortalidad (debido a las complicaciones) de 2 a 3 casos por 100,000 habitantes. Al respecto se reporta que de entre un 50% y el 80% de las hemorragias digestivas atendidas hospitalariamente presentan antecedentes de haber utilizado fármacos Antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) de manera reciente (Secretaria de salud, 2010).

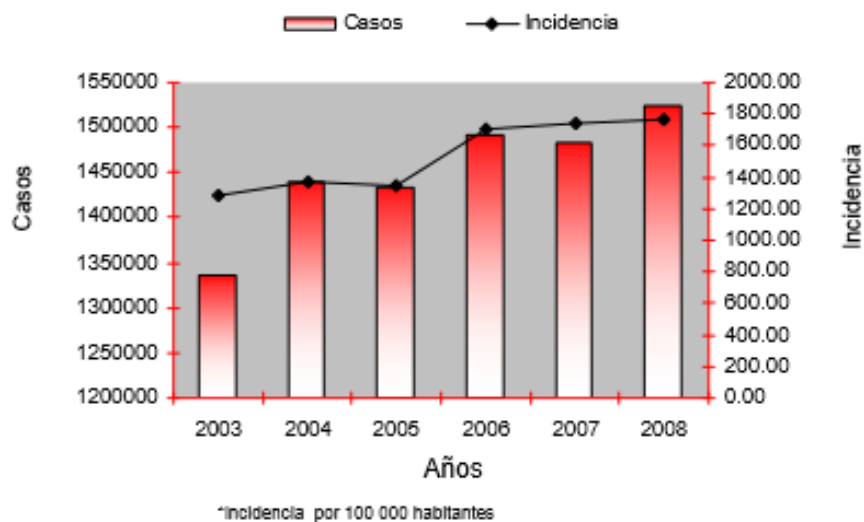


Figura 1. Incidencia de úlceras, gastritis y duodenitis. México, 2008. Imagen tomada de SUIVE/DGAE/Secretaria de Salud

3.4. Etiología

Esta enfermedad es vista como resultado de un desbalance entre los factores agresores (endógenos o exógenos) y defensivos (factores funcionales, humorales y neuronales). Incluso la secreción de ácido normal puede causar ulceración si los factores protectores gástricos son rebasados (Hagymasi y Tulassay, 2010).

3.4.1. Factores agresores

Los factores agresores pueden ser endógenos o exógenos, dentro de los primeros tenemos al ácido gástrico y la secreción de pepsina y dentro de los exógenos están las infecciones por *Helicobacter pylori*, el alcohol, el uso de los medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's), el tabaco y el estrés (Toma *et al.*, 2005, Oyagi, *et al.*, 2010).

3.4.1.1. Factores agresores endógenos

a) Secreción de ácido y pepsina

La producción y secreción de ácido en el estómago, permite la destrucción de microorganismos presentes en los alimentos, además de activar a la pepsina, la cual es una enzima que necesita de un pH ácido (entre 1,8 a 3,5) para iniciar la digestión de las proteínas; y contribuye, químicamente, a la desintegración de los alimentos en sus componentes elementales, facilitando su absorción en la mucosa intestinal. El mejor mecanismo periférico para la regulación de la secreción de ácido gástrico lo constituye el nivel plasmático de gastrina, que se eleva por la llegada de alimentos a la región antral (principalmente proteínas y aminoácidos) y disminuye el nivel cuando se inhibe la secreción de gastrina por un pH intragástrico menor de 3. Este mecanismo que suprime la liberación de gastrina por el nivel de acidez (pH < 3), representa el mecanismo más importante de prevención excesiva de ácido. Un nivel de pH intragástrico mayor de 3, en presencia de alimentos, puede dar lugar a una hipergastrinemia (González, 2010).

3.4.1.2. Factores agresores exógenos

a) Infección por *Helicobacter pylori*

La infección debida a *Helicobacter pylori* es un problema de salud pública importante en varias partes del mundo. Debido a que este patógeno se asocia a diversas enfermedades gástricas, que van desde molestias leves, como gastritis superficial, a enfermedades graves, como la gastritis crónica atrófica, cáncer gástrico o úlcera péptica (gástrica o duodenal). *H. pylori* degrada la capa de moco y bicarbonato eliminando de esta forma un factor de protección de la mucosa, favoreciendo así el daño. Así mismo, tiene factores de virulencia que son necesarios para colonizar el ambiente ácido del estómago y para sobrevivir en él. De éstos, los más notables son la ureasa y las adhesinas. La ureasa metaboliza la urea en amoníaco y dióxido de carbono, que contribuye a la neutralización del ácido gástrico. Además, la ureasa es fuertemente inmunogénico y quimiotáctica para los fagocitos, y promueve la producción de las citocinas proinflamatorias como interleucina IL-1 β , IL-6 e IL-8, así como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Aproximadamente el 20% de la población de *H. pylori* en el estómago se adhiere a las células epiteliales por medio de las adhesinas, mientras que el resto se encuentra en la capa de la mucosa. La proteína activadora de neutrófilos de *H. pylori* (HP-NAP) permite a las bacterias capturar hierro, que es esencial para su crecimiento. HP-PAN es particularmente importante en la patogénesis de la infección debido a que induce adhesión y quimiotaxis de los

fagocitos mononucleares y polimorfonucleares. HP-PAN activa la enzima oxidasa NADPH, que está implicada en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), también estimula la producción de IL-12 e IL-23 por los neutrófilos y los monocitos; y estas citoquinas promueven la inflamación. Debido a sus propiedades, HP-PAN aumenta el grado de inflamación de la mucosa gástrica y el daño continuo a las células gástricas causadas por ROS (Ayala, *et al.*, 2014).

b) Alcohol

El etanol es conocido por producir erosión, lesiones ulcerativas y hemorragia petequiral en la mucosa del estómago en los seres humanos, ya que es un agente necrosante que penetra rápidamente en la mucosa gástrica, causando daño de la membrana. Se ha sugerido que las lesiones de la mucosa gástrica inducidas por etanol en los seres humanos están mediadas por la generación de radicales libres y a través de la liberación de mediadores inflamatorios, que inducen vasoconstricción/isquemia y finalmente muerte celular (Oyagi, *et al.*, 2010, Kim, *et al.*, 2012).

c) Anti-inflamatorios no esteroideos

El consumo de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's) es una causa importante de morbilidad y mortalidad entre los consumidores. Los datos epidemiológicos sugieren que aumentan el riesgo de complicaciones de úlcera y muerte de 3-10 veces (Hawkey, *et al.*, 2002). Aunque son eficaces para el alivio del dolor, en un amplio espectro de condiciones y enfermedades

que van desde un resfriado común a la artritis reumatoide. Sin embargo, se sabe que alteran la resistencia de la mucosa al ácido gástrico a través de mecanismos que incluyen la supresión de la producción de prostaglandinas al inhibir, con mayor o menor potencia y especificidad, las isoformas COX1 y COX2 de la ciclooxigenasa, y por lo tanto están asociadas con eventos adversos, tales como las úlceras gástricas (Sugano, *et al.*, 2012). La isoforma COX1 se expresa de forma constitutiva (constante) en la mayor parte de los tejidos; mientras la COX2 es inducida en las inflamaciones. La COX1 es esencial para el mantenimiento del estado fisiológico normal de muchos tejidos, incluidos la protección de la mucosa gastrointestinal. La COX2, es inducida en la inflamación por varios estímulos como citocinas, endotoxinas y factores de crecimiento, origina prostaglandinas inductoras, que contribuyen al desarrollo del edema, rubor, fiebre e hiperalgesia. Diversos prostanoides, especialmente la prostaciclina y la PGE₂, son fundamentales para proteger la mucosa gástrica de los efectos corrosivos del ácido estomacal, así como para mantener la condición naturalmente sana de la mucosa gástrica (Batlouni, 2010).

d) Tabaco

El tabaquismo aumenta la incidencia y la tasa de recaída de las úlceras gástricas y retrasa su cicatrización. Implica una alteración en el equilibrio entre los factores agresivos y defensivos. Hay evidencia que indica que el incremento de la nicotina puede inclinar la balanza, favoreciendo los factores

agresivos y atenuando factores defensivos. De tal manera que la administración crónica de nicotina puede conducir a un aumento de la sensibilidad de los receptores muscarínicos, y en consecuencia, la secreción ácida basal. Así mismo la nicotina podría ejercer efectos estimulantes directos sobre las células parietales y potenciar la respuesta mediada por histamina.

Por otra parte, el alcaloide parece agravar otros factores agresivos, como pepsinógeno, y potenciar la úlcera inducida por *H. pylori*. En el extremo opuesto, los factores defensivos, (flujo sanguíneo de la mucosa gástrica, la restitución de la mucosa y las prostaglandinas), son atenuados por la administración de nicotina (Wu y Cho, 2004).

e) Estrés

La etiología de las úlceras por estrés está relacionada con la isquemia y con la acidosis tisular, aunque la pepsina y el ácido luminal son requisitos para que ocurra la úlcera. El flujo sanguíneo mucoso esta disminuido en todas las situaciones de estrés lo que conlleva a la isquemia de la mucosa, esta isquemia reduce la capacidad de la mucosa gástrica para neutralizar el ácido que entra al tejido, lo que genera acumulación de protones dentro del tejido, acidificación de la mucosa y ulceración (Montenegro, *et al.*, 2002).

3.4.2. Factores defensivos

La mucosa gástrica posee mecanismos de defensa, los cuales se clasifican en factores funcionales, humorales y neuronales, entre otros

(Tulassay y Herszényi, 2010). Dentro de los factores funcionales se encuentran la secreción de moco, bicarbonato, la microcirculación y la motilidad, en tanto que las prostaglandinas y el óxido nítrico corresponden a factores humorales y finalmente las neuronas sensibles a capsaicina constituyen los factores neuronales (Arrieta, *et al.*, 2009).

3.4.2.1. Factores funcionales

a) Producción de moco

El moco gástrico conforma una lámina glucoproteica que se adhiere a la superficie de la mucosa gástrica. La principal función fisiológica del moco consiste en actuar como barrera contra la acidez gástrica y por lo tanto es capaz de prevenir la úlcera. Aunque el moco por sí mismo no puede amortiguar magnitudes importantes de ácido, la capa mucosa es capaz de retardar pero no de impedir la penetración del ácido luminal (Kelley, 1993).

b) Bicarbonato

La secreción de bicarbonato contribuye a la protección de la mucosa al mantener un gradiente de pH en la capa de moco que cubre las células epiteliales superficiales (Kelley, 1993).

c) Flujo sanguíneo

Uno de los mecanismos a través del cual la mucosa mantiene su integridad, es a través del incremento del flujo sanguíneo, acción que ha sido observada cuando se presenta una hipersecreción gástrica. La isquemia por

lo tanto va a exacerbar el efecto de los agentes que dañan la mucosa (González, 2010).

d) Motilidad

Las altas amplitudes de las contracciones y la restricción temporal del flujo sanguíneo de la mucosa provocadas por los AINE's reducen la resistencia de la mucosa gástrica. La hipermotilidad inducida por los AINE's está relacionada con una deficiencia de prostaglandinas causada por la inhibición de la COX1, lo que sugiere que las prostaglandinas provenientes de la COX1 participan de manera importante en la reducción de la motilidad gástrica lo que se traduce como una protección para la mucosa gástrica (Arrieta, 2001).

3.4.2.2. Factores humorales

a) Prostaglandinas

Las prostaglandinas (PGs) se sintetizan a partir del ácido araquidónico por la ciclooxigenasa constitutiva (COX1), y por la ciclooxigenasa inducible (COX2). La mucosa gástrica puede protegerse mediante la estimulación de ambas ciclooxigenasas. La inhibición de la COX1 da como resultado daño en la mucosa e incrementa la acción perjudicial de irritantes fuertes como el etanol al 100%. La COX-2, se activa en respuesta a diversos estímulos pro inflamatorios, tales como mitógenos, hormonas y citoquinas, y se considera responsable de la producción de PGs en los sitios inflamatorios. La prostaglandina E₂ (PGE₂) desempeña un papel importante en la activación de una proteína inhibidora que bloquea la activación histamínica inhibiendo de

esta forma la secreción de ácido hacia el estómago. Una función adicional de la PGE₂ en la mucosa gástrica es aumentar la secreción de bicarbonato y moco, lo que mejora la resistencia de la mucosa a las lesiones. Por lo tanto, el efecto combinado de la PGE₂ consiste en inhibir la secreción ácida y aumentar la protección de la mucosa (Tsukimi y Susumu, 2001, Gennaro, 2003).

b) Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por la enzima sintasa de óxido nítrico (NOS). Se han identificado dos tipos de NOS, una de ellas, la NOS constitutiva (cNOS), se libera en condiciones normales; el NO liberado por esta enzima actúa por un mecanismo de transducción subyacente a varias respuestas fisiológicas. El otro tipo de la NOS, que se refiere a la NOS inducible (iNOS), sólo es inducida por ciertas citoquinas, tales como lipopolisacárido (LPS) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). El NO producido juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la mucosa, ya que regula la secreción de moco, la motilidad gástrica, y la microcirculación. En consecuencia, el efecto citoprotector de NO podría estar relacionado con la modulación de factores defensivos humorales (Tsukimi y Susumu, 2001).

3.4.2.3. Factores neuronales

a) Neuronas sensoriales sensibles a capsaicina

Las neuronas sensoriales sensibles a capsaicina contribuyen a la protección de la mucosa. El péptido relacionado con el gen de la calcitonina

(CGRP) es un neurotransmisor de los nervios sensoriales sensibles a la capsaicina que son conocidos por mediar la respuesta hiperémica gástrica después de una alteración de la mucosa y son importantes en la modulación de la integridad de la mucosa gástrica. De hecho, la ablación funcional de estas neuronas empeora la respuesta ulcerogénica de la mucosa a una variedad de agentes nocivos y perjudica la curación de las lesiones gástricas (Tashima *et al.*, 1998).

3.4.2.4. Otros factores

a) Grupos sulfhidrilo

Varios agentes endógenos, tales como sulfhidrilo (SH), limitan la producción de radicales libres derivados del oxígeno, y podrían estar relacionados con la protección celular. Compuestos que contienen SH, son agentes gastroprotectores y pueden mantener un incremento en el flujo de sangre que permite una rápida recuperación de daños en la superficie epitelial. De la misma manera, varias enzimas antioxidantes, tales como glutatión peroxidasa (GSH-Px), (antioxidante intracelular que inhibe el estrés oxidativo con la eliminación de peróxido de hidrógeno) y los hidroperóxidos de lípidos, juegan un papel importante en la protección celular (La Casa, *et al.*, 2000, Ali, *et al.*, 2013).

b) Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico (HSP) son proteínas de estrés que mantienen la homeostasis celular contra factores de estrés y se ha encontrado

que existe una correlación entre su inducción y la protección de la mucosa (Ali, et al., 2013).

Las proteínas de choque térmico, han sido implicadas como factores adicionales utilizados por los mecanismos de defensa de la mucosa gastrointestinal a nivel intracelular, probablemente a través de enzimas clave relacionados con la citoprotección.

Dentro de las funciones de la familia de las HSP se encuentran , reducir la desnaturalización y agregación de proteínas intracelulares inducidas por el estrés, y ejercer una acción citoprotectora mediante la protección de las mitocondrias y por interferir con la apoptosis inducida por el estrés (Repetto y Llesuy, 2002).

c) Sulfuro de hidrógeno

Se ha demostrado que el sulfuro de hidrógeno (H₂S) actúa como un nuevo transmisor gaseoso en los tejidos de mamíferos. Se expresa en las células musculares lisas, las neuronas entéricas, las células intersticiales de Cajal y las células epiteliales del tracto gastrointestinal (Liu, *et al.*, 2012).

Se han documentado varios papeles fisiológicos para H₂S que incluyen la vasodilatación, la neuromodulación y relajación del músculo liso. Además, se ha reportado que el H₂S exógeno protege la mucosa gástrica en diferentes modelos de úlcera gástrica inducida experimentalmente en ratas, y aumenta la liberación de NO a partir de endotelio vascular. Por otra parte, se ha

informado que NaHS, un donante de H₂S, induce la liberación de NO duodenal en la rata (Ali, *et al.*, 2014).

3.5. Tratamiento

En general la enfermedad ulcerosa ocurre siempre que haya un aumento de la secreción ácida o un descenso de la resistencia de la mucosa.

El pH puede aumentarse neutralizando el ácido (antiácidos) o inhibiendo la secreción gástrica (antagonistas de los receptores H₂ o inhibidores de la bomba de protones). Adicionalmente, la resistencia de la mucosa puede aumentarse con análogos de las prostaglandinas (Gennaro, 2003).

3.5.1. Tratamiento farmacológico

Los fármacos empleados en el tratamiento de enfermedades ácido-pépticas se describen a continuación.

3.5.1.1. Neutralizantes de la secreción ácida

a) Antiácidos

Los antiácidos son fármacos que reaccionan con el ácido clorhídrico para formar sal y agua. Esto neutraliza el ácido y, al hacerlo, aumenta el pH gástrico. Los antiácidos son ampliamente usados para el alivio de la acidez y se clasifican en absorbibles y no absorbibles. Dentro de los absorbibles se encuentran el bicarbonato de sodio y el carbonato de calcio; y dentro de los no absorbibles están el hidróxido de aluminio y el hidróxido de magnesio. Sin

embargo, los efectos colaterales provocados pueden ser trastornos electrolíticos y alcalosis. Por su parte, la ingestión de grandes cantidades de carbonato de calcio puede producir hipercalcemia, alcalosis e insuficiencia renal, mientras que en el consumo de hidróxido de magnesio, el ión magnesio ejerce una acción osmótica reteniendo agua y produciendo diarrea, y el tratamiento prolongado con antiácidos que contienen aluminio puede causar osteoporosis, así como neurotoxicidad (Gennaro, 2003).

3.5.1.2. Inhibidores de la secreción ácida

a) Antagonistas de los receptores de histamina H₂

Existen tres receptores histamínicos, de ellos el tipo H₂ media la secreción ácida que realizan las células parietales del estómago. Los fármacos antagonistas de estos receptores actúan bloqueándolos en las células parietales, provocando una inhibición de la secreción ácida, con lo cual se reduce el volumen total de secreción y las concentraciones de hidrogeniones, acelerando la cicatrización de las úlceras. A largo plazo, reducen también la incidencia de recaídas y las molestias en caso de reflujo gastroesofágico y disminuyen la incidencia de hemorragias en situaciones de riesgo. Los efectos colaterales de su uso incluyen cefaleas, malestar general, mareos, náuseas, diarrea, constipación y hepatotoxicidad leve. Ejemplos de estos fármacos son: Cimetidina, Famotidina, Nizatidina y Ranitidina (Gennaro, 2003).

b) Inhibidores de la bomba de protones

Son los antiseoretos más potentes, actúan en el polo apical de las células parietales gástricas (células que se encargan de la producción del ácido gástrico) las cuales, expulsan los hidrogeniones (H^+) a la luz gástrica que se unirán a los iones cloro y formarán así el ácido clorhídrico. La inhibición de la enzima ATPasa H^+/K^+ conlleva una fuerte reducción de la secreción ácida, tanto la basal como aquella desencadenada por los diferentes estímulos. Los inhibidores de la bomba de protones inhiben irreversiblemente esta enzima, por lo que su efecto antisecretor perdura hasta que se sintetizan nuevas enzimas, proceso que dura aproximadamente 24 horas. Estos fármacos se usan para el tratamiento de corto plazo de la enfermedad ulcerosa péptica, el reflujo gastroesofágico, la úlcera gástrica y úlcera duodenal, entre otras. Un problema importante relacionado con el uso de estos fármacos es el aumento de la gastrina sérica, la cual es una hormona trófica que determina que proliferen las células de tipo enterocromafin. En ratas, se ha reportado que estas células producen histamina y son precursoras de los tumores carcinoides. Mientras que en estudios en humanos se ha demostrado que con el uso crónico de los inhibidores de la bomba de protones se produce un leve aumento en la población de células de tipo enterocromafin. Además de esto, los efectos colaterales que se pueden llegar a presentar son cefalea, diarrea, dolor abdominal, mareos, erupciones cutáneas y constipación. Los principales fármacos de este grupo son Lansoprazol y Omeprazol (Gennaro, 2003).

c) Anticolinérgicos (mayor afinidad M₃)

Los anticolinérgicos clásicos (atropina, escopolamina y propantelina) representaban el único grupo de fármacos capaz de inhibir la secreción ácida gástrica de forma efectiva. En la década de los ochenta se descubrieron los nuevos anticolinérgicos sintéticos Pirenzepina y Telenzepina con selectividad por el subtipo de receptor muscarínico M₃, que media los efectos estimulantes de la acetilcolina sobre la secreción ácida gástrica. Aunque efectivos clínicamente, no igualan la eficacia de los antagonistas H₂ ni, desde luego, la de los inhibidores de la bomba de protones y han sido relegados a un papel secundario dentro de la terapéutica farmacológica de las enfermedades relacionadas con el ácido. Dentro de los efectos adversos que presentan dichos fármacos se encuentran sequedad de la boca, estreñimiento y visión borrosa (Flórez y Esplugues, 1999).

d) Antagonistas de la gastrina

Se han descrito un gran número de sustancias que funcionan como antagonistas de la gastrina o, por su gran similitud estructural, de colecistocinina. Entre ellas se incluyen derivados del ácido glutarámico (Proglumida), análogos del triptófano (Benzotript), análogos de las benzodiazepinas (L365, 260), fragmentos del terminal carboxilo o derivados estructurales de la molécula del péptido original. Todos estos compuestos inhiben en mayor o menor medida la interacción de la gastrina con su receptor. Sin embargo, no se han realizado estudios clínicos controlados que

demuestren su eficacia en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el ácido, por lo que no pasan de representar una posibilidad teórica sin utilidad práctica en la actualidad (Flórez y Esplugues, 1999).

3.5.1.3. Citoprotectores

a) Análogos de la prostaglandina

Las prostaglandinas de la clase E actúan por un mecanismo de citoprotección al aumentar el flujo sanguíneo en la mucosa gastrointestinal y facilitar la producción de moco y bicarbonato. A dosis altas pueden inducir la cicatrización de la úlcera, pero dado que a estas dosis aparece un alto porcentaje de efectos secundarios tales como la diarrea, su indicación actual se limita a la profilaxis farmacológica de la gastropatía por AINE. No obstante, se han desarrollado derivados sintéticos resistentes a la degradación enzimática con aplicación clínica. Como es el caso de Misoprostol, el cual se usa como terapia combinada para prevenir la úlcera gastroduodenal en pacientes que deben tomar altas dosis de AINE no específicos para aliviar el dolor de osteoartritis o enfermedades reumáticas (Gennaro, 2003).

b) Sucralfato

Es una compleja sal de sacarosa, sulfato e hidróxido de aluminio. Tras su ingestión oral y en contacto con un pH gástrico bajo, se polimeriza y origina una pasta pegajosa cargada negativamente que se adhiere de modo selectivo a las proteínas o restos proteicos del cráter ulceroso, cargadas positivamente, formando una barrera protectora que impide la actuación del ácido y la pepsina

sobre la zona lesionada. Se une también a la mucosa sana, pero su afinidad por ella es 6 veces menor que aquélla por las zonas lesionadas. La manifestación de efectos adversos más frecuente es el estreñimiento y pueden aparecer otros síntomas inespecíficos, como sequedad de boca, náuseas, vómitos, molestias abdominales difusas, vértigo y erupciones cutáneas. Los niveles plasmáticos de aluminio se incrementan en forma dosis-dependiente en los pacientes con insuficiencia renal sometidos a diálisis, habiéndose descrito en estas situaciones varios casos de intoxicación por aluminio (Flórez y Esplugues, 1999).

c) Sales de bismuto coloidal

Existen distintos compuestos de utilización clínica: subsalicilato de bismuto, subcarbonato, subnitrito, etc. El dicitrato tripotásico de bismuto es el único fármaco con bismuto comercializado en España como protector de la mucosa. De escaso poder antiácido, es soluble en agua, pero sus moléculas forman una disolución coloidal. Forma un coágulo blanquecino insoluble que se une tenazmente a la superficie ulcerada (una propiedad no compartida por todas las sales de bismuto), de la cual no puede ser eliminada al mezclarse con el contenido gástrico, o por la peristalsis, y evita la actuación de los distintos agentes agresivos. Ejercen una actividad antibacteriana frente al *H. pylori*, aunque se desconoce el mecanismo de esta acción. Además, parece que incrementa la síntesis de prostaglandinas por la mucosa gástrica y aumenta la producción de bicarbonato. Por último, al igual que los primitivos

compuestos de bismuto, tiene actividad antipéptica y se une a las sales biliares, acciones que refuerzan la efectividad de su comportamiento antiulceroso. No obstante, conviene emplear este fármaco con precaución y no usarlo de manera prolongada (más de 8 semanas) en pacientes con insuficiencia renal o durante el embarazo (Flórez y Esplugues, 1999).

d) Acexamato de cinc

Presenta una efectividad antiulcerosa similar a la mostrada por los antagonistas H₂. Su mecanismo de acción es múltiple: inhibe la secreción ácida de forma moderada, protege de los efectos lesivos de los AINE, estimula la producción de moco o prostaglandinas y modula la respuesta vascular. El acexamato de cinc se absorbe poco y tiende a concentrarse en la parte más superficial de la mucosa gastroduodenal. Tras dosis orales repetidas se incrementan los niveles plasmáticos de cinc, pero estos incrementos son poco importantes y desaparecen 24 horas después de cesar la medicación. Por ello, su toxicidad a dosis terapéuticas es muy escasa y no se ha demostrado tampoco que tenga ningún efecto teratógeno (Flórez y Esplugues, 1999).

3.5.2. Tratamiento quirúrgico

Hace más de 30 años la cirugía desempeñaba un papel muy importante en el tratamiento de la úlcera péptica, puesto que en aquel momento era el único tratamiento que podía modificar la historia natural de la enfermedad e incluso curarla. Hoy en día, la cirugía ha quedado relegada sólo al tratamiento de las complicaciones. Se reserva a situaciones en las que los síntomas

persisten después de meses de tratamiento farmacológico. Las técnicas quirúrgicas tienen por finalidad disminuir la secreción ácida del estómago.

Algunos parámetros a considerar para la elección del procedimiento son el tipo de úlcera (sitio, tamaño, cronicidad), estado del paciente y sangrado. Entre las complicaciones posoperatorias tempranas en pacientes con úlcera péptica perforada están: Infección de herida quirúrgica, complicaciones respiratorias, complicaciones cardíacas, absceso residual, complicaciones renales y sepsis abdominal. Las complicaciones tardías son enfermedad por reflujo gastroesofágico, obstrucción intestinal o gástrica, anemia y litiasis vesicular (Martínez, 2013).

3.5.3. Medicina alternativa

Otra alternativa para el tratamiento de enfermedades está en el uso de la medicina tradicional, que comprende el uso de plantas medicinales.

El hombre utiliza las plantas con propósitos medicinales desde tiempos prehistóricos y aún en la actualidad tienen un papel clave en el mantenimiento de la salud de la mayor parte de la población mundial, pese a los avances de la medicina moderna. Se estima que en el mundo se utilizan cerca de 10,000 especies vegetales con fines medicinales, la mayor parte en sistemas de medicina tradicional.

En el caso de México se tiene registro de 56 plantas para el tratamiento de la úlcera gástrica, sin embargo sólo algunas de ellas cuentan con estudios

farmacológicos que avalan su utilidad terapéutica (Carvajal, *et al.*, 2009) (Tabla 1).

Tabla 1. Plantas mexicanas con actividad gastroprotectora.

Nombre científico	Nombre común	Referencia
<i>Hippocratea excelsa</i>	Cancerina	Navarrete <i>et al.</i> , 2002
<i>Amphipterygium adstringens</i>	Cuachalalate	Navarrete <i>et al.</i> , 2005
<i>Croton reflexifolius</i>	Huilocuahuatl	Reyes <i>et al.</i> , 2008
<i>Eupatorium aschembornianum</i>	Axihuitl	Sánchez-Mendoza <i>et al.</i> , 2010
<i>Tithonia diversifolia</i>	Árnica	Sánchez-Mendoza <i>et al.</i> , 2011
<i>Hyptis suaveolens</i>	Chía	Vera <i>et al.</i> , 2012

3.5.3.1. *Calea urticifolia*

Calea urticifolia es un arbusto de 1 a 2 m de altura, que presenta flores amarillas agrupadas en cabezuelas y sus hojas tienen forma ovada, a veces dentada y lustrosa en ambos lados. Esta planta pertenece a la familia *Compositae* y se utiliza en la medicina tradicional de ciertas regiones del estado de Chiapas, para el tratamiento de gastritis y úlcera gástrica, actividades que concuerdan con el uso tradicional en El Salvador (Ohguchi, *et al.*, 2009), sin embargo, no existe ningún estudio científico que avale su utilidad terapéutica.

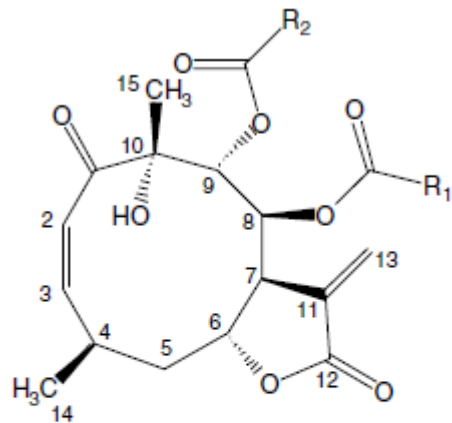
Se han reportado estudios fitoquímicos de *Calea urticifolia* que mencionan que contiene abundantes lactonas sesquiterpénicas con esqueleto

germacranólido, tales como caleina D (Imagen 2, compuesto 1), 2,3-epoxicalcina D, juanislamina (Imagen 2, compuesto 2), 2,3-epoxijuanislamina, 3,10-epoxi-9-(3-metilbutanol)-8-(2-metilpropenol)-15-hidroxi-1-oxo-germacra-2,4,11(13)-trien 12,6-olido etc., además de heiangólidos, derivados de isoeugenol y un derivado de fluoroglucina, a continuación se muestra una imagen de la planta (Imagen 1), (Yamada, *et al.*, 2004, Ohguchi, *et al.*, 2009).

Imagen 1. Fotografía de *Calea urticifolia*



Imagen 2. Compuestos reportados en la bibliografía



	R ₁	R ₂
1	CH ₃	C(=CH ₂)CH ₃
2	C(=CH ₂)CH ₃	C(=CH ₂)CH ₃

4. JUSTIFICACIÓN

La úlcera gástrica ocupa los primeros lugares en índices de morbilidad a nivel nacional. A pesar de que existen fármacos para su tratamiento, estos agentes aún no han resuelto definitivamente el problema y debido a ello, es necesaria la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, siendo una alternativa el estudio de plantas medicinales. En este sentido, considerando que *Calea urticifolia* es utilizada en la medicina tradicional para tratar la gastritis y úlcera gástrica, y que no existe evidencia científica que respalde su utilidad, el presente estudio está encaminado a estudiar la actividad gastroprotectora de *Calea urticifolia* en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas Wistar.

5. HIPÓTESIS

Si *Calea urticifolia* se utiliza en la medicina tradicional para el tratamiento de la úlcera gástrica, entonces se espera que extractos de dicha planta presenten efecto gastroprotector en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas Wistar.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad gastroprotectora de *Calea urticifolia* mediante un estudio biodirigido empleando el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas Wistar.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener los extractos de hexano, diclorometano y metanol de *Calea urticifolia*.
2. Determinar el extracto de mayor actividad gastroprotectora, utilizando el modelo de lesiones por etanol en ratas Wistar.
3. Separar por cromatografía en columna el extracto de mayor actividad gastroprotectora.
4. Identificar y purificar la fracción de mayor actividad gastroprotectora.

7. METODOLOGÍA

7.1. Material vegetal

La especie *Calea urticifolia* se colectó en Nandayalu, municipio de Suchiapa en el Estado de Chiapas en julio de 2014. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario CHIP, de Tuxtla Gutiérrez Chiapas y se le asignó el número de registro: 39871.

7.2. Material biológico

En el presente trabajo se utilizaron ratas Wistar macho con un peso entre 180-220 g, las cuales fueron adquiridas del Bioterio de la UAM Campus Xochimilco. Los procedimientos de manipulación de animales se llevaron a cabo conforme a la Norma Oficial Mexicana sobre el Cuidado y Manejo de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Los animales fueron colocados en cajas individual es con piso de malla de alambre para evitar la coprofagia y el contacto con el aserrín. Se privaron de alimento 24 h antes de iniciar los experimentos, permitiéndoles libre acceso al agua. Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando al menos siete animales por grupo (Vera, *et al.*, 2012).

7.3. Preparación de los extractos de *Calea urticifolia*

Las hojas secas y molidas de *Calea urticifolia* (2.7 kg) fueron extraídas a reflujo (2 h), primeramente con hexano, posteriormente con diclorometano y finalmente con metanol. Los disolventes se evaporaron en un rota evaporador

por medio de una destilación a presión reducida, obteniéndose de esta forma los extractos de hexano (102.2 g), diclorometano (150 g) y metanol (250 g) respectivamente.

7.4. Fraccionamiento del extracto más activo

De la evaluación de los extractos se determinó que el extracto de diclorometano fue el de mayor actividad, por lo que, 140 g fueron sometidos a una separación por cromatografía en columna, con cambios grandes de polaridad obteniéndose 5 fracciones: F1 (hexano 100%; 5 L, 2.1 g), F2 (hexano-acetato, 90:10%; 5 L, 25 g), F3 (hexano-acetato, 70:30%; 5 L, 29 g), F4 (hexano-acetato, 50:50%; 5 L, 67.5 g) y F5 (acetato 100%; 5 L, 14 g). Posteriormente las fracciones fueron evaluadas a la dosis de 30 mg/kg, siguiendo la metodología del punto 7.8., la fracción F1 fue inactiva y provocó más daño que protección por lo que su efecto no se presenta en los resultados.

7.5. Fraccionamiento de F3 del extracto de diclorometano

De la evaluación de las fracciones del extracto de diclorometano, las fracciones F3 y F4 resultaron activas, con valores de gastroprotección similares. En el presente trabajo se decidió trabajar solo con la fracción F3 para continuar el estudio biodirigido. Para ello se realizó una cromatografía en columna con 22 g de la fracción F3, utilizando un volumen de cambio de 540 mL, realizando cambios grandes de polaridad obteniéndose: 7 fracciones de hexano 100%, 18 fracciones de hexano-acetato 80:20% y 4 fracciones de hexano-acetato 50:50%.

De las fracciones de hexano-acetato 80:20%, que fueron las más activas se obtuvieron cristales impuros por lo que se realizó una cromatografía en columna de esas fracciones. Se obtuvieron: 5 fracciones de hexano 100%, 98 fracciones de hexano-acetato 90:10%, 9 fracciones de acetato 100% y 3 fracciones de metanol 100%.

Respecto a las fracciones de hexano-acetato 90:10% en ellas se observó la presencia de cristales desde la fracción F50” a la F68”, los cuales resultaron ser una mezcla de al menos 3 compuestos (punto de fusión 130-140°C) que se encuentran en proceso de purificación e identificación mediante estudios de resonancia magnética nuclear de $H^{1+}C^{13+}$ y espectrometría de masas.

7.6. Dosificación de extractos, fracciones, cristales y fármaco de referencia.

Los extractos hexánico y metanólico fueron evaluados a las dosis de 30 y 100mg/kg, mientras que el de diclorometano se evaluó a 1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg y las fracciones derivadas del extracto de diclorometano a 30 mg/kg. Los extractos y fracciones se suspendieron en Tween 80 al 0.5%, al momento de realizar los experimentos y se administraron por vía intragástrica (0.5 mL/100 g) por medio de una sonda orogástrica. Las ratas control sólo recibieron el vehículo (0.5% Tween 80), en el mismo volumen y por la misma vía de administración. Los cristales fueron evaluados a las dosis de 3, 10 y 30 mg/kg, mientras que el fármaco de referencia (Carbenoxolona) se evaluó a

100 mg/kg. Los cristales y el fármaco de referencia se suspendieron en Tween 80 al 0.5%, al momento de realizar los experimentos y se administraron por vía intragástrica (0.5 mL/100 g) por medio de una sonda orogástrica. Las ratas control sólo recibieron el vehículo (0.5% Tween 80), en el mismo volumen y por la misma vía de administración.

7.7. Inducción de lesiones gástricas con etanol.

Los extractos, fracciones, cristales y el fármaco de referencia se administraron a los diferentes grupos de animales, y 30 minutos después se les administró 1 mL de etanol absoluto, posteriormente transcurridos 120 minutos de la administración de etanol, los animales se sacrificaron en una cámara de CO₂. Inmediatamente se realizó la disección de los estómagos y estos fueron llenados con 10 mL de formol al 2 %, y colocados en un recipiente con formol al 2 % por cinco minutos. Pasado ese tiempo, los estómagos se abrieron a lo largo de la curvatura mayor. El área dañada (mm²) fue medida con la ayuda de un microscopio estereoscópico provisto de una rejilla métrica, y el índice de úlcera se calculó como la suma del área de todas las lesiones del corpus de cada estómago. El porcentaje de gastroprotección se determinó por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Gastroprotección} = \frac{\text{IUC} - \text{IUT}}{\text{IUC}} \times 100$$

En donde IUC es el índice de úlcera control (en mm²), y IUT es el índice de úlcera en presencia del compuesto de prueba (en mm²).

8. RESULTADOS

8.1. Evaluación biológica de los extractos de *Calea urticifolia*.

Los resultados de la evaluación biológica de los extractos de hexano, de diclorometano y de metanol de *Calea urticifolia* se muestran en la tabla 2. Como se puede observar los tres extractos presentaron actividad significativa a la dosis de 100 mg/kg, no obstante a la dosis de 30 mg/kg el extracto hexánico fue inactivo, en cambio los extractos de diclorometano y de metanol continuaron presentando un efecto gastroprotector significativo.

Cabe destacar que el extracto de diclorometano mostró un efecto gastroprotector constante a las dosis de 30 y 100 mg/kg, alcanzando valores de gastroprotección de 95.7 y 98.3%, respectivamente.

Los resultados anteriores permiten por una parte corroborar que *Calea urticifolia* presentó un efecto gastroprotector, y por otra asumir que presentó metabolitos activos de baja, mediana y alta polaridad.

Tabla 2. Efecto gastroprotector de los extractos de hexano, diclorometano y metanol de *Calea urticifolia*.

Extracto	Dosis (mg/kg)	n	IU (mm) ²	Gastroprotección (%)
Control	-	8	93 ± 7.1	-
Hexánico	30	8	77 ± 9.5	17.2 ± 10.2
	100	8	30 ± 7.1 *	67.2 ± 7.5
Diclorometano	30	8	4 ± 1.4 *	95.7 ± 1.5
	100	8	1.5 ± 0.5 *	98.3 ± 0.5
Metanol	30	8	24 ± 6.7 *	74.1 ± 7.2
	100	8	5 ± 2.2 *	93.7 ± 2.4

*p < 0.05 vs grupo control; IU = Índice de úlcera

Considerando que el extracto de mayor actividad fue el de diclorometano se procedió a determinar su efecto gastroprotector a dosis menores a las ya empleadas (1-100 mg/kg). Como se observa en la figura 2, aún con la dosis de 1 mg/kg se observó que el extracto de diclorometano mostró una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control y alcanzó prácticamente el 100% de gastroprotección a las dosis de 30 y 100 mg/kg, ya que el índice de úlcera fue de 4 y 1.5 mm², respectivamente, como se aprecia en las imágenes de la figura 3.

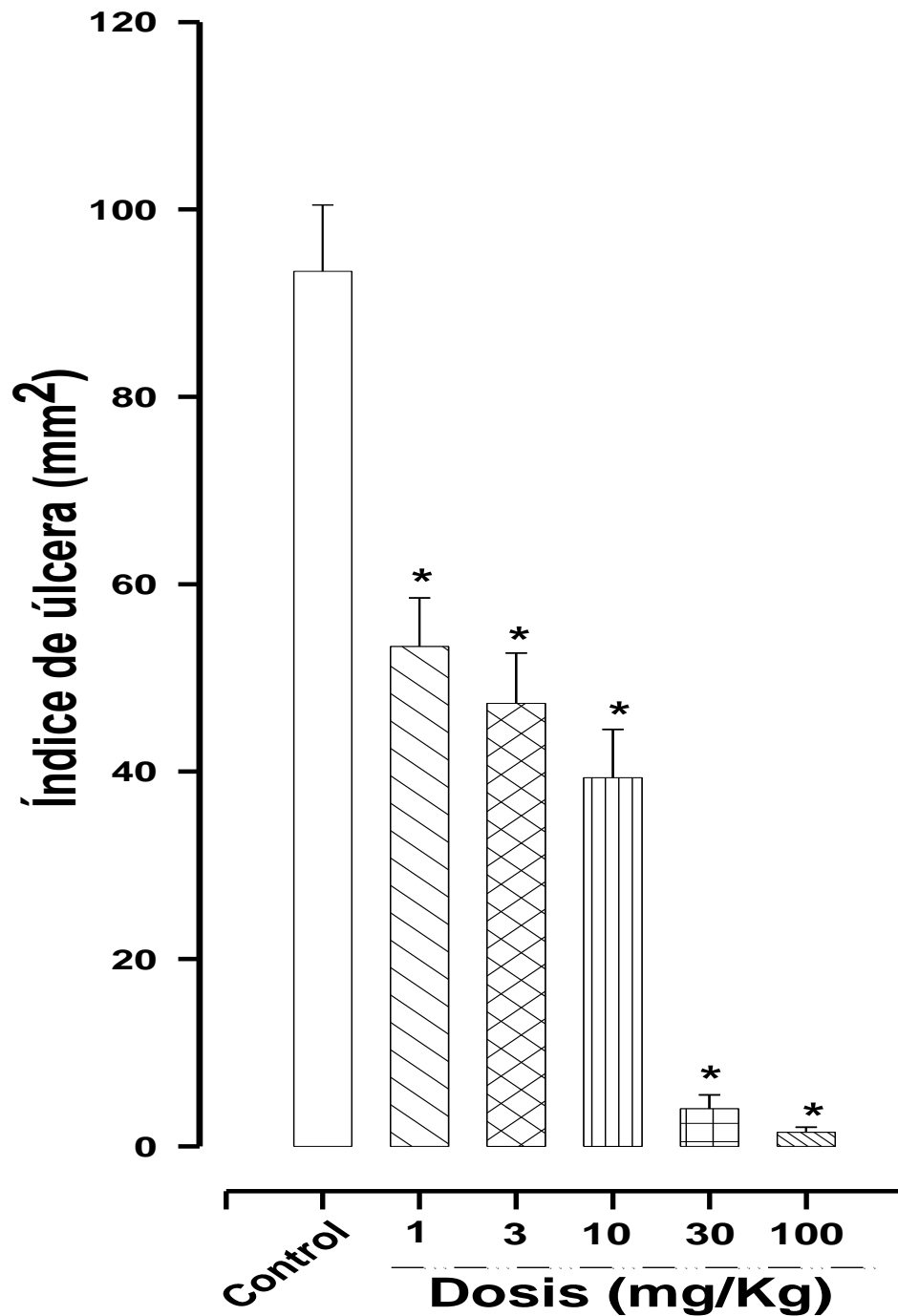


Figura 2. Efecto gastroprotector del extracto de diclorometano de *C. urticifolia* (1-100 mg/kg) en el modelo de lesiones inducidas por etanol en ratas. Cada barra representa el promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ contra el grupo control. Prueba de comparación múltiple de Dunn después de la prueba de Kruskal-Wallis.



Figura 3. Fotografías del efecto gastroprotector del extracto de diclorometano de *C. urticifolia*. **(A)** Grupo control, Extracto de diclorometano a dosis de: **(B)** 30 mg/kg y **(C)** 100 mg/kg.

8.2. Evaluación biológica de las fracciones del extracto de diclorometano.

De la separación por cromatografía en columna del extracto de diclorometano, se obtuvieron cinco fracciones, la fracción F1 (hexano 100%) no mostró protección, al contrario provocó más lesiones que las observadas en el grupo control por lo cual no se presentó en la figura 4; por otra parte las fracciones F2 (hexano/acetato 9:1) y F5 (acetato 100%) resultaron inactivas, en tanto que las fracciones F3 (hexano/acetato 7:3) y F4 (hexano/acetato 5:5) presentaron actividad gastroprotectora (figura 4), alcanzando valores de gastroprotección significativos, de 92 y 90% respectivamente.

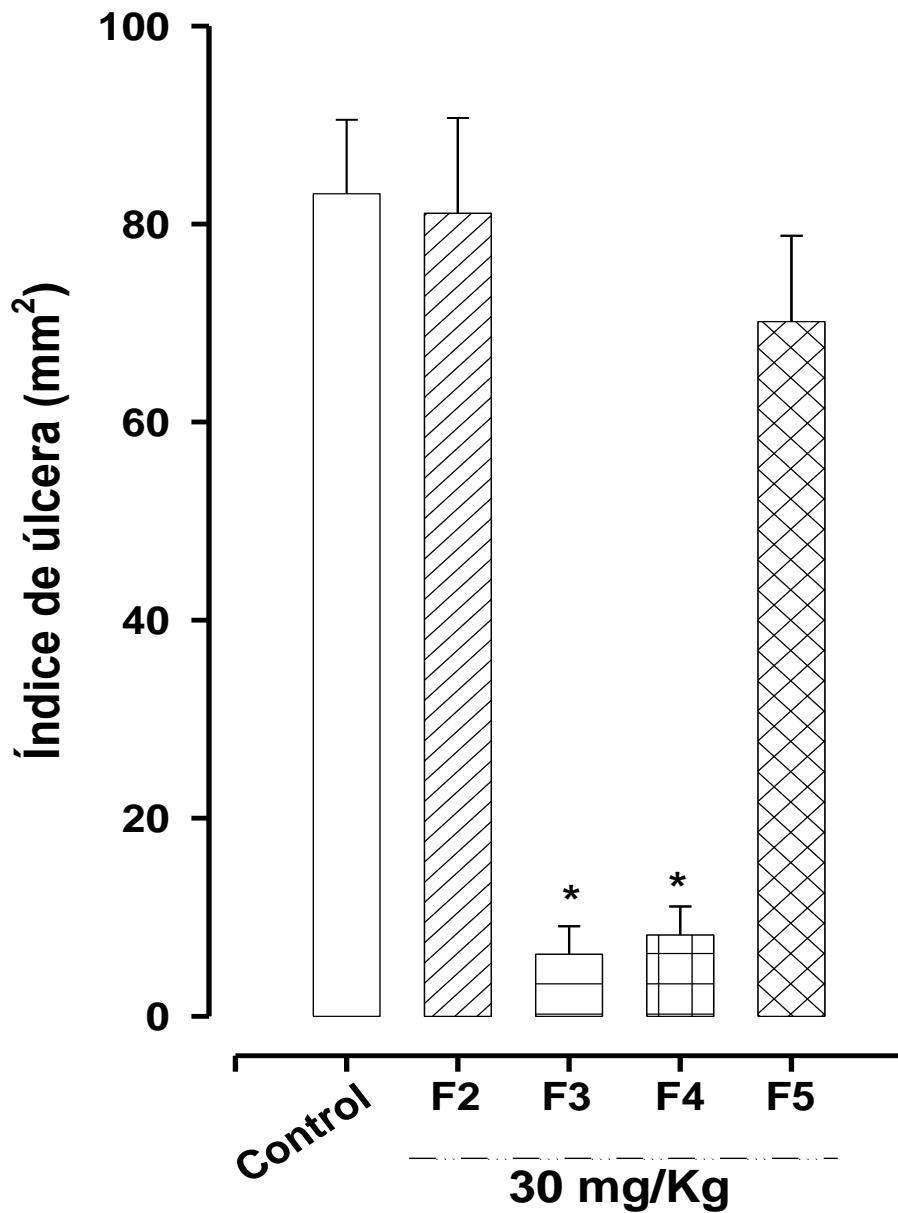


Figura 4. Efecto gastroprotector de las fracciones F2 (hexano-acetato 9:1), F3 (hexano/acetato 7:3), F4 (hexano/acetato 5:5) y F5 (acetato 100%) obtenidas del extracto de diclorometano de *C. urticifolia* a la dosis de 30 mg/kg. Cada barra representa el promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ contra el grupo control. Prueba de comparación múltiple de Dunn después de la prueba de Kruskal-Wallis.

8.3. Evaluación biológica de los cristales obtenidos en la fracción F3 del extracto de diclorometano y del fármaco de referencia.

El proceso de cromatografía en columna de la fracción F3 del extracto de diclorometano, permitió la obtención de cristales impuros, los cuales nuevamente fueron sometidos a cromatografía en columna, sin embargo, resultaron ser una mezcla de compuestos que presentaron punto de fusión de 130-140 °C. La mezcla de cristales presentaron una actividad gastroprotectora considerable (Figura 5), alcanzando valores de prácticamente 100% de gastroprotección a dosis de 10 y 30 mg/kg, siendo estos superiores a los resultados obtenidos con el fármaco de referencia evaluado a 100 mg/kg.

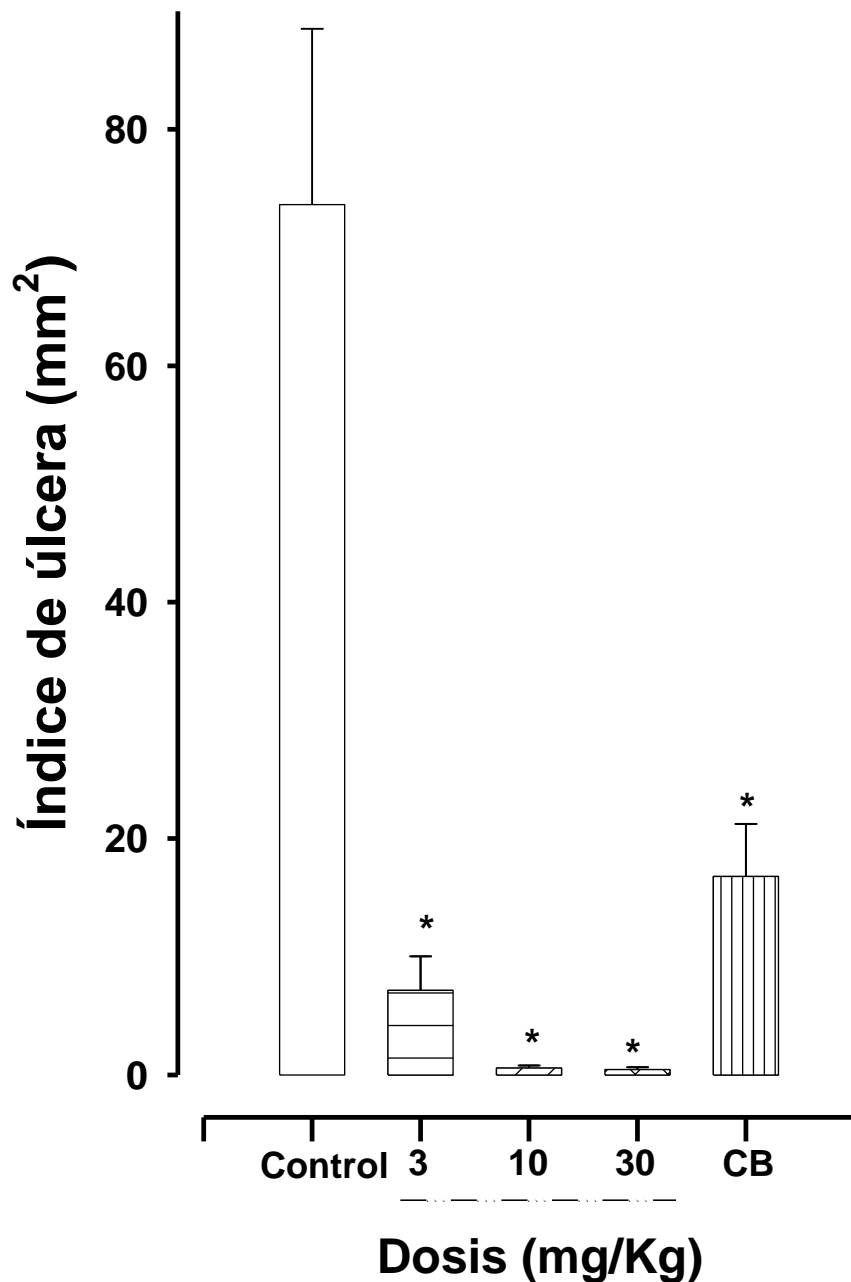


Figura 5. Efecto gastroprotector de los cristales obtenidos de la fracción F3 (hexano/acetato 7:3) obtenida del extracto de diclorometano de *C. urticifolia* (3-30 mg/kg) y del fármaco de referencia CB (Carbenoxolona, 100 mg/kg). Cada barra representa el promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ contra el grupo control. Prueba de comparación múltiple de Dunn después de la prueba de Kruskal-Wallis.

9. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que *Calea urticifolia*, produce un efecto gastroprotector en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas Wistar, lo cual sustenta el uso tradicional que se le da a esta planta en la medicina tradicional del estado de Chiapas y de El Salvador (Ohguchi, *et al.*, 2009, Sanchez, 2015). Los extractos de *C. urticifolia* mostraron un efecto gastroprotector significativo como se puede observar en la tabla 2; los tres extractos presentaron actividad gastroprotectora, lo que indica que esta planta contiene más de un compuesto activo. El extracto de diclorometano fue el más activo alcanzándose el máximo efecto con la dosis de 30 mg/kg (95.7%), un valor similar se obtuvo con el extracto metanólico pero a la dosis de 100 mg/kg, y respecto al extracto hexánico éste fue el que presentó menor actividad. Sin embargo, al ser un estudio biodirigido el principal objetivo era seguir el estudio con el extracto de mayor actividad, y debido a que el extracto de diclorometano mostró una mayor actividad gastroprotectora se optó por utilizar dicho extracto.

Para determinar la ventana de actividad biológica del extracto de diclorometano se evaluaron dosis en un intervalo de 1 a 100 mg/kg. Interesantemente, se encontró actividad desde 1 mg/kg, y prácticamente se alcanzó el 100% de gastroprotección con la dosis de 30 mg/kg (Figura 2), los resultados anteriores indican que el extracto de diclorometano contiene compuestos con una considerable actividad gastroprotectora. Cabe mencionar, que en la mayoría de los estudios realizados con extractos

utilizando el mismo modelo de etanol, reportan una gastroprotección cercana a 90% pero administran como mínimo la dosis de 50 y 100 mg/kg (Al-Sayed y El-Naga, 2015, Luiz-Ferreira, *et al.*, 2012, Rojas-Martínez, *et al.*, 2013, Sánchez-Mendoza, *et al.*, 2015) y en algunos casos ni siquiera con compuestos puros a 30 mg/kg se reporta esa gastroprotección; como es el caso del ácido elálgico, que únicamente alcanza el 70% de gastroprotección (Selhorst, *et al.*, 2011).

Siguiendo con el estudio biodirigido, el extracto de diclorometano se fraccionó mediante cromatografía en columna, obteniendo cinco fracciones de las cuales sólo dos mostraron un efecto gastroprotector significativo, F3 y F4, alcanzando valores de gastroprotección de 92 y 90%, respectivamente (figura 4). Para descartar que no se tratara del o los mismos compuestos activos, se realizó una cromatografía en capa fina en donde se colocaron muestras de ambas fracciones, y se observó que estas eluyeron de manera diferente lo cual indica que los compuestos presentes en dichas fracciones son distintos. También se trabajó con la fracción F3 del extracto de diclorometano, se realizaron cromatografías en columna de donde se obtuvieron cristales, sin embargo, resultaron ser una mezcla de compuestos con punto de fusión de 130-140°C. Al ser evaluados se encontraron valores de gastroprotección de prácticamente el 100% a las dosis de 10 y 30 mg/kg (figura 5), no obstante es necesario purificarlos y evaluar su efecto individual para determinar si el efecto gastroprotector se atribuye a uno solo de ellos, o si la administración conjunta produce una potenciación. Así mismo se utilizó como fármaco de referencia a

la Carbenoxolona (a una dosis de 100 mg/kg), el cual es un fármaco citoprotector obtenido a partir de la raíz del regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), encontrando que la actividad gastroprotectora de los cristales obtenidos de la planta son mucho más activos que éste.

De acuerdo con estudios fitoquímicos realizados a *Calea urticifolia* se menciona que contiene abundantes lactonas sesquiterpénicas con esqueleto germacranólido, por lo que los compuestos responsables de dicha actividad pudieran pertenecer a este grupo de compuestos (Yamada *et al.*, 2004). Existe evidencia científica en donde se muestra que un compuesto bioactivo aislado de *Carpesium triste var. manshuricum*, inhibe la producción de óxido nítrico y la expresión de la óxido nítrico sintasa, siendo un punto importante para justificar la actividad gastroprotectora de los compuestos con dicha estructura (Ruiz y Suarez, 2015).

Los resultados descritos en el presente trabajo, representan un punto de partida para investigaciones adicionales de compuestos gastroprotectores que están presentes en las hojas de *C. urticifolia*.

10.CONCLUSIONES

1. Se demostró que *Calea urticifolia* presentó actividad gastroprotectora en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas Wistar.
2. El extracto de diclorometano fue el más activo y de él se obtuvieron dos fracciones activas (F3 y F4).
3. De la fracción F3 se obtuvo una mezcla de compuestos activos los cuales resultaron ser más eficaces que el fármaco de referencia (Carbenoxolona) a dosis menores.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Sayed, E. y El-Naga. **(2015)**. Protective role of ellagitannins from *Eucalyptus citriodora* against ethanol-induced gastric ulcer in rats: impact on oxidative stress, inflammation and calcitonin-gene related peptide. *Phytomedicine*. 1: 5-15.
2. Ali, H., Syhadah, A., Mohan, S., Ameen, M., Ibrahim, S., Elhassan, M., Aziz, K., Mohd, N., Fai, M., Vadivelu, J. **(2013)**. Gastroprotective effect of desmosdumotin C isolated from *Mitrella kentii* against ethanol-induced gastric mucosal hemorrhage in rats: possible involvement of glutathione, heat-shock protein-70, sulfhydryl compounds, nitric oxide, and anti-*Helicobacter pylori* activity. *BMC Complementary & Alternative Medicine*. 13: 183.
3. Ali, S., Askari, H., Neisi, N., Veisi, A. **(2014)**. Antisecretory Effect of Hydrogen Sulfide on Gastric Acid Secretion and the Involvement of Nitric Oxide. *BioMed Research International*. 7: 480921.
4. Arrieta, J., Reyes-Trejo, B., Reyes-Ramírez, A., Sánchez-Mendoza, M. **(2009)**. Papel de los grupos sulfhidrilos, las prostaglandinas y el óxido nítrico endógeno, en la gastroprotección del lanosterol sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol en rata. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 40: 17-21.

5. Ayala, G., Escobedo, W., Cruz, C., Romero, I. **(2014)**. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*. 10: 1450-1469.
6. Batlouni, M. **(2010)**. Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales. *Arq Bras Cardiol*. 94(4): 538-546.
7. Carvajal, L., Hata Y., Sierra, N. **(2009)**. Preliminary phytochemical analysis of Cupatá (*Strychnos schultesiana krukoff*) stems and sedes. *Revista Colombia Forestal*. 12: 161-170.
8. Farzaei, M., Khazaei, M., Abbasabadei, Z., Feyzmahdavi, M., Mohseni, G. **(2013)**. Protective Effect of *Tragopogon Graminifolius* DC Against Ethanol Induced Gastric Ulcer. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 15: 813-816.
9. Flórez, J. y Esplugues, J. **(1999)**. Farmacología humana: Farmacología de la secreción ácida gástrica y de la ulceración mucosa digestiva. 3ª Edición. Editorial Masson España. 757-784.
10. Gennaro, A., Remington Farmacia: Drogas gastrointestinales y hepáticas **(2003)**. 20ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 2: 1431-1441.
11. González, R. **(2010)**. Efecto citoprotector de extractos acuosos de *Indigofera guatemalensis* e *Indigofera suffruticosa* en modelos de

úlceras gástricas inducidas por etanol en ratones. Universidad Dr. José Matías Delgado.

12. Hagymasi, K., Tulassay, Z. **(2010)**. Peptic ulcer: facts and questions. *Orv. Hetil.* 151: 1054-61.
13. Hawkey, C., Wilson, I., Næsdal, J., Långström, G., Swannell, A., Yeomans, N. **(2002)**. Influence of sex and *Helicobacter pylori* on development and healing of gastroduodenal lesions in non-steroidal anti-inflammatory drug users. *An International Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 51: 344–350.
14. Kelley, W. **(1993)**. Medicina interna: Secreción gástrica. Editorial Médica Panamericana, 2a Edición. 1: 427-432.
15. Kim, J., Park, S., Nam, S., Choi, Y. **(2012)**. Gastroprotective Effect of Selenium on Ethanol-Induced Gastric Damage in Rats. *International Journal of Molecular Sciences.* 13: 5740-5750.
16. La Casa, C., Villegas, I., Alarcón de la Lastra, C., Motilva, V., Martín Calero M. **(2000)**. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology.* 71: 45–53.
17. Liu, L., Cui, J., Song, C., Bian, J., Sparatore, A., Del Soldato, P., Wang, X., Yan, C. **(2012)**. H₂S-Releasing Aspirin Protects against Aspirin-

Induced Gastric Injury via Reducing Oxidative Stress. *PLOS ONE*. 7: e46301.

18. Luiz-Ferreira, A., Cola, M., Barbastefano, V., Meira, F., Almeida, A., Farias-Silva, E., Calvo, T., Hiruma-Lima, C., Vilegas, W., Souza-Brito, A. (2012). Antioxidant and Cytoprotective Properties of *Indigofera truxillensis* in Different Models of Gastric Ulcer in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 14973-14991.
19. Lorenzo P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro, M.A., Portolés, A. Velázquez Farmacología Básica y clínica: Farmacología de las secreciones gastrointestinales. (2008). 18ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 569-571.
20. Martínez, J. (2013). Indicaciones de tratamiento quirúrgico de la enfermedad ácido péptica. Instituto Mexicano del Seguro Social.
21. Montenegro, S., Tuhay, N., Miranda, G., Zamaniego, P. (2002). Manejo de la ulcera aguda por stress. Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina. N° 120.
22. Navarrete, A., Oliva, I., Sánchez-Mendoza, M., Arrieta J., Cruz, L., Castañeda, G. (2005). Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 57: 1629-36.

23. Navarrete, A., Trejo, J., Reyes, L. **(2002)**. Principles of root bark *Hippocratea excelsa* (*Hippocrataceae*) with gastroprotective activity. *J. Ethnopharmacol.* 79: 383-8.
24. Ohguchi, K., ITO, M., Yokoyama, K., Inuma, M., Itoh, T., Nozawa, Y., Akao, Y. **(2009)**. Effects of Sesquiterpene Lactones on Melanogenesis in Mouse B16 Melanoma Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* 32: 308-310.
25. Oyagi, A., Ogawa, K., Kakino, M., Hara, H. **(2010)**. Protective effects of a gastrointestinal agent containing Korean red ginseng on gastric ulcer models in mice. *BMC Complementary & Alternative Medicine.* 10: 1186/1472-6882
26. Repetto M. and Llesuy S. **(2002)**. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 35: 523-534.
27. Reyes, B., Sánchez-Mendoza, M., Becerra, A., Cedillo, E., Castillo, C., Arrieta, J. **(2008)**. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer diterpenoid from *Croton reflexifolius*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *J. Pharm. Pharmacol.* 60: 931-6.
28. Rojas-Martínez, R., Arrieta, J., Cruz-Antonio, L., Arrieta-Baez, D., Velázquez-Méndez, A., Sánchez-Mendoza, M. **(2013)**. Dillapiole, isolated from *Peperomia pellucid*, shows gastroprotector activity against

ethanol-induced gastric lesions in wistar rats. *Molecules*. 18: 11327-11337

29. Rozza, A., Meira de Faria, F., Souza Brito, A., Pellizzon, C. **(2014)**. The Gastroprotective Effect of Menthol: Involvement of Anti-Apoptotic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities. *PLoS ONE*. 9: e86686.
30. Ruiz, E. y Suarez, M. **(2015)**. Sesquiterpene Lactones. Structural diversity and their biological activities. *CENIC*. 46: 2221-2450.
31. Sanchez, S. **(2014)**. Investigación de la adulteración y falsificación en capsulas de *Calea urticifolia* (juanislama), comercializadas en 7 mercados del área metropolitana de San Salvador. Universidad de el Salvador.
32. Sánchez-Mendoza, M., Cruz-Antonio, L., Arrieta-Baez, D., Olivares-Corichi, I., Rojas-Martínez, R., Martínez-Cabrera, D., Arrieta, J. **(2015)**. Gastroprotective activity of methyleugenol from *Pepromia hispidula* on ethanol-induced gastric lesions in rats. *International Journal of Pharmacology*. 7: 697-704.
33. Sánchez-Mendoza, M., Reyes, A., Cruz, L., Martínez, L., Rodríguez, J., Arrieta, J. **(2011)**. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer compound, tagitinin C from *Tithonia diversifolia*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Molecules*. 16: 665-74.

34. Sánchez-Mendoza, M., Reyes, B., Sánchez, P., Rodríguez J., Castillo C., Cervantes H., Arrieta, J. **(2010)**. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer chromene from *Eupatorium aschemborinianum*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Fitote*. 81: 66-71.
35. Secretaria de Salud. **(2010)**. Boletín Panorama epidemiológico de las úlceras, gastritis y duodenitis en México, periodo 2003-2008. 27 (18): 1-3.
36. Selhorst, A., Beserra, S., Calegari, P., Souza, M., Nunes, R., Silva, J., Matos, R., Olaitan, S., Tabajara de Oliveira, D. **(2011)**. Gastroprotective and Ulcer-Healing Mechanisms of Ellagic Acid in Experimental Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 6957-6965.
37. Sugano, K., Kontani, T., Katsuo, S., Takei, Y., Sakaki, N., Ashida, K., Mizokami, Y., Asaka, M., Matsui, S., Kanto, T., Soen, S., Takeuchi, T., Hiraishi, H., Hiramatsu, N. **(2012)**. Lansoprazole for secondary prevention of gastric or duodenal ulcers associated with long-term non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) therapy: results of a prospective, multicenter, double-blind, randomized, double-dummy, active-controlled trial. *Journal of Gastroenterology*. 47: 540–552.
38. Sumbul, S., Mohd, Af., Mohd, As., Mohd, Ak. **(2011)**. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. *Journal of Pharmacy Bioallied Sciences*. 3: 361–367.

39. Tashima, K., Korolkiewicz, R., Kubomi, M., Takeuchi, K. **(1998)**. Increased susceptibility of gastric mucosa to ulcerogenic stimulation in diabetic rats±role of capsaicin-sensitive sensory neurons. *British Journal of Pharmacology*. 124: 1395-1402.
40. Toma, W., Hiruma, C., Guerrero, R., Brito, A. **(2005)**. Preliminary studies of *Mammea americana* L. (*Guttiferae*) bark/latex extract point to an effective antiulcer effect on gastric ulcer models in mice. *Phytomedicine*. 12: 345–350.
41. Tsukimi, Y., Susumu, O. **(2001)**. Recent Advances in Gastrointestinal Pathophysiology: Role of Heat Shock Proteins in Mucosal Defense and Ulcer Healing. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 24: 1-9.
42. Tulassay, Z., Herszényi, L. **(2010)**. Gastric mucosal defense and cytoprotection. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol*. 24: 99-108.
43. Vera, C., Cruz, L., Arrieta, J., Cruz, G., Velázquez, M., Reyes, A., Sánchez, M. **(2012)**. Gastroprotection of Suaveolol, Isolated from *Hyptis suaveolens*, against Ethanol-Induced Gastric Lesions in Wistar Rats: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide and Sulfhydryls. *Molecules*. 17: 8917-8927.
44. Wu, W. y Cho, C. **(2004)**. The Pharmacological Actions of Nicotine on the Gastrointestinal Tract. *Journal of Pharmacological Sciences*. 94: 348-358

45. Yamada. M., Matsuura. N., Suzuki. H., Kurozaka. C., Hasegawa, N., Ubukata, M., Tanaka. T., Inuma, M. **(2004)**. Germacranolides from *Calea urticifolia*. *Phytochemistry*. 65: 3107-3111.