



UNIVERSIDAD “DR. JOSE MATIAS DELGADO”
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DR. LUIS EDMUNDO VASQUEZ
ESCUELA DE MEDICINA

Tesis

**PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

**Efecto citoprotector del extracto acuoso de hojas
de *Bixa orellana* (achiote) en úlceras gástricas
inducidas por indometacina en un modelo de
ratones**

AUTORES

Br. Julio Rodolfo Ancheta Henríquez

Br. María Guadalupe Guzmán Santamaría

ASESOR:

Lic. María Teresita Bertolí Avella

Patólogo:

Dr. José Nicolás Astacio Soria

2011

AGRADECIMIENTOS

“La fe, el esfuerzo y el optimismo dedicado a lo largo de los años de estudio, son el fruto de la gente que creyó en nosotros, apoyándonos en todo sentido, dándonos la mano a través de la educación. Es por ello que este trabajo está dedicado a las personas que a lo largo de nuestro estudio nos han dado formación de ser personas.”

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE	3
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
II. JUSTIFICACIÓN	8
III. OBJETIVOS	10
3.1 GENERAL	10
3.2 ESPECÍFICOS	10
IV. MARCO TEÓRICO	11
4.1 ENFERMEDAD ÁCIDO PÉPTICA	11
4.1.1 EPIDEMIOLOGÍA	11
4.1.2 ETIOLOGÍA	12
4.1.2.1 AINES	12
4.1.3 CLASIFICACIÓN	16
4.1.4 FISIOPATOLOGÍA	17
4.1.4.1 MECANISMOS DE PROTECCIÓN DE LA MUCOSA GÁSTRICA	19
4.1.4.2 EVOLUCIÓN NATURAL DE LA ENFERMEDAD ÚLCERO PÉPTICA	19
4.2 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD ÚLCERO PÉPTICA	20
4.2.1 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO	20
4.2.2 INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE LA COX- 2	23
4.2.2.1 DESVENTAJA DE LOS AINES SELECTIVOS DE LA COX2	23
4.2.3 COSTOS DE TRATAMIENTO	23
4.3 ANTECEDENTES DEL USO DE PLANTAS MEDICINALES	24
4.3.1 FLAVONOIDES	25
4.3.1.1 FLAVONOIDES PROPIEDADES Y ACCIONES ANTIOXIDANTES	25
4.3.1.2 TIPOS Y FUENTES DE FLAVONOIDES	26
4.3.2 <i>BIXA ORELLANA</i>	26
4.3.2.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	26
4.3.2.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA	27
4.3.2.3 TIPOS DE ACHIOTE	27
4.4 MODELO DE ÚLCERAS EN RATONES	28
4.4.1 ANATOMÍA GÁSTRICA DE RATONES	29
4.4.1.1 PH Y VOLUMEN GÁSTRICO DEL RATÓN	29
4.4.2 MODELOS	29
4.4.2.1 MODELO DE INDUCCIÓN POR INDOMETACINA	30
4.4.2.2 MODELO DE INDUCCIÓN POR ACIDO ACETIL SALICILICO	30
4.4.2.3 MODELO DE INDUCCIÓN POR IBUPROFENO	30
4.4.3 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LAS ÚLCERAS GÁSTRICAS EN RATONES	30
4.4.3.1 MEDICIÓN MACROSCÓPICA	30
4.4.3.2 MEDICIÓN MICROSCÓPICA	31
4.4.3.3 MÉTODOS BIOQUÍMICOS	32
V. HIPÓTESIS	35
5.1 HIPÓTESIS	35
VI. METODOLOGÍA	36
6.1 TIPO DE ESTUDIO	36

6.2 POBLACIÓN	36
6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	36
6.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	36
6.5 DIETA	37
6.6 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE ACHIOTE.....	37
6.7 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	37
6.7.1 FASE 1 ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO DE INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA EN RATONES.....	38
6.7.2 FASE 2 EXPERIMENTO	38
6.8 OPERATIVIZACIÓN DE VARIABLES.....	39
6.9 DEFINICIONES OPERACIONALES.....	41
6.9 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	41
6.9.1 ALEATEORIZACIÓN.....	41
6.9.2 AISLAMIENTO	41
6.9.4 INOCULACIÓN	41
6.9.5 LIGADURA PILÓRICA	42
6.9.6 DISLOCACIÓN CERVICAL.....	42
6.9.7 GASTRECTOMÍA	42
6.10 FASE EXPERIMENTAL.....	43
6.10.1 FASE 1: ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO DE INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA	43
6.10.2 FASE 2: EXPERIMENTO	43
6.10.3 MANEJO DE LA MUESTRA.....	43
6.10.4 ANÁLISIS MACROSCÓPICO	44
6.10.5 ANÁLISIS DIGITAL	44
6.10.6 ANÁLISIS BIOQUÍMICO	44
6.10.6.1 TBARS	44
6.10.7 ANÁLISIS MICROSCÓPICO.....	45
6.11 MÉTODOS DE RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE LA MUESTRA	45
6.11.1 PLAN DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	45
6.11.2 PLAN DE ALMACENAMIENTO DE DATOS.....	45
6.11.3 PRESENTACIÓN DE LA INFORMACIÓN.....	45
6.12 CONSIDERACIONES ÉTICAS	46
VII RESULTADOS.....	47
7.1 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA SIN LIGADURA	47
7.2 ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO DE INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA EN RATONES.....	48
7.2.1 RESULTADOS DE AINE1 VS AINES2.....	49
7.2.2 RELACIÓN ENTRE EL PH Y PRESENCIA DE SANGRE	50
7.3 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS	51
7.4 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS DIGITALES	51
7.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE BIXA ORELLANA.....	53
7.6 RESULTADOS DE HISTOPATOLOGÍA	53
7.7 MDA y pH	54
VIII Discusión	57
8.1 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA SIN LIGADURA	57
8.2 ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO DE INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA EN RATONES	57
8.3 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS.....	58
8.4 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS DIGITALES.....	58
8.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE BIXA ORELLANA	59

8.6 RESULTADOS DE HISTOPATOLOGÍA	59
8.7 MDA Y PH.....	59
IX CONCLUSIONES	61
X RECOMENDACIONES	62
IX BIBLIOGRAFÍA.....	63

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los AINES son uno de los grupos terapéuticos más utilizados gracias a su efecto anti-inflamatorio, anti-pirético y analgésico; son fácilmente accesibles sin prescripción médica, lo que conlleva un alto porcentaje de automedicación. A pesar de que es un grupo de medicamentos útiles (cuando son administrados a las dosis adecuadas y en los pacientes que lo necesiten) presentan un elevado número de efectos adversos, principalmente relacionados al daño de la mucosa gástrica.

Los AINES han aumentado la morbi-mortalidad en las poblaciones de todos los grupos etáreos, principalmente en las personas mayores de 60 años(1); comprobado por múltiples estudios que el uso de AINES, aumenta el riesgo de úlcera péptica(2) y de complicaciones gástricas, las cuales incluyen: dispepsia, úlcera gástrica, sangrado gastrointestinal, perforación, entre otros. Estas son la causa de 50,000 hospitalizaciones anuales, 1,000-2,500 muertes por año en España(3) y 16,500 muertes por año en Estados Unidos(4).

La enfermedad ácido péptica, se observa frecuentemente dentro de las patologías de mucosa gástrica. El constante flujo de ácido hacia el interior de la luz gástrica, además de los diferentes alimentos, agentes químicos, estrés, factores endógenos, entre otros ponen en riesgo las células de la mucosa a desarrollar úlcera gástrica. La úlcera gástrica es una enfermedad de interés mundial, estimándose que existen alrededor de 14.5 millones de personas en el mundo que padecen de dicha patología con una mortalidad de 4 millones anuales, secundario a complicaciones o mal manejo de esta.(5)

Por su etiología multifactorial se vuelve una patología muy frecuente, que a pesar de la bibliografía y estudios sobre el tema, presenta una amplia tasa de fracaso en su prevención y tratamiento. Por lo que la búsqueda de sustancias con nuevas actividades biológicas que aborden este problema, se encuentran siendo investigadas; como lo es el uso de sustancias naturales ricas en flavonoides para el tratamiento de la úlcera gástrica(6).

El empleo de plantas con finalidad terapéutica ha sido una práctica que el hombre continua hasta hoy(7)(8). Sin embargo el avance de la tecnología, los cambios culturales, determinó que

gran parte de estos conocimientos, se perdieran de forma irreversible. El uso de plantas medicinales con atribuciones antiulcerosas, es muy difundido, *Bixa orellana* (achiote) es una planta que ha sido utilizada con estas características.

Debido que existen pocas evidencias farmacológicas de parte de estudios científicos(7), surge la pregunta: ¿El extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* posee efectos órganoprotector y/o cicatrizante en úlceras gástricas inducidas por indometacina en un modelo de ratones albinos suizos?

II. JUSTIFICACIÓN

Al iniciar el manejo de un paciente con úlcera gástrica (inducida por AINES), se tiene como objetivo el alivio de los síntomas, que en general, se puede obtener con casi todas las alternativas farmacológicas disponibles, sin embargo, el manejo sintomático no es suficiente, y cuando se habla de tratamiento adecuado de la úlcera péptica, se encuentra implícito seleccionar un régimen terapéutico, que asegure la cicatrización y una prevención de recidivas.

Los antagonistas de receptores H₂, disminuyen el riesgo de úlcera duodenal, pero no el de úlcera gástrica, por lo que sumado a la taquifilaxia observada con su uso, no es recomendada para la profilaxis de úlceras asociadas con AINES(9). Los inhibidores de la bomba de protones (PPI por sus siglas en inglés), reducen el riesgo de complicaciones gastrointestinales, asociadas con el uso de AINES, siendo superiores a Ranitidina, mejorando así, los síntomas de dispepsia. El misoprostol, ha demostrado la reducción en el riesgo de úlceras gástricas secundario al uso de AINES(10). Sin embargo independientemente de la dosis, se encuentran efectos adversos secundarios como diarrea, flatulencia, distensión abdominal, que limitan su utilización(9).

Las plantas medicinales han sido estudiadas desde el punto de vista de su composición química, hallándose distintos metabolitos que poseen diferentes efectos dentro del cuerpo. Debido al gran número de problemas de salud en poblaciones de bajo recursos económicos, muchas veces estas son utilizadas en lugar de la medicina convencional para dar solución a las enfermedades comunes de la población.

Se conoce que para el año 2020, la población mundial será aproximadamente 7,500 millones de habitantes, de los cuales el 75%, vivirá en países en vías del desarrollo, que hoy consume menos del 15% del mercado farmacéutico, lo que hace suponer que esta masa poblacional, buscará cada vez más, plantas medicinales, como recurso terapéutico, para satisfacer sus necesidades de salud(11).

Una de las características de las sociedades de los países en desarrollo, es que los índices de salud son alarmantes, a esto se le suma la falta de políticas apropiadas y la falta de medicamentos económicos, accesibles a las mayorías (11).

Esta situación podría mejorar si los recursos naturales, como la biodiversidad, podrían ser aprovechados para la extracción de fármacos que puedan ser utilizados en la elaboración de medicamentos de bajo costo y accesibles a las poblaciones más vulnerables y con escasos recursos económicos .

Las plantas medicinales contribuyen al fortalecimiento de los programas de salud, así como también, a la economía del país; lo que nos proporciona una serie de desafíos y oportunidades para la realización de trabajo de investigación en base a la *Bixa orellana*, permitiéndonos dar a conocer su potencial, composición química, y actividad biológica, abriendo así, una brecha para el desarrollo de El Salvador.

La semilla es la parte de la planta más utilizada en El Salvador, es en la industria de colorantes o condimentos para la comida. A través del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) se ha reforzado el apoyo del proceso de agro-industrialización del achiote, en conjunto con la fundación EDYTRA, del polígono Don Bosco, aumentando el rendimiento agroindustrial con la re-adequación de la planta, y modernización del procesamiento del achiote. Actualmente en el país, existen 200 manzanas de Achiote, principalmente en los departamentos de La Paz, Morazán y Santa Ana(12).

III. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

- Determinar el efecto órgano protector y/o cicatrizante del extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* en úlceras gástricas inducidas por indometacina en ratones

3.2 ESPECÍFICOS

- Estandarización del modelo de inducción de úlceras gástricas por indometacina, en ratones.
- Estandarización de los métodos de análisis macroscópicos para medición de úlceras gástricas inducidas con indometacina en ratones
- Estandarización de todos los métodos de análisis bioquímicos de daño tisular inducido por indometacina en células gástricas de ratones.
- Determinar si el extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* posee actividad citoprotectora en úlceras gástricas inducidas por indometacina en ratones, mediante estudios macroscópicos, microscópicos y bioquímicos
- Determinar si el extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* posee actividad gastroprotectora en úlceras gástricas inducidas por indometacina en ratones, mediante estudios macroscópicos, microscópicos y bioquímicos

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 ENFERMEDAD ÁCIDO PÉPTICA

La úlcera péptica es una enfermedad de origen multifactorial que se caracteriza desde el punto de vista anatomopatológico por la lesión localizada y en general solitaria de la mucosa del estómago o del duodeno y que se extiende, como mínimo, hasta la muscularis mucosae.

Desde el punto de vista histopatológico, la úlcera gástrica es una lesión de la mucosa que alcanza por lo menos hasta la submucosa.

4.1.1 EPIDEMIOLOGÍA

Se ha demostrado en los Estados Unidos que 1 de cada 10 personas cursan con enfermedad ácido péptica y de cada 10 pacientes con dolor abdominal, uno es diagnosticado con enfermedad ácido péptica en cualquiera de sus presentaciones (13). En cuanto a la relación hombre-mujer se han encontrado datos tan similares que prácticamente esta relación es 1 a 1 sin preponderancia alguna relacionada con el tipo de enfermedad ácido péptica existente.

La información sobre prevalencia e incidencia de úlcera gástrica en El Salvador es escasa; en el Instituto Salvadoreño del Seguro Social (ISSS), las enfermedades gastrointestinales generales son la tercera causa de hospitalización para el 2010(14). Durante el 2010, en el primer nivel de atención del Ministerio de Salud (MINSAL), se brindaron cerca de 150,000 consultas relacionadas con la enfermedad ácido péptica (ver tabla 1); mientras tanto, en el segundo y tercer nivel de atención se realizaron 1,469 ingresos hospitalarios relacionados con gastritis y duodenitis, presentando una tasa de letalidad de 0.20, tasa de mortalidad 0.04 y 4,250 días de estancia hospitalaria secundario a los ingresos.

MORBILIDAD	MASCULINO	FEMENINO	TOTAL
Gastritis no especificada	26,075	79,480	105,555
Otras gastritis agudas	3,985	11,972	15,957
Úlcera péptica no especificada como aguda, ni crónica, sin hemorragia ni perforación	2,031	6,714	8,745
Gastritis crónica no especificada	2,195	6,220	8,415

Tabla 1: Morbilidad de consulta de 1º nivel de atención. Tomado de vigilancia epidemiológica de El Salvador (VIGEPES/2010)

Característicamente se ha podido distinguir una mayor presencia de úlceras duodenales en grupos de edad entre los 25 - 75 años y úlceras gástricas entre los 55 - 65 años aunque no son exclusivas de cada grupo de edad, sin embargo se ha relacionado la aparición de éstas con los nuevos estilos de vida poblacionales de los tiempos actuales(13).

En un estudio realizado durante el periodo de 1997-2003, en el área metropolitana de San Salvador, se encontró que el 14% padece de dispepsia no ulcerante, 15% úlceras pépticas duodenales y el 1% de gastritis activa crónica(15).

Se calcula que aproximadamente 3 millones de norteamericanos (1 % de la población) consumen diariamente AINES; 11 al 15% de las personas mayores de 65 años ingieren AINES, lo que corresponde al 50% del total de las prescripciones. En este grupo etáreo los AINES representan el 10% de los analgésicos prescritos y el 40% de los no prescritos(10). En Estados Unidos, se estima que 41,000 hospitalizaciones y 3,300 muertes son debidas al uso de AINES cada año.(2)

La prevalencia de úlcera en consumidores de AINES alcanza el 15 al 20%; 1 a 3 % presenta complicaciones mayores como hemorragia y perforación. El 40% de ellos presenta gastritis erosiva y 15% duodenitis erosiva. Se presume que la acción analgésica y antiinflamatoria de estos productos enmascara el desarrollo de esta lesión(10).

4.1.2 ETIOLOGÍA

4.1.2.1 AINES

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) se encuentran entre los fármacos más prescritos en el mundo. Debido a su doble efecto, tanto analgésico y anti-inflamatorio son utilizados en diferentes patologías tanto crónicas, como enfermedades comunes; esto los hace altamente demandados por parte de los pacientes y utilizados en ampliamente por los médicos(16).

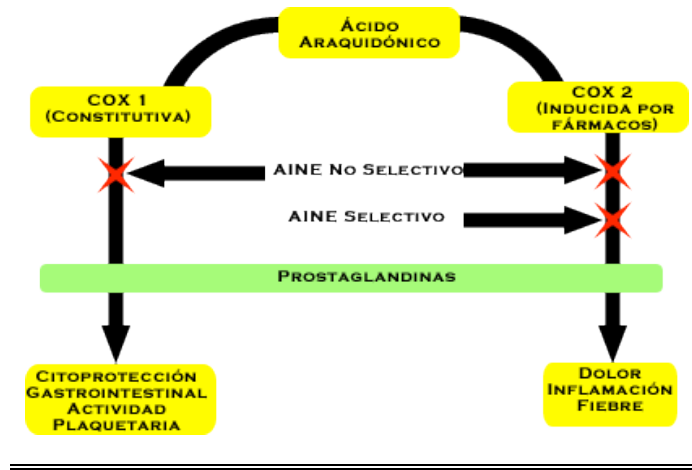


Figura 1: Efectos de AINES

Además de un potente efecto beneficioso para el usuario, no es de ignorar el aspecto negativo de parte de estos medicamentos, con el uso frecuente y sus efectos adversos, mayoritariamente debido a la denominada gastropatía inducida por AINES.

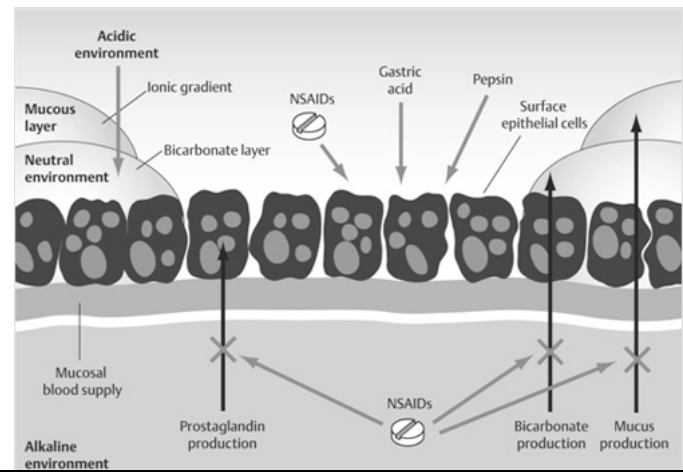


Figura 2: fisiopatología de úlcera gástrica inducida por AINES

Los AINES tradicionales inhiben las dos isoenzimas de la ciclo oxigenasa (COX) (ver figura 1) encargadas de actuar sobre el ácido araquidónico para su transformación en prostaglandinas y tromboxanos, los cuales a su vez están involucrados en los fenómenos de inflamación, dolor y agregación plaquetaria. La COX1 se expresa constitutivamente en muchos tejidos produciendo prostanoides, que están envueltos en la defensa y reparación de la mucosa gastrointestinal, agregación plaquetaria y la trombosis, además de algunas vías de la regulación del dolor del sistema nervioso central. La COX2 también se expresa constitutivamente en tejidos como el endotelio vascular, riñón y algunas zonas del sistema nervioso central, pero puede ser inducida en muchos tejidos y en los leucocitos en respuesta a un estímulo inflamatorio.

El principal beneficio de los AINES no selectivos de la COX deriva de su efecto antiinflamatorio y analgésico, pero su uso también posee efectos adversos gastrointestinales. Los inhibidores COX2 también llamados COXIBS tienen un perfil de seguridad gastrointestinal significativamente mejor, sin embargo datos recientes señalan, que su uso prolongado se puede asociar a un incremento del riesgo de sufrir eventos cardiovasculares de origen trombotico(17).

DAÑO A LA MUCOSA POR AINES	
Efecto local	Daño directo a la célula epitelial (inhibición de la glicólisis y alteración de la fosforilación oxidativa)
Efecto sistémico	Inhibición de la síntesis de la cicloxigenasa 2
	Inhibición de la síntesis de las prostaglandinas
	Disminución del mecanismo de citoprotección
	Activación de neutrófilos
	Mayor producción de la citoquina: TNF-alfa
	Liberación de endotelina

Tabla 2: Efecto dual de los AINES en el daño de la mucosa gástrica

El principal mecanismo causante de los efectos adversos del tracto gastrointestinal superior asociados a AINES, es la inhibición sistémica de la síntesis de prostaglandinas (ver tabla 2), que se encuentran involucradas en la reparación y defensa de la mucosa gastrointestinal (ver figura 2), aunque hay otros mecanismos asociados, el efecto de los AINES en la mucosa duodenal es alterar la barrera mucosa protectora frente al ácido gástrico.

Este ácido, junto a la acción corrosiva de la pepsina, exagera y potencia el daño mucoso gástrico, iniciado por el efecto de la inhibición de prostaglandinas. El ácido gástrico desempeña así, un papel fundamental en el daño gastroduodenal asociado a los AINES.

La elevación del pH intra-gástrico por encima de 4, es por tanto, clave en el tratamiento y prevención de los efectos adversos del tracto gastrointestinal superior, vinculados al uso de AINES.

La toxicidad gastrointestinal de los AINES puede categorizarse en 3 grupos diferenciados con repercusiones clínicas diferentes(18):

- 1) Lesión de la mucosa diagnosticada mediante endoscopia, aun siendo asintomáticas
- 2) Dispepsia, pirosis, náuseas, vómitos y dolor abdominal

3) Complicaciones serias que precisan hospitalización como hemorragias, perforación, sangrado

Los AINES, al reducir las prostaglandinas intestinales afectan todos los mecanismos protectores de la mucosa gástrica. Se ha considerado que la reducción del flujo sanguíneo es el principal mecanismo de lesión responsable de las lesiones gástricas, ya que inhiben la angiogénesis(19). La anti-angiogénesis se produce por la inhibición de una quinasa que es esencial en la angiogénesis inducida por la hipoxia. Es un mecanismo más a los ya conocidos de disminución del flujo sanguíneo y sub siguiente daño celular.

También la inhibición de las PG por la vía de la COX facilita la síntesis de los leucotrienos y tromboxanos por la vía de la lipogenasa, que son conocidos agentes vasoconstrictores a la mucosa y por tanto con efectos deletéreos sobre la barrera mucosa, que es uno de los factores defensivos más importantes.

Tras la administración de un AINE, aparecen pequeñas lesiones isquémicas y daño endotelial, observándose la formación de pequeños trombos blancos que detienen el flujo sanguíneo de la zona y favorecen el desarrollo posterior de lesiones hemorrágicas. No parece claro, que el mecanismo de producción de la isquemia de la mucosa tenga que ver con el incremento y la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular tras la toma de AINES; determinados autores en estudios experimentales con ratas, llegan a la conclusión, que la lesión isquémica es anterior a la infiltración de leucocitos, lo que parece es una consecuencia y no una causa(19).

La mayoría de los AINES son ácidos débiles, además, tienen capacidad de acumular protones a elevados valores de pH. Cuando un ácido débil es expuesto al jugo gástrico (pH= 2), recibe protones y es la forma protónica del fármaco la que suele atravesar las membranas lipídicas para entrar en las células epiteliales.

En el interior de la célula epitelial (pH= 7.4), los AINES se ionizan (liberan H⁺) que no pueden atravesar las membranas lipídicas quedando atrapados dentro de las células. Este proceso de atrapamiento intracelular de los AINES da lugar a concentraciones muy elevadas del mismo en el interior de las células epiteliales gástricas.

Las propiedades irritantes que existen al contacto directo con la mucosa, pueden estar relacionadas también con la pérdida de la capacidad hidrofóbica de la capa de gel de la mucosa, lo que permite una mayor difusión retrograda del ácido gástrico hacia la mucosa. La combinación de estos procesos después de la administración de AINES puede dar lugar a muerte celular epitelial rápida, hemorragia superficial y erosiones.

A nivel sistémico, se encuentra relacionado con la inhibición de la síntesis de la COX1, responsable de la síntesis de prostaglandinas gastrointestinales, disminuyendo así, la secreción de bicarbonato y del mucus, el flujo sanguíneo de la mucosa, y aumentando la retrodifusión de los hidrogeniones desde la luz gástrica hacia las células.

Se incrementa la secreción ácida y disminuye la restitución epitelial y la renovación después de la lesión. Las lesiones erosivas implican pérdidas de sustancias que abarcan toda la capa mucosa, sin sobrepasar la muscularis mucosae y no suelen ser mayores de 3-5 cm de diámetro.

Las úlceras vienen definidas, por la profundidad de la lesión, que llega hasta la submucosa e incluso hasta la muscular. Estas pueden ser mayores de 5 mm y se acompañan de fenómenos inflamatorios de tipo crónico.

4.1.3 CLASIFICACIÓN DE ÚLCERAS GÁSTRICAS

Las clasificaciones de la úlcera gástrica que se encuentran en la bibliografía son innumerables, más la clasificación de Johnson(20) (figura 3) es la que más se acerca a las explicaciones fisiopatológica de sus orígenes (tipo IV y V han sido recientemente agregadas, ver tabla 3).

CLASIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Tipo I:	Úlceras únicas en la curvatura menor
Tipo II:	Úlceras gástricas asociadas con úlceras duodenales
Tipo III:	Úlceras prepilóricas
Tipo IV:	Úlcera gástrica alta (cercana al fondo).
Tipo V:	Estómago con úlceras múltiples.

Tabla 3: Clasificación de úlceras gastroduodenales de Johnson

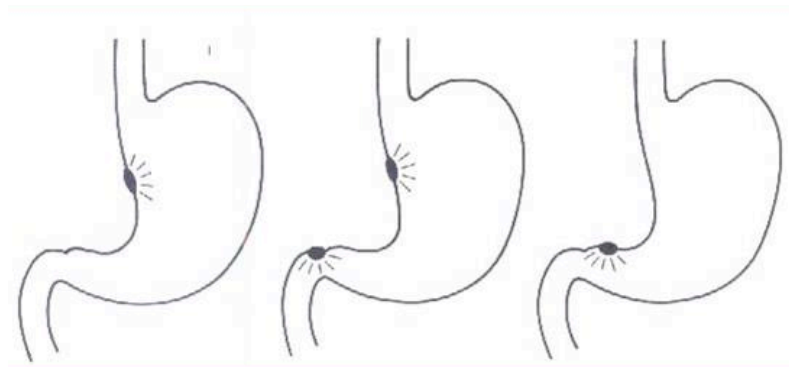


Figura 3: Clasificación de úlceras gastroduodenales de Johnson

4.1.4 FISIOPATOLOGÍA DE LA ÚLCERA GÁSTRICA

Clásicamente se define la enfermedad ácido péptica como un equilibrio de los factores protectores y de los factores lesivos (ver tabla 4), el cual al perderse, favorece al desarrollo de la enfermedad ácido péptica.

Los factores protectores son de índole pre-epitelial, epitelial y subepitelial.

FACTORES PRE EPITELIALES	FACTORES EPITELIALES	FACTORES SUB EPITELIALES
Capa de moco	Capa de fosfolípidos de la membrana celular	Angiogénesis
Bicarbonato	Rápido recambio celular	Microcirculación
		Prostaglandinas
		Factores de crecimiento

Tabla 4: Factores protectores gástricos.

Los factores promotores son aquellos que facilitan el desequilibrio de la balanza a favor de la enfermedad ácido péptica; entre éstos se encuentran:

- Los iones hidrógeno que se encuentran en el ácido clorhídrico (HCl)
- La pepsina
- El etanol, el cigarrillo
- Las alteraciones en la microcirculación que conducen hipoxia, la isquemia y los AINES
- Estrés severo (trauma, quemaduras)
- Reflujo biliar
- Radiación

Actualmente no se debe de dejar de lado la infección por *Helicobacter pylori* como desencadenante y perpetuante de la enfermedad. Aún más, se ha llegado a considerar la

presencia de infección por este patógeno como el *si ne qua non* de la enfermedad ácido péptica. Sin embargo, ninguno de estos factores se ha podido relacionar como uni causales.

Dentro de la fisiopatogenia de los factores lesivos, podemos mencionar tres puntos específicos:

1) **Producción de ácido:** en el estómago hay tres tipos de glándulas: oxínticas o células parietales, las pilóricas productoras de gastrina (células G) y las mucosas productoras del moco gástrico. Las células oxínticas ocupan el 80 % y las pilóricas el 20% restante. La producción de ácido depende de la célula parietal en respuesta a múltiples mecanismos inhibitorios y promotores; sin embargo, el más potente estímulo de secreción ácida gástrica proviene de las comidas, especialmente de las proteínas en ellas contenidas. Estas activan en forma inmediata, la bomba de protones ($K^+ - H^+$) ubicada en la célula parietal hacia la luz canalicular. Esta bomba intercambia iones de potasio desde la luz canalicular a expensas de transportar hidrogeniones hacia la luz canalicular donde estos últimos se unen al cloro formando el ácido clorhídrico. Este se constituye en el principal facilitador de la digestión y de la patogénesis de la enfermedad ácido péptica.

2) **Interacción celular:** la célula parietal se ve influenciada por múltiples factores que llevan a la producción de ácido o a inhibir este proceso. Los factores que promueven la formación de ácido son la histamina, la acetilcolina y la gastrina, cada una proviene del mastocito, célula colinérgica y de la célula pilórica, respectivamente. Las prostaglandinas y la somatostatina producidas igualmente en las células del píloro, inhiben la producción del ácido por la célula parietal. Las primeras, en forma directa sobre receptores parietales y la segunda, inhibiendo los mastocitos, impidiendo la secreción de histamina y actuando sobre receptores específicos de la célula parietal oxíntica. En última instancia todos estos procesos son controlados tanto por las neuronas adrenérgicas y las células colinérgicas.

3) **Infección por *Helicobacter pylori*:** hoy en día se ha comprobado claramente la relación causal entre el *H. pylori*, la enfermedad ácido péptica y el carcinoma gástrico. La infección por *H. pylori* asociada a otros cofactores, genera un amplio espectro de desenlaces como son: gastritis, úlcera duodenal, úlcera gástrica, maltoma y cáncer gástrico.

Tan clara se constituye esta relación, que se ha podido demostrar la prevalencia de positividad para infección por *H. pylori* en el 93% de gastritis y en el 90% de úlceras gástricas. Esta entidad como mecanismo fisiopatológico, a grandes rasgos, conduce a la perpetuación de cambios inflamatorios crónicos sobre el epitelio generando la enfermedad ácido péptica.

4.1.4.1 MECANISMOS DE PROTECCIÓN DE LA MUCOSA GÁSTRICA

Los factores protectores más importantes se alojan en las células de la mucosa gástrica que secretan moco, en sus 2 fases tanto solución como gel.

El moco constituye la barrera más eficaz de protección gástrica contra la acción del ácido (18). Igualmente importante es la producción del ion bicarbonato en la célula mucosa y su paso a la luz gástrica, donde entra en contacto con los hidrogeniones producidos por la célula parietal, formando agua e hidróxido de carbono impidiendo que éstos (el H⁺), al unirse con el cloro, formen mayor cantidad de ácido clorhídrico.

El flujo sanguíneo constituye un importante mecanismo protector del estímulo ácido, ya que transporta la sangre rica en oxígeno y las sustancias, como las prostaglandinas, que impiden la perpetuación de la secreción ácida. Igualmente, impiden la hipoxia local que podría favorecer el mal funcionamiento de mecanismos defensores locales como, por ejemplo, la renovación celular (18).

4.1.4.2 EVOLUCIÓN NATURAL DE LA ENFERMEDAD ULCERO PÉPTICA

La úlcera péptica es una enfermedad crónica con exacerbaciones y remisiones.

Existe gran tendencia a la recidiva sobretodo en localización duodenal. En la úlcera gástrica el número de pacientes que permanece libre de recidivas es algo mayor. Factores que favorecen la recidiva son la infección persistente por *H. pylori*, la ingesta de aspirina o AINES, el tabaquismo y las úlceras refractarias(21).

En los años siguientes al diagnóstico de una úlcera gástrica existe un riesgo relativo mayor de cáncer gástrico y hay un paralelismo epidemiológico entre las áreas geográficas con alta

incidencia de ambas patologías. Ello sugiere que ambas entidades comparten factores etiológicos comunes, probablemente la gastritis atrófica multifocal asociada a *H. pylori* y factores dietéticos no bien identificados.

4.2 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD ULCERO PÉPTICA

4.2.1 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

El tratamiento de esta patología se orienta a evitar los factores externos que pueden influir negativamente en la evolución de la enfermedad, en particular el tabaco, estrés y AINES; por lo tanto, el objetivo de los fármacos antiulcerosos es conseguir el alivio de los síntomas, la cicatrización de las úlceras y prevenir sus recidivas y complicaciones.

Desde el punto de vista farmacológico y atendiendo a su mecanismo de acción son diferenciables 4 grupos (22):

- Inhibidores de la acidez gástrica (anti ácidos)
- Inhibidores de la secreción gástrica (anti H₂, antimuscarínicos, antigastrinas, inhibidores de la bomba de protones y agonistas de la somatostatina)
- Con efecto antisecretor y protector de la mucosa gástrica (prostaglandinas, acexamato de zinc)
- Protectores de la mucosa (sucralfato, carbenoxolona y sales de bismuto)

En la actualidad el tratamiento de la úlcera péptica, se encuentra en un proceso radical de transformación. La terapia convencional más común consiste en el empleo de un inhibidor de la secreción ácida o de un protector de la mucosa. Generalmente, estos tratamientos tienen una duración media de 4 a 8 semanas, pero a pesar de esto, las recidivas son frecuentes (22). En este sentido es importante las propiedades de los distintos fármacos: citoprotección, es la habilidad de los fármacos, originalmente de las prostaglandinas, para prevenir injuria a la mucosa gástrica, producida por una variedad de agentes ulcerogénicos y necrotizantes (23). Esta propiedad se diferencia de la gastroprotección, debido a que esta solo reduce erosiones profundas, mientras que las células de la superficie no muestran mejoría; la gastroprotección en cambio, brinda protección de la mucosa gástrica, mientras que un organoprotector es un compuesto que protege un órgano de daño por erosión (23).

Principales características de los fármacos más frecuentemente empleados en el tratamiento de la enfermedad ulcerosa gástrica

DROGA		MECANISMO	EFFECTOS ADVERSOS
FÁRMACOS ANTISECRETORES			
Anti (A02BA)*	Cimetidina (A02B01)*	<i>Inhibición de la secreción ácida por bloqueo selectivo de los receptores H₂ de la histamina</i>	Cefalea, vértigos, rash cutáneo, náuseas, diarreas. Impotencia, ginecomastia, confusión mental (si altas dosis, insuficiencia renal o hepática). Interfiere con metabolismo hepático de algunas drogas.
	Ranitidina (A02BA02)*		Cefalea, vértigos, náuseas, diarrea, erupción cutánea
	Famotidina (A02BA03)*		Cefalea, vértigos, náuseas, diarrea, erupción cutánea (raro) constipación. No se evidencia Interferencia con Metabolismo hepático. Reducir dosis en insuficiencia de otras drogas renal moderada o grave.
Inhibidores de la H ⁺ K ⁺ ATPasa (A02BC)*	Omeprazol (A02BC01)*	<i>Inhibición de la "Bomba potasio/hidrogeniones", que constituye el elemento principal del mecanismo secretor de ácido en el estómago</i>	Diarrea, cefalea, náuseas, dolor, vértigos (raro). Potencial interferencia con el metabolismo de otras drogas (dicumarínicos, fenitoína, diacepam, ciclosporina). Pocas interferencias descritas
	Lanzoprazol (A02BC03)*		Diarrea, cefalea, náuseas, dolor abdominal. Potencial interferencia con metabolismo de otras drogas (fenitoína, diazepam). Efecto antiselector prolongado mayor que los Anti H ₂ pero menor que el Omeprazol. No hay necesidad de ajuste de dosis en insuficiencia Renal
	Pantoprazol (A02BC02)*		Diarrea, cefalea, náuseas Efecto antiselector prolongado mayor que los Anti H ₂ pero menor que el Omeprazol. No hay necesidad de ajuste de dosis en Insuficiencia Renal
Antagonistas muscarínicos	Pirenzapina (A02BX03)*	<i>Aumento del fluido sanguíneo a nivel gástrico y la secreción mucosa.</i> <i>Inhibe el receptor muscarínico M1, que media los efectos estimulantes de la acetilcolina sobre la secreción gástrica.</i>	Sequedad mucosa, alteraciones visuales, erupción cutánea (raro)
FÁRMACOS CITOPROTECTORES			
	Sales de bismuto (A07BB)*	Forma una capa protectora sobre una lesión. Posiblemente también por ser el bismuto inhibidor de la bacteria <i>Helicobacter pylori</i> .	Alteraciones de coloración y movimiento de la lengua y dientes. Precaución en pacientes con hemorragia digestiva alta. Evitar en insuficiencia renal
	Sucralfato (A02BX02)*	Forman un depósito sobre la zona ulcerada que actúa de barrera al ataque por el jugo	Constipación, náuseas, cefaleas, urticaria, dispepsia. Puede interferir con la absorción de algunas drogas (fenitoína y dicumarínicos). Evitar en insuficiencia renal

Efecto organoprotector y cicatrizante de extractos acuosos de hojas de *Bixa orellana* (achiote) en úlceras gástricas inducidas por indometacina en un modelo ratones

FÁRMACOS ANTI SECRETORES Y CITOPROTECTORES			
	Misoprostol (A02BB01)*	Acción citoprotectora (Aumento la resistencia de la mucosa a la lesión) a dosis bajas. Inhibidor de la secreción a dosis Altas. Sólo tiene acción antiulcerosa efectiva a dosis inhibitoras de la Secreción ácida.	Diarrea, náuseas, dispepsias, dolor abdominal, contraindicado en embarazo. Análogo sintético de la prostaglandina E1. Indicado en reducir las úlceras por AINES. La eficacia es equivalente a los antihistamínicos H ₂ en úlcera duodenal y es inferior en úlcera gástrica. El interés principal reside en la prevención de úlceras inducidas por antiinflamatorios no hormonales.
ANTIÁCIDOS (A02A)			
	Hidróxido de Aluminio (A02AB01)*	Neutralizan el ácido clorhídrico del estómago, disminución de la acidez, la inactivación de las sales biliares y de la pepsina.	Constipación, depleción de fósforo (tratamiento prolongado) Su principal inconveniente es su acción corta (debido al rápido vaciado gástrico y a la continua secreción ácida), requiriéndose una dosificación repetida a lo largo del día
	Hidróxido de Magnesio (A02AA04)*		Diarreas, hipermagnesemia en pacientes con insuficiencia renal, disminución de la absorción de otras drogas (tetraciclina, isoniazida, digoxina)

Tabla 5: Principales características de los fármacos más frecuentemente empleados en el tratamiento de la enfermedad ulcerosa gástrica. * Clasificación ATC 2012 http://www.whocc.no/atc_ddd_index/ (24).

Eficacia de la terapia farmacológica en la patología ulcerosa

FÁRMACOS	PORCENTAJE DE CURACIÓN EN 4 SEMANAS
Inhibidores de las bombas de protones Omeprazol Lazoprazol Pantoprazol	70 % - 80% úlcera gástrica 85% - 95% Úlcera duodenal
Antihistamínicos H₂ Cimetidina Ranitidina Famotidina Nizatidina Roxatidina	60-70% úlcera gástrica 70-80% úlcera duodenal
Protectores de la mucosa Sucralfato	60-70% úlcera gástrica 70-80% úlcera duodenal
Prostaglandinas Misoprostol	50-70% úlcera gástrica 60-80% úlcera duodenal
Sales de bismuto	60-70% úlcera gástrica 70-80% úlcera duodenal

Tabla 6: Eficacia de la terapia farmacológica en patología ulcerosa(22)

El tratamiento de las úlceras por AINES debe ajustarse dependiendo de si se pretende curar una úlcera ya establecida asociada a AINES o se intenta prevenir su aparición. Las estrategias terapéuticas son diferentes.

Antes de disponer clínicamente de AINE más seguros se prescribían fármacos que cuando se administraran junto con el AINE protegieran la mucosa frente a la ulceración. La mayoría de los pacientes que toman AINES de forma continua nunca van a presentar una lesión significativa con expresión clínica por lo que los candidatos ideales para la terapia conjunta son los que se consideran en el grupo de alto riesgo asociada a los AINES(19).

Están disponibles hace poco tiempo e inhiben la COX- 2 sin inhibir la COX- 1, por lo que son potencialmente más seguros para el tracto gastrointestinal. Los estudios endoscópicos en pacientes con inhibidores de la COX2 han demostrado incidencia endoscópica de ulceración gastroduodenal, aproximadamente en un 3-5%, cuando se comparan con los AINES tradicionales que tienen una incidencia de ulceraciones endoscópicas entre un 20 y 40 %. Algunos ensayos clínicos recientes han encontrado que los inhibidores de la COX2 se asocian a reducciones de los índices de complicaciones al compararlos con los AINES convencionales.

4.2.2.1 DESVENTAJA DE LOS AINES SELECTIVOS DE LA COX2

Se obtiene una toxicidad menor gastroduodenal pero viendo globalmente los acontecimientos adversos aumentan desde el punto de vista cardiovascular al reducir los beneficios antiagregantes con relación a los AINES tradicionales. En caso de la ulceración aguda los inhibidores específicos pueden retrasar la curación de la ulcera al igual que los AINES tradicionales.

4.2.3 COSTOS DE TRATAMIENTO

- En nuestro país no hay datos epidemiológicos que reflejen el costo del tratamiento de úlcera péptica. En los Estados Unidos el costo por paciente con ulcera péptica, varía entre \$263 a \$866 al año. El manejo hospitalario implica mayores costos, siendo el 62% del costo y los medicamentos el 35% (25), sin embargo estos costos no pueden ser pagados por la población de escasos recursos. Buscando otras soluciones, para las cuales hay muchas opciones de plantas medicinales, algunas con muchos estudios que comprueban su eficacia (26) y otras en las cuales no hay muchos datos que respalden su uso.

Las investigaciones demuestran que curar las úlceras toma menos tiempo y cuesta menos que una décima parte de la cantidad necesaria para dar tratamiento a una úlcera durante toda una vida(27):

- El tratamiento más extremo, la vagotomía o cirugía para corregir úlceras, cuesta aproximadamente \$17.000 y requiere de 307 días de tratamiento durante un período de 15 años.
- La terapia de mantenimiento con medicamentos para bloquear la producción de ácido estomacal cuesta aproximadamente \$11.000 y requiere de 187 días de tratamiento durante un período de 15 años. Este enfoque solamente da tratamiento a los síntomas, pero no cura la úlcera.
- La terapia con antibióticos toma 17 días y cuesta menos de \$1.000. En el 90 por ciento de los pacientes, la úlcera se cura completamente y no reaparece.

4.3 ANTECEDENTES DEL USO DE PLANTAS MEDICINALES

El empleo de plantas medicinales con fines curativos, es una práctica que se ha utilizado desde tiempos inmemorables, durante mucho tiempo, los remedios naturales y sobre todo las plantas medicinales, fueron los únicos que recursos que poseían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales, que poseen propiedades medicinales, y ampliar su experiencia en el empleo de los productos extraídos de las mismas.

La fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de plantas, nunca ha dejado de tener vigencia. Gran parte de la población recurre a tratamientos alternativos, ya que es un tratamiento de fácil obtención y bajo costo, sin embargo existen pocos trabajos experimentales, que corroboren la efectividad de estas plantas sobre las úlceras gástricas, y si este beneficio es comparable con los tratamientos médicos tradicionales(28).

Existen diferentes estudios, en los que se ha utilizado plantas, además de comprobar su efecto sobre la mucosa gástrica, como por ejemplo: *Indigofera guatemalensis* (añil)(29), mate, sangre de grado, *Aloe vera* (sábila), *Solanum tuberosum* (papa), *Bixa orellana*, entre otras plantas.

4.3.1 FLAVONOIDES

4.3.1.1 FLAVONOIDES PROPIEDADES Y ACCIONES ANTIOXIDANTES

Los flavonoides tienen una estructura química muy definida(30). De manera general son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (ó aromáticos) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, los autores los denominan simplemente como compuestos C₆C₃C₆.

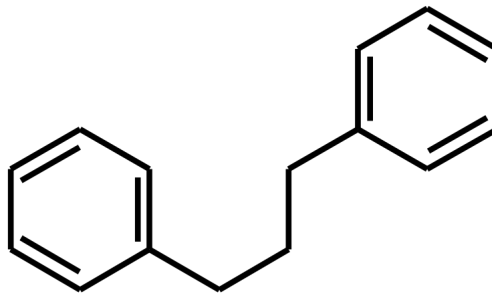


Figura 4: Estructura química base de los flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales, presentes en los vegetales, que brindan protección al organismo de daños producidos por agentes oxidantes, el organismo humano no produce estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben de obtenerse mediante la alimentación o por medio de suplementos. Se encuentran ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana.

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo-fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial, frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, aterosclerosis, el cáncer.

Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y super-óxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica, y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides, de prevenir la agregación plaquetaria y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación.

4.3.1.2 TIPOS Y FUENTES DE FLAVONOIDES

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y de soya, las cuales son consumidas en la dieta humana de forma natural.

Se ha identificado más de 5000 flavonoides, entre los que se pueden destacar: citroflavonoides, isoflavonoides, proantocianidinas y antocianidinas, ácido elálgico, catequina y caenferol. El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos tales como enzimas, transportadores de hormonas y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como hierro, cobre y zinc, catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en diferentes patologías, tales como: úlcera estomacal, duodenales e inflamaciones.

Tienen la ventaja de ser hidrosolubles y liposolubles, por eso en contrastes con otros antioxidantes, que no poseen esa doble cualidad, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, combaten la inflamación, alergias y aumentan la efectividad de las células natural killer (NK) del sistema inmunológico.

4.3.2 BIXA ORELLANA

4.3.2.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La *Bixa orellana* es una especie de planta arborescente de las regiones intertropicales de América. Pertenece a la familia *Bixaceae*, y también se le conoce con los nombres: *Bixa acuminata*, *B. americana*, *B. odorata*, *B. platycarpa*, *B. purpurea*, *B. tinctoria*, *B. upatensis*, *B. urucurana*, *Orellana americana*, *O. orellana*. Sus nombres comunes son: axiote, achiote, achiotec, achiotl, bijol, urucú, urucum, rocú, annatto, orellana, changerica entre otros.

B. orellana es un arbusto perenne, de 2 a 6 m de altura, copa baja y extendida; tallo pardo y ramificado a poca altura del terreno. Las hojas son simples, grandes, verdosas claras, de márgenes lisos. Las flores se disponen en ramilletes, blanquecinas a rosadas según las variedades. El fruto es una cápsula roja de 2 a 6 cm de largo, con pelos gruesos espinosos, puede ser verdoso oscuro a morado (según las variedades), que al madurar pasa a pardo rojizo oscuro. En cada fruto se encuentra un número variable de semillas (10-50, en relación con el tamaño capsular). La semilla

es comprimida, de 5 mm de largo, con tegumento recubierto de una sustancia viscosa de color rojizo intenso. Las partes utilizadas usualmente en la industria son las hojas y semillas de *Bixa orellana*.

4.3.2.2 TIPOS DE ACHIOTE

- a) Por el color de las flores y cápsulas: hay árboles que producen flores blancas con cápsulas verdes y árboles con flores rosadas y cápsulas en diferentes tonos rojizos.
- b) Por la forma de las cápsulas: los árboles pueden diferenciarse unos de otros por la forma de las cápsulas, siendo éstas redondas, acorazonadas, oblongas, lancetadas, con mucho, pocos o ningún apéndice o setas.
- c) Por el color del pigmento: esta es una característica que puede diferenciarse en los árboles y se presenta de color rojo o anaranjado.
- d) Por la época de floración y cosecha: generalmente la floración y la cosecha de la mayoría de variedades ocurren en julio y diciembre. Hay otras variedades en las cuales ocurre en octubre y abril.
- e) Por su tolerancia al mildiú: debido a su tolerancia natural a la enfermedad del mildiú polvoriento, causado por el hongo *Oidium bixae* Viegas, las variedades de achiote pueden clasificarse en susceptibles o tolerantes.
- f) Por su contenido de bixina.
- g) Por el color del tallo: Rojo, café y amarillo

4.3.2.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA

En las hojas encontramos: Bixaganeno, ishwarano (aceite esencial) entre otros mono y sesquiterpenos; flavonoides: 7-bisulfato de apigenina, 7- bisulfato de luteolina, 8-bisulfato de hipolaetina, glucósido de apigenina, bisulfato de apigenina, hipoaletina, cosmosiina, entre otros como: flavonas, antocianidinas y sesquiterpenlactonas; carotenoides: bixina, norbixina, orelina, β -caroteno, criptoxantina, metilbixina, zeaxantina, luteína; ácido tomentósico; vitaminas (A, B, y C); proteínas; azúcares; celulosa; grasas; calcio, fierro y fósforo; diterpenos: farnesilacetona, geraniol, geranil formato, alcaloides (vestigios), ácido gálico (benzenoide) y ácido alfitólico(31).

En las semillas encontramos: carotenoides expresados como provitamina A (1 000 -2 000 U.I./g de semilla seca), entre ellos destacan: bixina, betabixina, metilbixina, norbixina, orelina,

zeaxantina, β -caroteno, luteína y criptoxantina; también contienen bixinato de sodio, achiotina, ácido tomentósico, pectinas, proteínas, taninos, y un hidrocarburo sesquiterpénico, ishwarane (esencia floral de las semillas). Las semillas también contienen sílica, potasa, un alto contenido de fósforo y bajo de calcio; un alto contenido de proteínas, el cual incluye niveles adecuados de triptófano y lisina, pero bajos niveles de metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina y treonina (31).

4.3.2.4 USOS TERAPEÚTICOS DEL ACHIOTE

El uso terapéutico que se le atribuye a la planta del achiote es muy variado por su alto contenido de vitamina A, D y flavonoides, estos últimos con un alto potencial de beneficio humano; entre sus propiedades farmacológicas se destacan la gastro protectora, actuando como antisecretor, cito protector y agente antioxidante. Además los flavonoides actúan en el proceso de regeneración de las úlceras gástricas, encontrándose principalmente en las hojas de achiote(6).

El uso terapéutico es variado dependiendo de la porción a utilizar de la planta. La información recopilada por diferentes publicaciones, menciona que la semilla es utilizada para el tratamiento de bronquitis, hemorroides, quemaduras, antidiarreico, antiherpético, antidiabético y expectorante(7), además, las hojas son utilizadas para el tratamiento de hepatopatías y como gastro protector.

La maceración es una forma clásica y popular de obtener sustancias activas a partir de plantas, realizándose a temperatura ambiente, utilizando agua como solvente.

4.4 MODELO DE ÚLCERAS EN RATONES

Las características fisiológicas de la secreción gástrica para humanos, como para ratones, son similares, presentando inclusive, secreción de ácido y pepsina, con una distribución de los valores para pepsinógeno sérico en ambos son similares(32); es de hacer notar que de la misma forma que sucede en humanos, la formación úlceras, se encuentra determinada por factores propios del individuo.(33)

4.4.1 ANATOMÍA GÁSTRICA DE RATONES

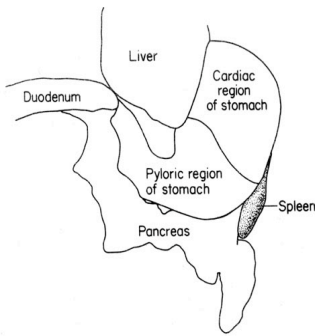


Imagen 5: Anatomía gástrica del ratón

El tracto intestinal puede medir de la siguiente manera: esófago 4 cm; duodeno, yeyuno e íleon 34 cm; colon y recto 14 cm.(34)

El estómago se divide en dos grandes regiones, cardíaca, que es la que se encuentra relacionada al esófago, y la región pilórica está relacionada con el duodeno, ambas claramente diferenciables, por una línea blanquecina que las divide, y cambios macroscópicos visibles en la mucosa de ambas porciones.

4.4.1.1 PH Y VOLUMEN GÁSTRICO DEL RATÓN

El pH gástrico en ratones, en ayuno es de 2.98 (SD= 0.3) y en ayuno es de 4.04 (SD= 0.2)(35). La capacidad de volumen del estómago del ratón, es importante para determinar el parámetro de las dosis orales, para un ratón de 20g el volumen normal de es de 0.4 mL (35). El pH gástrico de los humanos oscila entre 1.2 a 1.8 en ayuno (36).

4.4.2 MODELOS

La utilización de modelos animales en la inducción de úlceras gástricas, ha permitido ampliar los conocimientos en la complejidad y multifactorialidad de las úlceras gástricas. Se han desarrollado diferentes modelos, lo cuales se enfocan al daño agudo en la mucosa gástrica; para este objetivos se utilizan sustancias necrotizantes como el etanol, ácidos o bases fuertes, AINES, isquemia o estímulos estresantes (33).

El efecto de las sustancias necrotizantes es anivel de la mucosa gástrica, provocando ruptura y desprendimiento del epitelio, además de, congestion vascular. Por esta razón las sustancias en dichos modelos son administradas por via orogastrica, por medio de una cánula.

Los AINES más utilizados en la inducción de úlceras gástricas, son aspirina e indometacina, ambos causan daño a nivel local, sin embargo la indometacina puede provocar úlceras gástricas por mecanismos sistémicos, por medio de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, perjudicando la microcirculación a nivel de la mucosa gástrica, promoviendo así, la adición de neutrófilos a la células endoteliales (33).

4.4.2.1 MODELO DE INDUCCIÓN POR INDOMETACINA

Gracias a un mayor potencial ulcerógeno, la indometacina ha sido el primer AINES utilizado en dichos modelos, donde previamente se someten los animales de experimentación a 12 horas de ayuno sólido y 12 horas de ayuno líquido, para administrar por medio de cánula orogástrica una solución de indometacina en bicarbonato sodio, a dosis de 20-40mg/Kg de peso. 6 horas después, los animales son sacrificados, para posteriormente realizar la extracción de la muestra gástrica(37).

4.4.2.2 MODELO DE INDUCCIÓN POR ACIDO ACETIL SALICILICO

El ácido acetil salicílico es suspendido en carboximetil celulosa al 1% y ácido clorhídrico (HCl), obteniendo una concentración final de 12 mg/mL. Al animal de experimentación, se le administra una dosis de 120 mg/Kg de peso, sin exceder el volumen de 10 mL/Kg (38).

4.4.2.3 MODELO DE INDUCCIÓN POR IBUPROFENO

Se utiliza ibuprofeno a dosis de 50 mg/Kg, via oral, cada 12 horas previo ayuno de 24 horas de sólidos y líquidos (39). La literatura también describe su uso a dosis de 80 mg/Kg, diluido en agua, luego de ayuno de 24 horas (40).

4.4.3 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LAS ÚLCERAS GÁSTRICAS EN RATONES

4.4.3.1 MEDICIÓN MACROSCÓPICA

Existen varios métodos para cuantificar el tamaño de las úlceras, entre estos tenemos: los cuantitativos no sistemáticos, como son la suma de longitudes de las lesiones, o el índice de úlcera, donde se multiplica el largo por el ancho, obteniendo así el área de la misma. El problema de estos métodos, es que secundario a la forma irregular a que se presentan las úlceras, se pierden ciertas áreas con el cálculo realizado.(41)

También existen los métodos sistemáticos, en el cual las muestras son colocadas en una lámina cuadrículada, midiendo así su tamaño, ya sea a simple vista, con un microscopio o estereoscópio, las desventajas de estos métodos, son que si bien se obtienen, una mejor cuantificación del área, toman mucho tiempo, y en el caso del que emplea un estereoscópio, este queda fuera del alcance de los laboratorios pequeños.(41)

Otro método propuesto por Kahn H(41), este se basa en el empleo del programa de manejo de imágenes Scion Image Software(42). Evalúa la intensidad y densidad del área hemorrágica de una imagen scanada del estómago de ratones con úlceras inducidas por etanol e indometacina, el software asigna, una cantidad determinada de pixeles por distancia lineal (PxI x mm) determinando el tamaño del área afectada. La ventaja de este método, es que presenta un bajo costo y una alta eficacia para determinar el área afectada, no importando lo pequeñas que sean las lesiones.

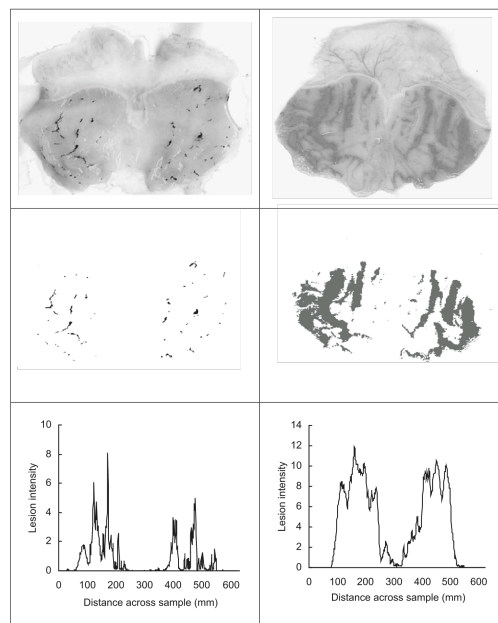


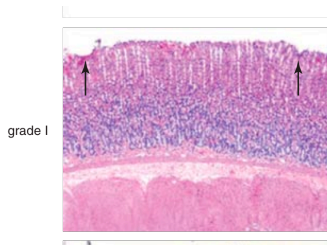
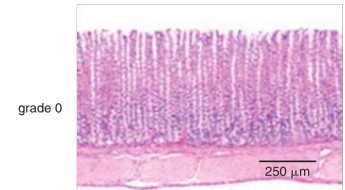
Figura 6: imágenes escaneadas de estómago de ratón con inducción de úlceras con indometacina (A) y etanol (B). (41)

4.4.3.2 MEDICIÓN MICROSCÓPICA

Se basa en la preparación de cortes histológicos, y su posterior análisis por un patólogo. La mayor desventaja de este método, es que da espacio a la subjetividad del evaluador. Esta forma de medición puede evitar en gran medida el sesgo, utilizando una escala que le otorgue un puntaje a cada una de las características encontradas dentro de las úlceras gástricas; una escala de medición en ratas ha sido propuesta por Morini G y Grandi D.

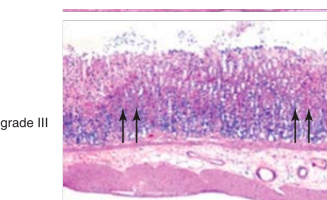
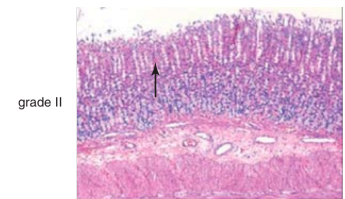
Para evaluar la severidad del daño a la mucosa, tomando de base la profundidad de la lesión se hará de acuerdo a la siguiente escala(43):

- Grado 0: Todas las células de la mucosa gástrica se encuentran intactas.



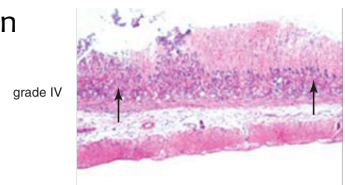
- Grado 1: Las células de la mucosa que se encuentran en la superficie luminal se encuentran dañadas y parcialmente exfoliadas, las células de las criptas se encuentran intactas.

- Grado 2: Células de la superficie luminal, se encuentran extensamente dañadas, aunado el daño de las células de las criptas, mientras las células glandulares se encuentran intactas.



- Grado 3: Aunado al daño de las células superficiales y las criptas, se evidencia el daño en el área parietal de las células glandulares gástricas, numerosas células exfoliadas y necrosis completa de la capa celular superficial.

- Grado 4: Daño grado 3 severo que se extiende a la porción inferior de las glándulas y edema de submucosa.



4.4.3.3 MEDICIÓN BIOQUÍMICA

Los posibles marcadores bioquímicos susceptibles a medición:

- **Prostaglandinas E₂**: producida por COX-1 y COX-2, a través de ciertos estudios, se ha comprobado que promueve la mejoría de úlceras gástricas causadas por indometacina, al estimular angiogenesis, por regulación de la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Debido a que se ha comprobado por varios estudios que este estimula proliferación celular, es posible que la TGE₂ endógena al estimular la VEGF no solo aumente la angiogenesis, si no, también estimule la proliferación/migración de células epiteliales, acelerando la cura de la lesión gástrica (44).

- **Caspasa:** es indicador de apoptosis celular, proteasa encargada de inducir la vía de la apoptosis, que una vez activada causa destrucción de proteínas nucleares y citoesquelética. Se postula que esta vía se activa después de la liberación de citocromo C de la mitocondria, con efecto sobre el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Según estudios en úlceras inducidas por indometacina, existe un aumento de la expresión de esta enzima. Posee un efecto gastro protector inhibiendo la apoptosis a nivel del epitelio gástrico (45).
- **Metaloproteinasa:** es una familia de enzimas, cuya función principal es la degradación de los componentes de la matriz extracelular. Se han descrito modelos de úlceras gástricas provocadas por ácido acético, que existe una mayor expresión de metaloproteinasas a nivel de la base ulcerosa, que a nivel de la mucosa normal. La colagenasa y la gelatinasa B poseen mayor actividad durante las primeras 24 horas posterior a la producción de la úlcera, siendo su principal actividad la degradación de la matriz extracelular necrótica. Estas se ven activadas a través de las citoquinas pro inflamatorias. Cuando su actividad se ve disminuida a las 24 horas, se da inicio a la fase de curación de la úlcera (46).
- **Medición del estrés oxidativo:** en el pensamiento medico actual, se encuentra ampliamente establecido que en momentos de daño tisular en organismos aerobios, se generan especies reactivas de oxígeno, los cuales puede provenir de una deficiencia en los mecanismos de eliminación de estas sustancias, o un aumento en su producción. Acumulación de estas especies reactivas de oxígeno puede posteriormente causar peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, ruptura del ADN y degradación proteica. La medición del estrés oxidativo puede ser de dos formas: método directo, midiendo las sustancias oxidantes del cuerpo; este método posee la desventaja que las especies reactivas de oxígeno en el cuerpo poseen una vida muy corta. El radical hidroxilo posee una vida media de 10 (-10) segundos. Método indirecto: consiste en la determinación de productos terminales de la acción oxidante. Estos productos derivan de la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las proteínas, ADN y lípidos. Las ROS inducen en las proteínas la acumulación de grupos carbonilos que pueden ser evaluados después de la condensación con 2-4 dinitrofenilhidrazina. Este método es prolongado e involucra una gran cantidad de solventes. La medición de la lipoperoxidación, constituye el valor standar cuando se trata de la medición de la acción de los

ROS en el tejido, existiendo varias formas de medirlo. El más conocido se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico, producto de la degradación de la oxidación de los fosfolípidos, con el malondialdehído (MDA), formando así, un color susceptible a ser medido por métodos fluorométricos o cromatográficos. También pueden medirse otros aldehídos, procedentes de la lipoperoxidación, pero su mayor desventaja radica en la necesidad de equipo especializado (47).

V. HIPÓTESIS

5.1 HIPÓTESIS

- Los extractos acuosos de las hojas de *Bixa orellana* tienen efecto citoprotector en las úlceras gástricas inducidas por indometacina en ratones
- El extracto acuoso de *Bixa orellana* poseerá efecto gastroprotector en las úlceras gástricas inducidas por indometacina en ratones
- El extracto acuoso de *Bixa orellana* posee efecto organoprotector en las úlceras gástricas inducidas por indometacina en ratones

VI. METODOLOGÍA

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Experimental

6.2 POBLACIÓN

Ratones heterocigotos derivados de la línea de ratones albinos suizos adultos, de sexo femenino, criados en las instalaciones del laboratorio de la Universidad Dr. José Matías Delgado, en un ambiente de 12 horas de luz, con 12 horas de oscuridad, con temperatura ambiente controlada de 27 °C; alimentados con comida para perros marca KNINO y agua *ad libitum*.

Durante la crianza de los ratones se dividieron en cajas por sexo, separando ratones machos de ratones hembra al momento de ser destetado por la madre, para disminuir el riesgo que se encuentren gestando al momento del experimento.

6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Ratones albinos suizos mayores de 6 semanas de vida
- Ratones albinos suizos del sexo femenino
- Ratones con 24 horas de ayuno
- Ratones con peso que se encuentre entre 28 – 30 g

6.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Ratones sexo masculino
- Ratones con malformaciones evidentes
- Ratones que se encuentren gestando al momento de la fase experimental
- Ratones que mueran en cualquier etapa del experimento antes de ser sacrificados por dislocación cervical

6.5 DIETA

Componente	Dieta	
	KNINO	AIN-93m
Proteína mínima	18%	17%
Grasa mínima	7%	7%
Fibra mínima	6%	5%

Tabla 7: contenido de la dieta brindada a los ratones

Para cumplir con los requerimientos estándar en la alimentación de los roedores de laboratorio, según la formulación AIN-93m, la cual es una de las más utilizadas en los experimentos de laboratorios, debido a su contenido de proteínas y grasa, que permite el adecuado crecimiento y mantenimiento del ratón adulto, así como la etapa de embarazo y lactancia, por lo cual, se

eligió el alimento de marca KNINO, de la empresa nacional TECNUTRAL, debido a su composición es compatible con la dieta antes mencionada(48).

6.6 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE ACHIOTE

Las hojas de *B. orellana*, fueron proporcionadas por parte del polígono industrial Don Bosco, posteriormente se limpiaron y se transportaron al laboratorio. El procesamiento del macerado de achiote fue ideado por el grupo investigador.

Se seleccionaron las hojas, las cuales fueron maceradas en un molino de mano. Estas se colocaron en agua en una relación de 1 g / 10 mL de agua. Dejando reposar por 24 horas en un recipiente de vidrio, cubierto por papel aluminio, colocándolo posteriormente en un lugar oscuro a temperatura ambiente.

6.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

Previo al experimento se transfirieron a jaulas anticoprofágicas 24 horas antes del experimento, para colocarlos en condiciones de ayuno de sólidos por 24 horas, y 12 horas sin ingesta de agua.

Al momento del experimento los ratones se distribuyeron aleatoriamente, , para integrarlos a cada uno de los grupos.

6.7.1 FASE 1 ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO DE INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA EN RATONES

GRUPO	N	DESCRIPCIÓN	INTERVENCIÓN
AINES 1	10	Grupo de inducción de úlceras gástricas con indometacina	<ul style="list-style-type: none"> • 24 horas de ayuno • 12 horas de ayuno de agua • Indometacina 40 mg/kg diluido en Bicarbonato de sodio al 4% por 6 horas • Ligadura pilórica
AINES 2	10	Grupo de inducción de úlceras gástricas con indometacina	<ul style="list-style-type: none"> • 24 horas de ayuno • 12 horas de ayuno de agua • Indometacina 68 mg/kg diluido en Bicarbonato de sodio al 4% por 6 horas • Ligadura pilórica
SHAM	10	Grupo control de ligadura pilórica	<ul style="list-style-type: none"> • 24 horas de ayuno • 12 horas de ayuno de agua • Ligadura pilórica
Sano	10	Grupo control	<ul style="list-style-type: none"> • 24 horas de ayuno • 12 horas de ayuno de agua • Inoculación de Bicarbonato de sodio al 4%, por cánula orogástrica a 0.2cc • Ligadura pilórica

Tabla 8: Fase 1 Estandarización

Seis horas después de aplicarse el AINE o la el Bicarbonato todos los ratones se sometieron a Eutanacia y recolección de muestras.

6.7.2 FASE 2 EXPERIMENTO

GRUPO	N	DESCRIPCIÓN	INTERVENCIÓN
AINES	10	Inducción de úlcera gástrica con indometacina	<ul style="list-style-type: none"> • 24 horas de ayuno • 12 horas de ayuno de agua • Indometacina 68 mg/kg por 6 horas • Ligadura pilórica
PPI	10	Inducción de úlcera gástrica con indometacina + omeprazol vo	<ul style="list-style-type: none"> • 24 horas de ayuno • 12 horas de ayuno de agua • Indometacina 68 mg/kg por 6 horas

Efecto organoprotector y cicatrizante de extractos acuosos de hojas de *Bixa orellana* (achiote) en úlceras gástricas inducidas por indometacina en un modelo ratones

			<ul style="list-style-type: none"> • Omeprazol 30 mg/kg • Ligadura pilórica
Achiote	10	Inducción de úlcera gástrica con indometacina + extracto acuoso de achiote	<ul style="list-style-type: none"> • 24 horas de ayuno • 12 horas de ayuno de agua • Indometacina 68 mg/kg por 6 horas • Extracto acuoso de achiote • Ligadura pilórica

Tabla 9: Fase 2 Experimento

Seis horas después de aplicarse el AINE o la el Bicarbonato todos los ratones se sometieron a eutanasia y recolección de muestras.

6.8 OPERATIVIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	MEDICIÓN	INDICADORES
Edad	Número de semanas transcurridas desde el nacimiento hasta la fecha de estimación, siendo una semana 7 días transcurridos	Semanas	Número de semanas
Área total de las lesiones	Es la sumatoria de la extensión o superficie de todas las lesiones producidas.	Milímetros cuadrados	Cantidad total de milímetros cuadrados. Analizadas por Scion Image
Área media de lesiones	Valor que se obtiene dividiendo la suma de las áreas de lesión entre el número de lesiones	Milímetros cuadrados	Media aritmética del área de lesión
Desviación estándar de las lesiones	Valor que se obtiene con la raíz cuadrada de la varianza	Milímetros cuadrados	Media de distancias que tienen los datos respecto a su media aritmética
Índice de lesiones	Valor que se obtiene dividiendo el área total de lesiones entre el área media de lesiones	Sin unidades	Valor numérico
Máximo	Valor máximo obtenido en las pruebas	Milímetros cuadrados	Valor máximo de milímetros cuadrados
Mínimo	Valor mínimo obtenido en las pruebas	Milímetros cuadrados	Valor mínimo de milímetros cuadrados
Intensidad de la lesión	Grados de la lesión histopatológica	Grados (I-IV)	Escala patológica de Morini y Grandi
Dosis	Cantidad de fármaco u otras sustancias que se administren en una	mg/Kg	Volumen

Efecto organoprotector y cicatrizante de extractos acuosos de hojas de *Bixa orellana* (achiote) en úlceras gástricas inducidas por indometacina en un modelo ratones

	vez		
Concentración de Achiote	Volumen administrado de Bixa Orellana por cánula a animales en experimentación	Mililitros	Volumen
Concentración de sustancia control	Cantidad administrada de omeprazol (30 mg/Kg) por cánula administrada a animales de experimentación	Mililitros	Volumen
Organoprotector	Compuesto que protege un órgano de daño por erosión	Milímetros	Actividad citoprotectora y gastro protectora simultáneamente del extracto
Gastroprotector	Compuesto que protege la mucosa estomacal	Lesiones poco extensas pero puede haber daño en las capas profundas	pH, variables de análisis macroscópico y microscópico
Citoprotector	<ul style="list-style-type: none"> • Compuesto que proteja las células por debajo del epitelio de la mucosa gástrica • Disminución de lesiones profundas 		<ul style="list-style-type: none"> • Concentración de ácido tiobarbitúrico • pH, variables de análisis macroscópico y microscópico
Porcentaje de protección	$100\% - ((\text{var grup experimental}/\text{var en grupo 1}) \times 100)$	%	Diferencia de porcentajes entre el grupo control positivo de lesión y el grupo experimental
MDA	Medición de la concentración de ácido malondialdehído en tejido gástrico por medio de kit TBARS, a través de espectrofotómetro	nm/mL de MDA	
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones Hidrógeno	Valores de 1-14	Medición por medio de tiras y papel pH

Tabla 10: Operativización de Variables

6.9 DEFINICIONES OPERACIONALES

	DEFINICIÓN
Antiulceroso	Medicamento que protege la mucosa gástrica de erosión por medio del control de secreción de iones hidrógenos
Cito protector	Compuesto que protege las células por debajo de la mucosa gástrica
Órgano protector	Compuesto que protege un órgano de daño
Gastro protector	Compuesto que protege la mucosa estomacal

Tabla 11: Definiciones operacionales

6.9 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Dentro de cada una de las fases, se encuentran procedimientos comunes, los cuales son detallados a continuación:

6.9.1 ALEATEORIZACIÓN

Se extrajeron al azar los ratones; previo a colocarlos en sus respectivas jaulas anticoprofágicas, se extraerá una bolita numerada de una tómbola de bingo, siendo repartidos dependiendo del número obtenido, de la siguiente forma:

- **Grupo 1:** bolitas numeradas del 1 al 10
- **Grupo 2:** bolitas numeradas del 11 al 20
- **Grupo 3:** bolitas numeradas del 21 al 30
- **Grupo 4:** bolitas numeradas del 31 al 40

6.9.2 AISLAMIENTO

Dependiendo el grupo al que han sido asignado, se colocaron en jaulas anticoprofágicas identificadas respectivamente con el nombre del grupo experimental de cada una de las fases.

6.9.3 AYUNO El ayuno se realizó durante 24 horas; las primeras 12 horas se les retirará el alimento sólido, permitiéndoles la ingesta de agua; al cumplir esta primera etapa, se les retiró el agua, para que cumplier 24 horas de ayuno sólido y 12 horas de líquido.

6.9.4 INOCULACIÓN

Posterior a inmovilizar al ratón, se administró vía orogástrica con cánula rígida de punta roma, la sustancia respectiva al animal, dependiendo al grupo que pertenece. De la misma forma que se realizó la inducción de la úlcera gástrica con indometacina.

6.9.5 LIGADURA PILÓRICA

Este procedimiento consta de los siguientes pasos:

- Preparación de la región operatoria: a cada ratón se le rasuro el abdomen
- Anestesia: Se administro vía intra peritoneal Ketamina 50mg/ml a dosis de 20mg/kg/dosis #1
- Laparotomía:
 - Se le realizo incisión a nivel de la línea media cuidando la hemostasia de los tejidos
 - Se identifico el píloro, para luego ligarlo son seda 3-0
 - Se procedió a cerrar capa muscular con seda 3-0, realizando puntos continuos
 - Se cierra piel con seda 3-0, realizando puntos simples
 - Se coloca apósito de gasa y se fijará con venda de gasa
 - El período de recuperación post quirúrgico fue en un contenedor con mantas tibias, luz y calor.

6.9.6 DISLOCACIÓN CERVICAL

Se procedió a colocar el ratón en una base sólida, colocando una pinza kocher a nivel del cuello, realizando firme presión sobre la base del cráneo mientras se tira de la cola del ratón con fuerza(49).

6.9.7 GASTRECTOMÍA

Este procedimiento se realizo en los siguientes pasos:

- Laparotomía: se retiraron los puntos realizados en la laparotomía previa, cuidando el estado e integridad de los tejidos
- Gastrectomía:
 - Se identifico la unión esófago-gástrica y se ligo con seda 3-0
 - Se seccionó a nivel de esófago e inferior a la ligadura pilórica

6.10 FASE EXPERIMENTAL

6.10.1 FASE 1: ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO DE INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA

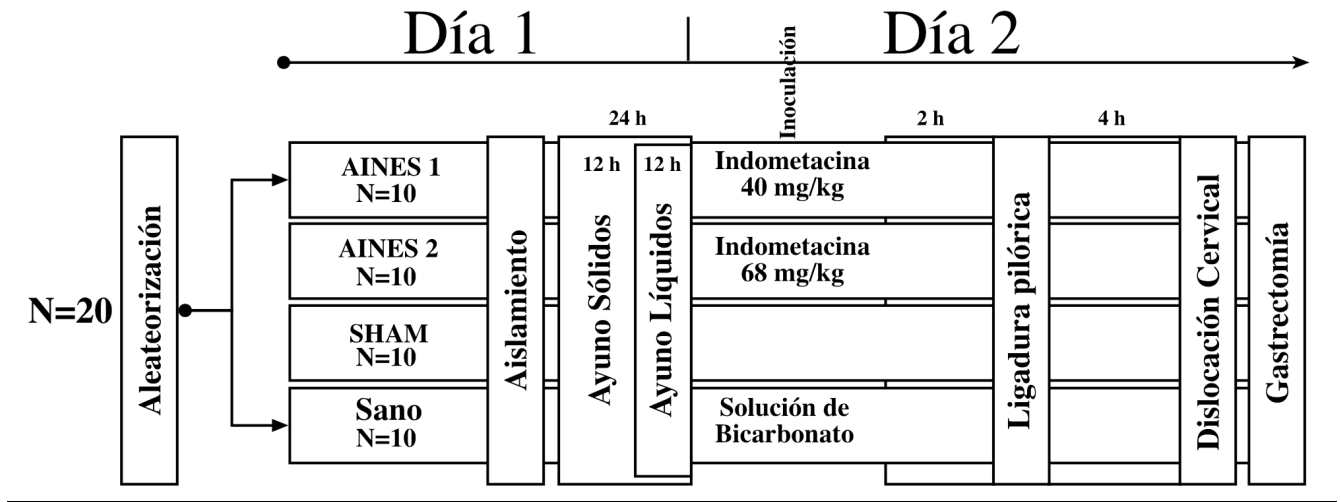


Figura 7: Fase 1 Estandarización

6.10.2 FASE 2: EXPERIMENTO

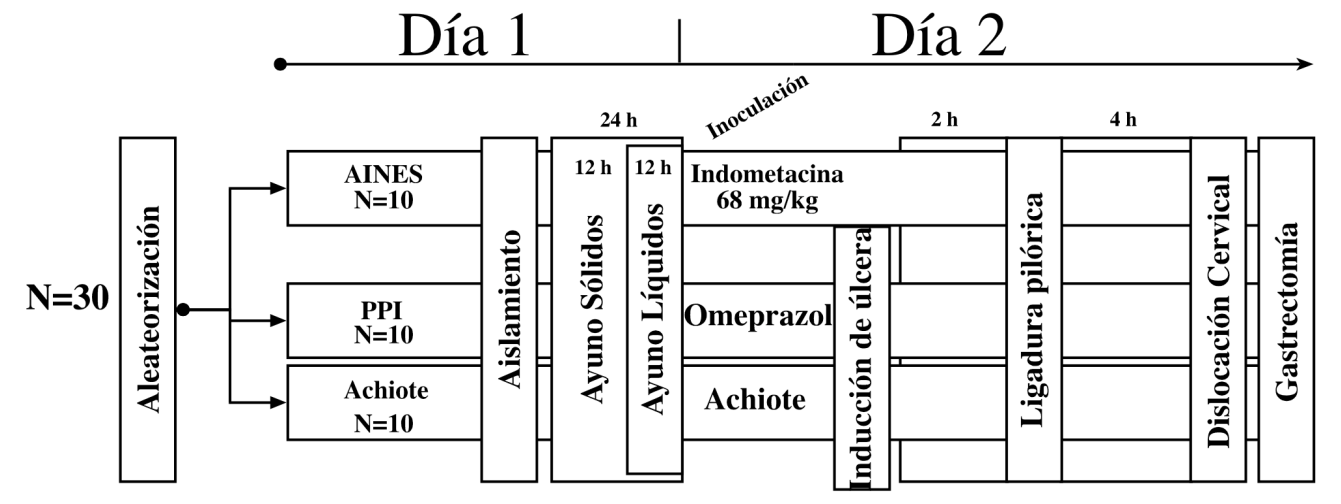


Figura 8: Fase 2 Experimento

6.10.3 MANEJO DE LA MUESTRA

Se obtuvo el contenido gástrico liberando la ligadura a nivel de cardias gástrico, introduciendo una micropipeta para medición de pH de este.

El estómago se seccionó a lo largo de la curvatura mayor, para su observación, posteriormente se realizó un lavado con solución salina normal. Cada estómago se dividió en dos porciones:

Porción 1: se colocó en papel plástico transparente, para su análisis. Se procedió a realizar análisis macroscópico (ver punto 6.10.5) y posteriormente microscópico.

Porción 2: se preservó para el análisis de lipoperoxidación.

6.10.4 ANÁLISIS MACROSCÓPICO

Se realizó análisis macroscópico por medio de digitalización de imágenes utilizando scanner EPSON stylus TX 160, el cual fue calibrado previamente, en modo profesional, a resolución de 600 dpi, para la obtención de imágenes. Los estómagos preparados en papel transparente, se colocaron en el plato de scaneo, para obtener la imagen digital que fue archivada en formato TIFF, codificándola según el grupo y número, en una base de datos.

6.10.5 ANÁLISIS DIGITAL

El análisis se realizó utilizando el programa Scion Image Software, según el procedimiento descrito por Khan et al (23). luego de realizar la captura de la imagen, se procedió al análisis, utilizando el software anteriormente dicho. Utilizando los siguientes parámetros:

- Índice de substracción de -125 puntos (110, 115, 135, 145 y 150 puntos para la estandarización)
- Calibración de 12 pixeles = 1 mm a un aumento de 4x

6.10.6 ANÁLISIS BIOQUÍMICO

6.10.6.1 TBARS

Se procedió al procesamiento de la muestra según las siguientes instrucciones del kit TBARS de la casa farmacéutica Health Care:

- **Paso 1:** se reunió la muestra gástrica
 - Preparación de la muestra: se congelo el tejido gástrico en nitrógeno líquido inmediatamente se trituró en mortero y pistilo preenfriados. Se re suspendió el tejido en 50 mg/ml de solución salina normal (*para evaluar la concentración de ácido tiobarbiturico en membranas, organelas y núcleos*)
- **Paso 2:** se marco cada tubo de vidrio con el número estándar del ratón
- **Paso 3:** se agrego 100 µl de la muestra al tubo apropiadamente rotulado
- **Paso 4:** se agrego 100 µl de solución SDS (sodium dodecyl sulfate) a cada tubo y se agito para mezclar el contenido
- **Paso 5:** se añadió 2.5 mL de TBA/reactivo buffer con fuerza hacia abajo por los lados del tubo
- **Paso 6:** se cerró cada tubo con vidrio de mármol y se incubó a 95 °C por 60 min

- **Paso 7:** se retiró cada tubo de la incubadora y se enfriaron en un baño de hielo por 10 min
- **Paso 8:** se centrifugó las muestras a 3000 RPM por 15 minutos
- **Paso 9:** se removió el sobrenadante de las muestras para análisis
- **Paso 10:** se realizó análisis con espectrofotómetro: lectura de la absorbancia del sobrenadante a 532nm

6.10.7 ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Posterior a la digitalización de la imagen del estómago, dos porciones al azar de cada grupo fueron fijadas en formalina al 10%, y enviada al laboratorio de patología, siendo teñidas con hematoxilina/eosina donde se realizó y se determinó la presencia de lesión, utilizando la escala patológica diseñada por Morini G. Y Grandi D.

Para cada muestra se determinó el total de la longitud de la mucosa examinada, y la longitud de la mucosa con cada uno de los grados de daño. En cada estómago examinado, se calculó el promedio de la longitud de la lesión gástrica en las diferentes lesiones de cada muestra.

6.11 MÉTODOS DE RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE LA MUESTRA

6.11.1 PLAN DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

El análisis estadístico se realizó por medio del programa SPSS 16.0, donde se utilizaron las pruebas de Normalidad Kolmogorov-Smirnov, prueba de Levene para homogeneidad de varianzas, análisis de frecuencias y pruebas no paramétricas: prueba U de Mann-Whitman, Kruskal Wallis y prueba de Dunn.

Pruebas paramétricas: ANOVA y Dunnett.

6.11.2 PLAN DE ALMACENAMIENTO DE DATOS

El almacenamiento de datos se realizó en el programa de Microsoft Excel 2007, para Windows 7.

6.11.3 PRESENTACIÓN DE LA INFORMACIÓN

Se realizaron las gráficas correspondientes con (el programa estadístico Graph Pad Prism 5). Además de tablas comparativas con los resultados observados y según su codificación y resultado estadístico (realizado en SPSS 16.0).

6.12 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para asegurar el uso y cuidado apropiado de los ratones utilizados durante este trabajo, nos basamos en el documento: “Elementos Esenciales Para Investigación Animal, Una Guía Para La Investigación Personal, del Centro de Información del Bienestar Animal Departamento de Agricultura de Estados Unidos Americanos Biblioteca Nacional de Agricultura”(50), y a su vez, en el Acta de Bienestar Animal (AWA). En donde se provoco el mínimo dolor posible, tanto en la aplicación de los medicamentos, como a la hora de sacrificarlos, previo a la laparotomía y gastrectomía, para el estudio histopatológico posterior.

Los ratones se separaron durante su crianza en grupos dependiendo de su sexo para evitar la reproducción entre ellos, y así evitar la probabilidad de utilizar hembras en estado gestante durante la realización de la fase experimental.

VII RESULTADOS

7.1 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA SIN LIGADURA

En la figura 9 se presenta la cinética del efecto de la indometacina a dosis de 68 mg/Kg en relación al tiempo, relacionando el efecto de la indometacina y su efecto en el pH gástrico y las concentraciones de ácido malondialdehído.

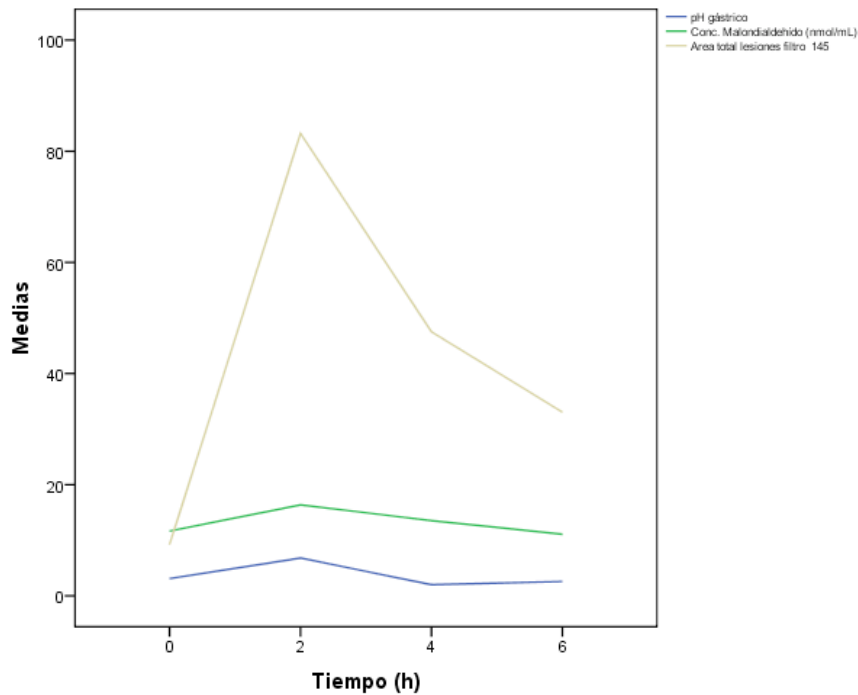


Figura 9: cinética del efecto de indometacina

Se encontró un aumento de todos los parámetros a las 2 horas posterior a la inducción del modelo, con su posterior declive a las 4 horas. A las 2 horas inicia el vaciamiento gástrico, por lo cual, el contenido de sangre se ve evacuado de la mucosa, y por ende aparecen las lesiones lineales características de las lesiones por indometacina; son observadas posteriormente y disminuye el área total de las lesiones.

El valor de las lesiones bajo el filtro 145, es correlativo a la cantidad de sangre encontrada en la mucosa gástrica. Además las variaciones de pH fueron significativas a lo largo de la cinética, mas sin embargo las variaciones de MDA no lo fueron.

7.2 ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO DE INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA EN RATONES

La N para cada grupo de estudio, fue planificada de 10 individuos, al momento del experimento algunos sujetos fueron excluidos por alguna de las siguientes causas:

- Fallecer posteriormente a la administración del anestésico
- Fallecer durante el procedimiento de ligadura gástrica
- Fallecer durante el periodo post operatorio

El uso de una dosis mayor de indometacina permitió obtener un mayor número de lesión a nivel gástrico. Las diferencias de los resultados en los métodos bioquímicos con el cambio de dosis de indometacina se muestran en la tabla 12, obteniendo para la concentración de MDA un valor P de 0.024 y para pH un valor P de 0.024, por lo cual, siendo estadísticamente significativo, particularmente en el pH para los grupos bicarbonato y AINES-SL, y para las concentraciones de MDA en grupos SHAM y AINES1.

La ligadura por si sola puede ser un factor de estrés oxidativo, además de la retención de sangre en la luz gástrica, lo cual puede ser suficiente como para causar un daño a la mucosa gástrica, ya que las concentraciones de MDA en el grupo Sham son mayores que las de otros grupo.

	Grupos ^a	N	Media	Desviación estándar
pH gástrico	Sham	8	5.14	1.32
	Bicarbonato ^b	7	5.94	0.8
	AINES 1 (40mg/kg)	9	4.83	0.96
	AINES 2 (68mg/kg)	9	5.00	0.42
	AINES 2-SL ^b	4	3.07	1.55
	Total	37		
Conc. Malondialdehído (nmol/mL)	Sham ^b	8	17.23	4.42
	Bicarbonato	6	14.02	5.16
	AINES 1 (40mg/kg) ^b	8	8.31	3.33
	AINES 2 (68mg/kg)	9	16.07	8.23
	AINES 2-SL	4	11.1	4.62
	Total	35		

a.Prueba de Kruskal Wallis pH gástrico p=0 .024
 Conc. Malondialdehído p=0 .024

b. Diferencias estadísticas significativas Prueba de Dunn

Tabla 12: Estandarización

7.2.1 RESULTADOS DE AINE1 vs AINES2

En la estandarización se les administró a los ratones de experimentación indometacina como modelo inductor de úlceras, utilizando una solución de bicarbonato de sodio como diluyente, que a su vez evita que el ácido gástrico destruya la indometacina. Comparando la dosis de indometacina a 40 mg/kg y de 68 mg/kg, podemos observar que existe un mayor número de sujetos que presentan sangrado gástrico y una disminución de pH evidenciando un mayor grado de lesión; además, al comparar las muestras histopatológicas enviadas de los diferentes grupos, en dosis a 40 mg/kg se observan lesiones GII según la escala de Morini y Grandi, mientras que a dosis de 68 mg/kg se observan lesiones GIII.

En la tabla 13 muestra la diferencia de los resultados entre las dosis de indometacina contra los parámetros bioquímicos, siendo la concentración de MDA estadísticamente significativa como para AINES1 y AINES2, encontrando una relación que a mayor dosis de indometacina existe una mayor concentración de MDA; en cuanto a la relación del pH, a mayor dosis existe mayor sangrado a nivel de la luz gástrica, por lo cual el pH se alcaliniza (ver figura 10).

Grupos		N	Mean Rank	Sum of Ranks
pH gástrico	AINES 2	9	8.28	74.50
	AINES 2-SL	4	4.12	16.50
	Total	13		
Conc. Malondialdehído (nmol/mL)	AINES 2	9	7.67	69.00
	AINES 2-SL	4	5.50	22.00
	Total	13		
Área total lesiones filtro 145	AINES 2	9	7.33	66.00
	AINES 2-SL	4	6.25	25.00
	Total	13		

Tabla 13: Resultados de comparación AINES2 y AINES2-SL

7.2.2 RELACIÓN ENTRE EL PH Y PRESENCIA DE SANGRE

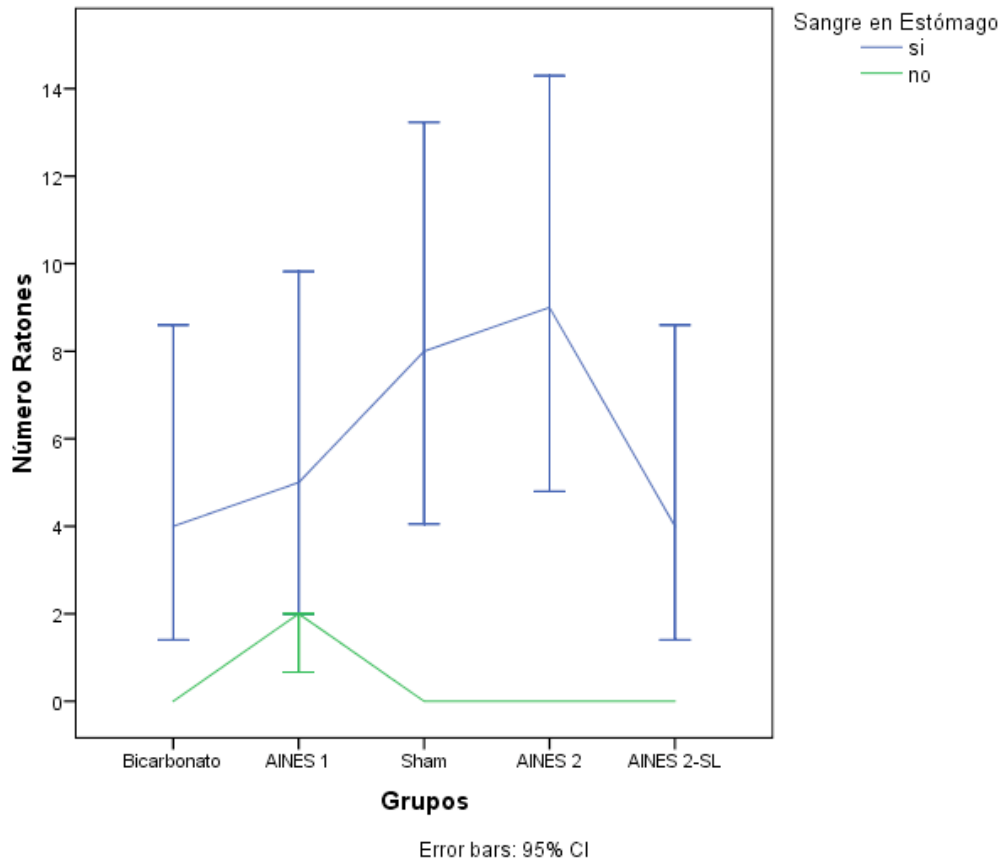


Figura 10: Sangre en la cavidad estomacal del ratón

En la figura 10 muestra la presencia de sangre en los estómagos del ratón a la hora de realizarles gastrectomía, encontrando una mayor presencia de sangre en la luz gástrica cuando existe una mayor dosis de indometacina; cabe resaltar que existe la posibilidad de encontrar sangre en todos los grupos, debido a que siempre existe una injuria aplicada a la mucosa directa, o indirectamente, el grupo bicarbonato por la acción misma del bicarbonato. A mayor presencia de sangre en el estómago, es proporcional a la alcalinización del pH.

7.3 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS

Efecto congelación		N	Mean Rank
Conc. Malondialdehído (nmol/mL)	Sham-congelación	4	11.38
	Sham- sin congelación	3	10.67
	AINES- congelación	4	6.38
	AINES- sin congelación	5	6.60
Total		16	

Tabla 14: Efecto Congelación de la muestra p=0.724

En la tabla 14 se observan los resultados del grupo AINES y Sham de la primera fase del estandarización del modelo, dividiendo en dos los grupos para evaluar si el almacenamiento de la muestra en nitrógeno líquido no afectará el resultado de la prueba.

La recomendación del fabricante es procesar las muestras al fresco, sin embargo, no se encontró significancia estadística ($p= 0.724$) como para evitar el procesamiento de muestras almacenadas en nitrógeno líquido versus las obtenidas el día del experimento.

7.4 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS DIGITALES

En la figuras 11, 12 y 13 se muestran los diferentes filtros aplicados a una muestra gástrica utilizando el programa Scion Image, para achiote, omeprazol y AINES

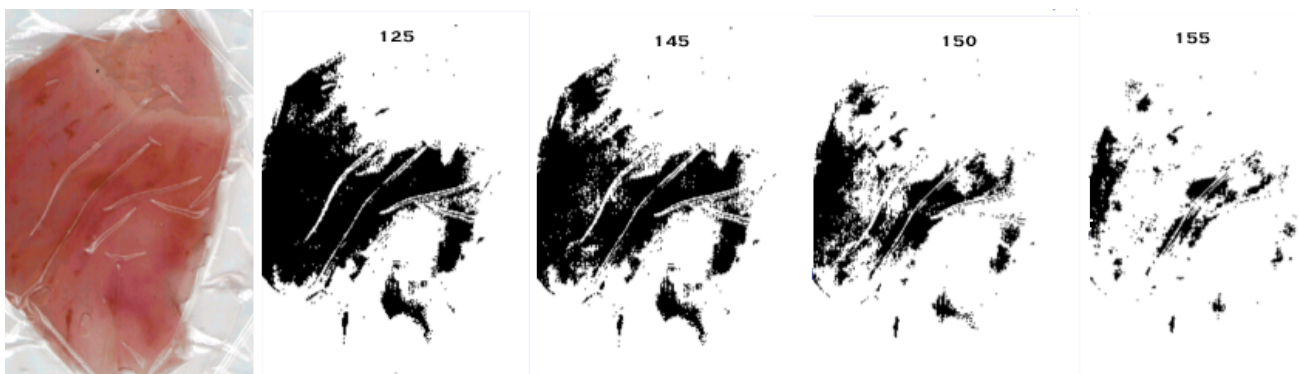


Figura 11: Estandarización de filtros Scion Image para Achiote.

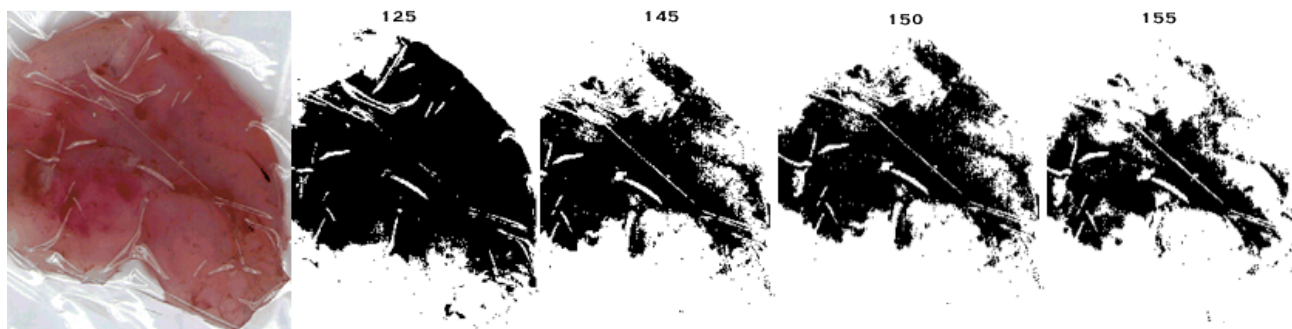


Figura 12: Estandarización de filtros Scion Image para omeprazol.



Figura 13: Estandarización de filtros Scion Image para AINES.

El análisis digital que se utilizó para las muestras fue el software Scion Image, quien en sus especificaciones y la bibliografía consultada, recomiendan utilizar el filtro 125 para detección de sangre en tejidos, sin embargo.

Utilizando el filtro 125, se obtuvo una mayor área de lesiones y un aumento de la desviación estándar en el caso del achiote; por lo contrario, al utilizar el filtro 145 el área de lesiones y la desviación estándar disminuyeron considerablemente (ver figura 13 y 14).

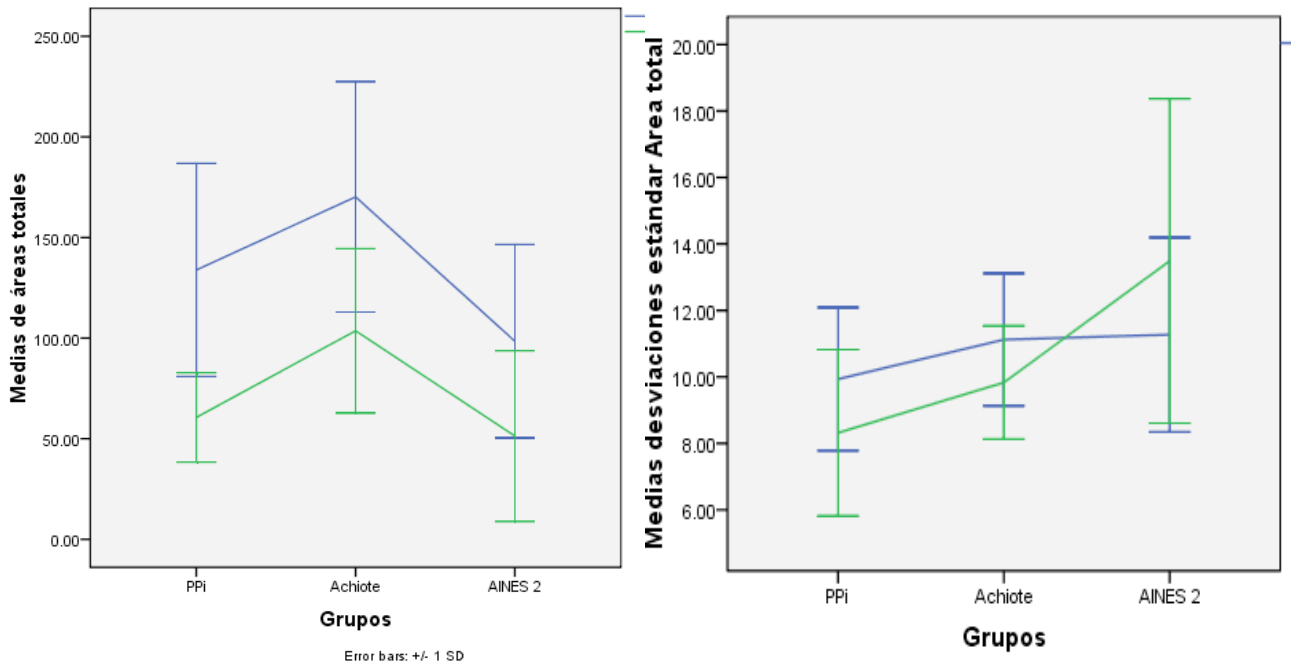


Figura 14: Comparación del área total de lesiones con filtros 125 y 145.

7.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE BIXA ORELLANA

El grupo Sham tiene una media de 5.13, el omeprazol 4.84 y el achiote de 4.4.

Además, se presentan los valores de MDA, siendo la del grupo sham 17.22, el omeprazol 13.6 y el achiote de 12.45, viendo una relación que a mayor efecto protector existe una menor concentración de MDA.

7.6 RESULTADOS DE HISTOPATOLOGÍA

Resultado Hispatológico	
Grupo	Escala patológica
R2/ AINES II	III
R5/ AINES II	III
R2/ Omeprazol	II
R5/Omeprazol	II
R4/Achiote	II
R6/Achiote	II

Tabla 15: Lesiones gástricas

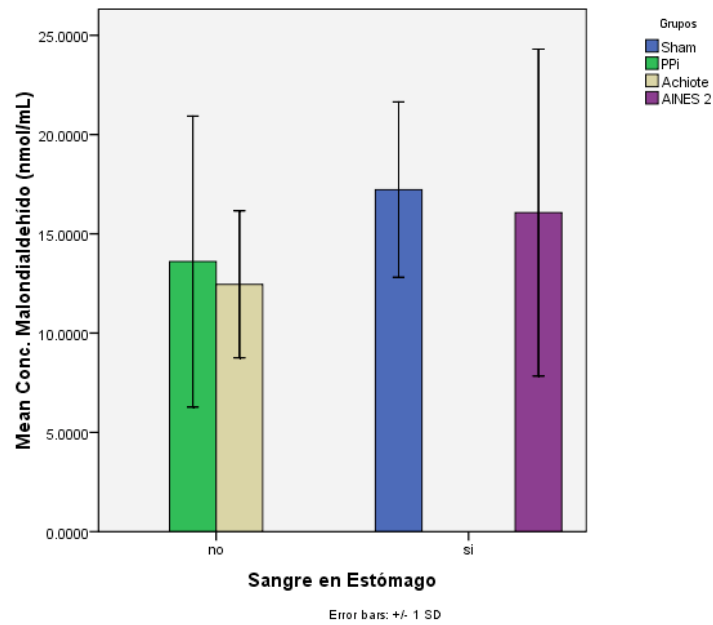


Figura 15: presencia de sangre vs concentración de MDA

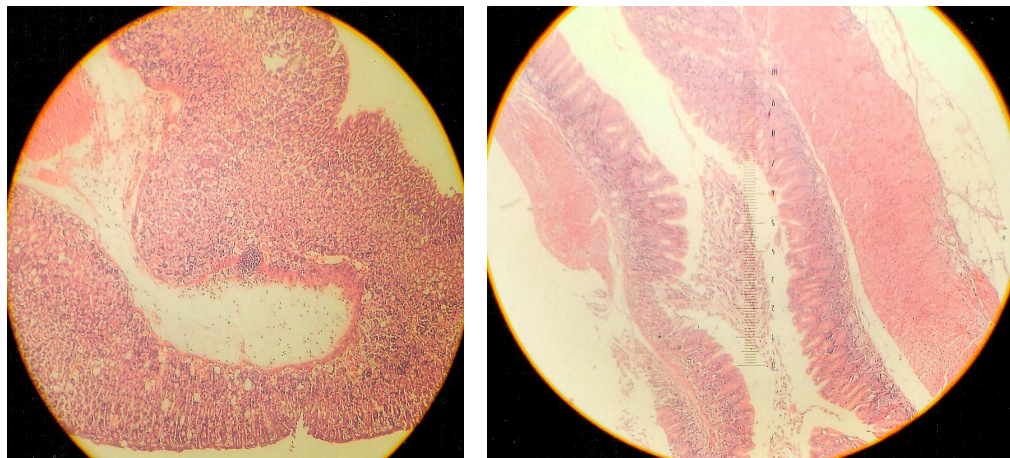


Figura 16: Lesiones GII de AINES1 (izquierda) y lesiones GIII de AINES2 (derecha)

7.7 MDA y pH

En la figura 16, se muestra las sustancias gastrolesivas, comparandolas con el efecto gastroprotector del achiote.

Efecto organoprotector y cicatrizante de extractos acuosos de hojas de *Bixa orellana* (achiote) en úlceras gástricas inducidas por indometacina en un modelo ratones

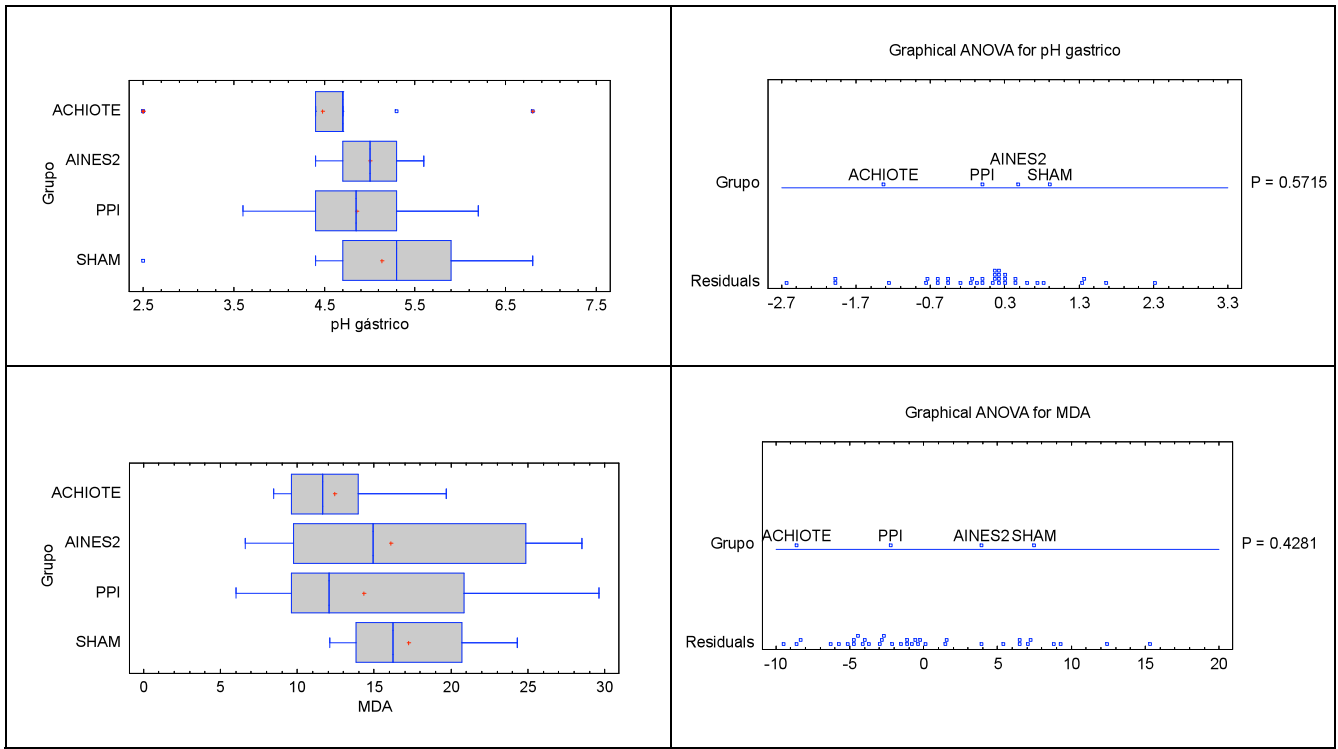


Figura 17: valores de MDA y pH

A pesar de que no existan tendencias estadísticas, se puede observar que el grupo al que se le administró *B. orellana* (grupo achiote), ha presentado un comportamiento diferente al de los demás grupos.

El achiote es quien ha presentado menor variación de pH; sin embargo, algunas muestras fueron eliminadas, por encontrarse fuera de los intervalos de confianza.

Los valores de MDA para el grupo al que se le administró achiote, resultaron los mas bajos en comparación con los demás grupos, demostrando así, un mayor grado de protección de la mucosa gástrica.

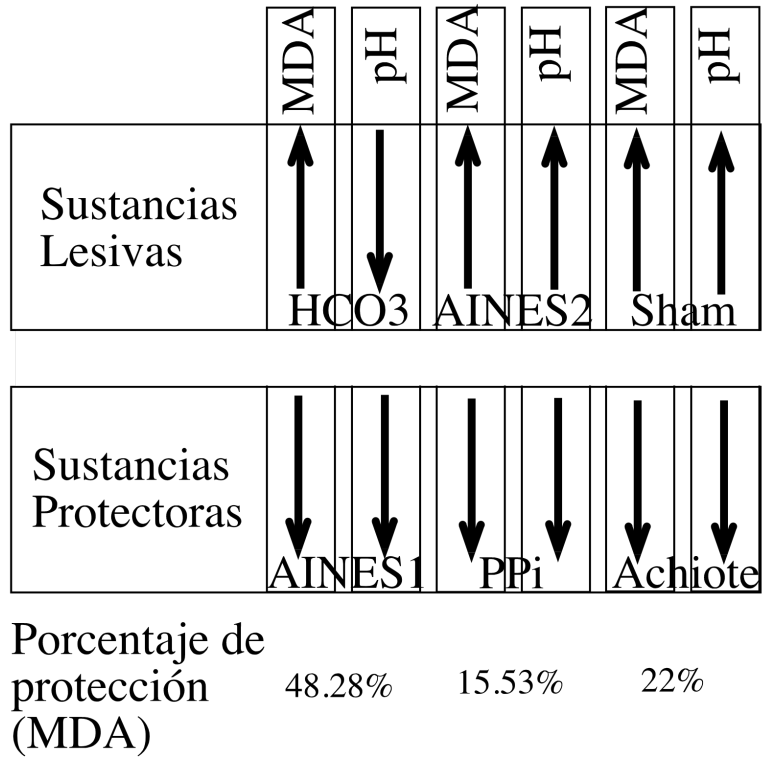


Figura 18: Porcentaje de protección

VIII Discusión

La úlcera gástrica, es una patología con etiología multifactorial, en la que tanto factores ambientales, como del propio paciente tienen una importancia significativa para la formación y profilaxis de la misma.

Los AINES son inhibidores de la COX, evitando que se metabolicen tanto prostaglandinas como tromboxanos, encargados de los procesos de inflamación, dolor y agregación plaquetaria, pero que a su vez, también lesionan la mucosa gástrica como efecto secundario del uso del medicamento. El uso crónico de AINES causa un estímulo nocivo a las células gástricas, el cual puede progresar hasta la formación de úlceras.

8.1 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA SIN LIGADURA

Al conocer que el daño máximo ocurre a las 2 horas de administrar la indometacina, como lo refleja la figura 9, se conoce que tanto la concentración de MDA y la presencia de sangre en la luz gástrica, así como la alcalinización del pH, puede ser debido a la administración del bicarbonato que se utilizó para la dilución de la indometacina.

Los valores bioquímicos de pH y MDA fueron disminuyendo posterior a las 2 horas del estímulo lesivo, lo cual nos hace pensar que la ausencia de la ligadura pilórica y por ende la falta de acumulación de la sangre en la luz gástrica, permite reestablecer el pH intra gástrico y así evitar mayor lesión a la obtenida en los grupos con ligadura pilórica.

8.2 ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO DE INDUCCIÓN DE ÚLCERAS POR INDOMETACINA EN RATONES

El modelo de inducción de úlceras en ratones por indometacina, se encuentra descrito en la literatura con una dosis de 20-40 mg/Kg de peso, con resultados óptimos de úlceras en las muestras histopatológicas de la mucosa gástrica.

El efecto de la indometacina a dosis de 40 mg/kg demostró un efecto protector de la mucosa gástrica, debido a que presentaron menor número de lesiones que el uso de bicarbonato solo, esto puede ser secundario a las alteraciones del pH, ya que el bicarbonato es básico y la indometacina es un ácido débil, por lo que el efecto nocivo que podría causar cada uno de estos

compuestos por separado, al encontrarse en una misma solución se nivela el pH, y así disminuye el efecto lesivo que se busca con el método de inducción de úlceras.

La indometacina aumenta los niveles de peroxidación lipídica, ya que estimula la producción de mieloperoxidasa, derivada de fagocitos y polimorfonucleares; la mieloperoxidasa, cataliza la producción del ácido hipocloro, derivado del peróxido de hidrógeno, este ácido junto con los otros radicales libres de oxígeno, producen oxidación de la membrana lipídica de la célula.

8.3 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS

La utilización del kit TBARS para medición del MDA, permitió obtener datos importantes secundarios a lipoperoxidación(51), más sin embargo era necesario trabajar con un número de muestras mayor al que podíamos procesar en un solo día de trabajo, por lo cual, se decidió congelar la mitad de las muestras, para luego ser procesadas con otro grupo de muestras al fresco; al comparar las muestras congeladas con nitrógeno líquido, con las muestras al fresco, no existió significancia estadística ($p=0.298$).

Debido a que no existe diferencia estadísticamente significativa, podemos afirmar que no existe ningún problema con almacenar las muestras en nitrógeno líquido, y posteriormente procesarlas con reactivos frescos, para mayor comodidad del estudio.

8.4 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS DIGITALES

Al ser evaluadas las muestras por programa Scion Image, con los filtros 125 y 145(43), se observa que existen variaciones tanto en el área total de lesiones y las desviaciones estándar, siendo los valores del grupo PPI los menores de todos los grupos, mas sin embargo, al realizar la gastrectomía y abrir el estómago por la mitad, en el grupo de achiote se observaba una coloración café-rojiza, las cual puede ser atribuida a los pigmentos que se encuentra en las hojas del achiote, ya que los frutos tienen altos contenidos de bixina, un colorante rojizo; de esta forma podemos afirmar que el método de análisis microscópico que fue utilizado no es una buena opción a la hora de utilizar macerados o sustancias con sedimentos que pueden adherirse a la mucosa gástrica.

8.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE BIXA ORELLANA

El grupo al cual no se le realizó ligadura pilórica, puede explicarse el bajo número de sangre en la luz gástrica, debido a que no había una barrera física como lo es la ligadura, para mantener la sangre dentro del estómago.

La presencia de sangre en la luz gástrica, puede deberse a dos principales factores, primero al estímulo nocivo, el cual es respaldado a que la sangre fue observada en su mayoría en los grupos Sham (solo bicarbonato) y AINES₂, el grupo con menor índice de sangre es el grupo de achiote, aunque a la observación directa de los estómago se encontró un sedimento, que puede ser atribuido al macerado preparado de achiote, ya que no fue filtrado a la hora de ser administrado.

Los cambios de pH observados en los diferentes grupos, nos da un parámetro de respuesta del estómago a la hora de un estímulo nocivo; los valores de pH gástrico normales del ratón son 2.98-4.04(52), viendo un pH ácido cercano a valores normales en el grupo de achiote, inclusive valores mas cercanos y con una desviación estándar menor que con el grupo de PPI. De esta manera podemos afirmar que el uso de achiote permite mantener un ambiente en la luz gástrica cerca del normal, y así poder disminuir el efecto lesivo de la indometacina.

8.6 RESULTADOS DE HISTOPATOLOGÍA

A la hora del análisis de las muestras enviadas a patología, podemos ver que las lesiones causadas por AINES₂ fueron GIII, mientras que las que se ocasionaron AINES₁ y Sham fueron GII igual que las de achiote, viendo lesiones similares a las encontradas en el grupo PPI, por lo que podemos decir que el uso del achiote disminuyó las lesiones gástricas, protegiendo la mucosa(43).

8.7 MDA Y PH

La cuantificación del MDA es una respuesta directa al proceso de peroxidación lipídica, lo cual es a consecuencia del proceso de isquemia-reperfusión, la isquemia produce radicales libres, los cuales atacan los ácidos grasos de la membrana celular, sufriendo un acortamiento de las cadenas laterales, liberado ácido malondialdehído, pudiendo afirmar que la concentración de MDA es directamente proporcional al daño tisular, siendo un excelente marcador de

peroxidación lipídica. La determinación del MDA se basa en la reacción colorimétrica de los peróxidos lipídicos con el ácido tiobarbiturico, para dar MDA.

Al comparar los grupos de PPI y achiote, vemos valores mas bajos en el grupo de achiote con relación al de PPI, y al extrapolar los valores del grupo AINES₂, vemos que los valores de MDA se disminuyen grandemente relacionándolo con el uso de un factor protector, en este caso los valores mas bajos de MDA presentados en el grupo achiote nos hace afirmar que el macerado administrado permitió un menor daño de la mucosa gástrica, y por ende, se le puede inferir un efecto gastroprotector.

Los compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y terpenos, actúan como antioxidantes, infiriendo así un efecto citoprotector, que en diferentes plantas ya se han comprobado su efecto gastroprotector, antisecretor, antiinflamatorio e inhibidor de la migración de las células inflamatorias y actividad ante los radicales libres; los flavonoides son considerados protectores celulares, conociendo su actividad como atrapadores de radicales libres y antioxidantes, además del incremento de prostaglandinas, las principalmente disminuidas a la hora de la inhibición de la COX posterior al uso de AINES(31).

Las hojas de achiote son ricas en: taninos, compuestos fenólicos, quercetina, carotenoides, alcaloides, como la bixina y nor bixina, y los flavonoides, es por esa razón, por la cual nosotros podemos concluir, que el efecto gastroprotector del macerado de achiote que fue utilizado aumentando los niveles de prostaglandinas, siendo secundario a la presencia de la quercetina como ya ha sido demostrado en otros estudios(31), permitiendo el atrapamiento de los radicales libres y actuar como un antioxidante y atenuar el efecto que acarrea el efecto inflamatorio sobre los tejidos secundarios al estímulo lesivo de los AINES.

El efecto del macerado de achiote que se utilizó en nuestro estudio, a pesar de las limitaciones y de la inexactitud para dosificar o calcular concentraciones del mismo, demostró que algo sencillo y hasta cierto punto rudimentario puede ejercer cierto efecto citoprotector, ya que demostró mantener valores de pH cercanos a los normales y los valores de MDA, siendo un indicador de daño celular resultaron bajos.

IX CONCLUSIONES

- El modelo de inducción de úlceras en ratones por indometacina es efectivo
- El procesamiento de las muestras al utilizar el kit TBARS no se ve afectado al mantener congelado las muestras y ser procesadas posteriormente
- Scion Image no es el método ideal para cuantificar lesiones gástricas al utilizar extractos de plantas con pigmentos coloreados similares a la sangre
- El macerado de *Bixa orellana* tiene tendencia a ser citoprotector
- El macerado de *Bixa orellana* mantiene valores de pH gástrico cercanos a los valores normales
- *Bixa orellana* presenta tendencia a disminuir MDA en comparación de otros factores citoprotectores
- El bicarbonato puede actuar como un factor lesivo en la mucosa gástrica
- La ligadura pilórica es un factor que produce estrés tisular

X RECOMENDACIONES

- Se debe de utilizar una dosis mayor de indometacina a la descrita por la bibliografía para obtener lesiones gástricas
- Es necesario obtener un extracto purificado de las hojas de achiote, para poder cuantificar dosis por kilogramo de peso, verificando los rangos de efectividad
- Se debe de obtener una caracterización del extracto de las hojas de *Bixa orellana*
- Se necesita identificar otro método de análisis digital mas sensible a lesiones gástricas, sin sesgo secundario al uso de pigmentos naturales
- Se recomienda aumentar la N
- Para evaluar un posible efecto de cicatrización del achiote, es necesario realizar un modelo de exposición crónica al achiote
- Se recomienda comparar muestras de ambos sexos
- Se recomienda utilizar el extracto con diferentes modelos de inducción de úlceras
- Es necesario la cuantificación de flavonoides del extracto
- Realizar un estudio fitoquímico y conocer las concentraciones exactas de las diferentes sustancias

IX BIBLIOGRAFÍA

1. Pertusi RM, Godwin KS, House JK, Knebl JA, Alexander JH, Rubin BR, et al. Gastropathy induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prescribing patterns among geriatric practitioners. *J Am Osteopath Assoc.* 1999 Jun;99(6):305–10.
2. Griffin M. Epidemiology of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug?Associated Gastrointestinal Injury. *The American Journal of Medicine.* 1998 Mar;104(3):23S–29S.
3. Lanas A, Perez-Aisa MA, Feu F, Ponce J, Saperas E, Santolaria S, et al. A nationwide study of mortality associated with hospital admission due to severe gastrointestinal events and those associated with nonsteroidal antiinflammatory drug use. *Am. J. Gastroenterol.* 2005 Aug;100(8):1685–93.
4. Wolfe M, Lichtenstein D, Singh G. Gastrointestinal Toxicity of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs — NEJM [Internet]. [cited 2011 Jul 16]. Available from: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199906173402407>
5. Srikanta BM, Siddaraju MN, Dharmesh SM. A novel phenol-bound pectic polysaccharide from *Decalepis hamiltonii* with multi-step ulcer preventive activity. *World J. Gastroenterol.* 2007 Oct 21;13(39):5196–207.
6. Mota KS de L, Dias GEN, Pinto MEF, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito ARM, Hiruma-Lima CA, et al. Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules.* 2009;14(3):979–1012.
7. CAB International, Huamán O, Sandoval M, Arnao I, Béjar E. Antiulcer effect of lyophilized hydroalcoholic extract of *Bixa orellana* (annatto) leaves in rats. [Internet]. [cited 2011 Jun 4]. Available from: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20103152263.html;jsessionid=6E0A3908AA60E2B666F7DC3E7989FA3E>
8. Pachecho M, Huamán O, Camaren E, Texeira B, Pachecho C. Evaluación gastroprotectora del extracto hidroalcohólico de hojas de *Guilleminea densa* (Hum. Bonpl. ex Willd.) Moq. (*Sanguinaria*) en úlceras inducidas con etanol. *Revista de la Academia Peruana de Salud.* 2010;17(Nº 2).
9. Rostom A, Dube C, Wells G, Tugwell P, Welch V, Jolicoeur E, et al. Prevention of NSAID-induced gastroduodenal ulcers. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(4):CD002296.
10. Velarde O. Gastropatía por Antiinflamatorios no Esteroides [Internet]. [cited 2011 Jun 18]. Available from: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/spmi/v10n3/gastrop_antiinflam.htm
11. Dávalos J, Bustamante Z. Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos de llantén (*Plantago major*) [Internet]. [cited 2011 Jul 17]. Available from: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1813-53632008000100007&script=sci_arttext
12. El MAG reforzará el apoyo para la agroindustrialización del achiote en El Salvador [Internet]. [cited 2011 Jul 16]. Available from: http://www.infoagro.com/noticias/2008/7/2387_el_mag_reforzara_apoyo_agroindustrializacion_achio.asp

13. Podolski J. Recent Advances in Peptic Ulcer Disease: Helicobacter Pylori... : Gastroenterology Nursing [Internet]. [cited 2012 Mar 11]. Available from: http://journals.lww.com/gastroenterologynursing/Abstract/1996/07000/Recent_Advances_in_Peptic_Ulcer_Disease_3.aspx
14. ISSS. Anuario Estadístico 2010 [Internet]. [cited 2011 Dec 17]. Available from: http://www.iss.gov.sv/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=8:estadisticas&Itemid=115
15. Crespin M, Hernández R. Determinación del valor diagnóstico de los métodos utilizados para la detección de Helicobacter pylori en pacientes sintomáticos y asintomáticos del servicio de gastroenterología del Hospital Nacional Rosales 2004-2006.
16. Genovés JS, Pedrol JE, Mollá BR. Prevención de la gastroenteropatía inducida por antiinflamatorios no esteroideos. Centro de Salud de Nazareth Valencia [Internet]. Available from: www.svmfyc.org/Revista/08/AINEs.pdf
17. FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. N. Engl. J. Med. 2001 Aug 9;345(6):433–42.
18. Angel L, Narduli G. Lesiones gastrointestinales por AINE: lesiones y medidas de prevención. Universidad de Zaragoza. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. Hospital Clínico Universitario. 2010;
19. Rodríguez CF. LESIONES GASTRODUODENALES INDUCIDAS POR ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS. [Internet]. Gastroenterología. Available from: <http://www.sld.cu/sitios/gastroenterologia/temas.php?idv=13906>
20. Johnson HD. Gastric ulcer: classification, blood group characteristics, secretion patterns and pathogenesis. Ann Surg. 1965 Dec;162(6):996–1004.
21. Truyols J, Martínez A. Úlcera Gástrica y Duodenal. Available from: www.san.gva.es/docs/dac/guiasap035ulcera.pdf Similar
22. Vecina ST. Farmacología de los Antiulcerosos. Emergencias [Internet]. 2002 [cited 2011 Jul 30];14(S2-S13). Available from: <http://emergencias.medynet.com/articulo.php?id=462&idioma=&numpag=>
23. Newton JL, Allen A, Westley BR, May FE. The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. Gut. 2000 Mar;46(3):312–20.
24. Clasificación ATC [Internet]. [cited 2011 Dec 28]. Available from: www.cabasnet.org/...%20Clasificaciones/Clasificacion%20ATC.pdf
25. Barkun A, Leontiadis G. Systematic Review of the Symptom Burden, Quality of Life Impairment and Costs Associated with Peptic Ulcer Disease. The American Journal of Medicine. 2010 Apr;123(4):358–366.e2.
26. Keville K, Stansbury J, Green M, Dodt C, Byers RD, Dffy LK, et al. Guía Completa de la Medicina Natural. International Masters Publishers AB; 1999.

27. Economico | CDC Ulcer [Internet]. [cited 2012 Mar 11]. Available from: <http://www.cdc.gov/ulcer/economico.htm>
28. Redalyc- Artículo: Efecto protector del Aloe vera (sabila) en lesiones gástricas inducidas con etanol en ratas - CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana [Internet]. [cited 2011 Jun 11]. Available from: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=71712207>
29. Gonzáles RM. Efecto citoprotector de extractos acuosos de *Indigofera guatemalensis* e *Indigofera suffruticosa* en modelos de úlceras gástricas inducidas por etanol en ratones. Biblioteca Central UJMD; 2010.
30. Martínez-Flores S, Gonzáles-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. 2002;17(6):271–8.
31. Huamán O. Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* (achiote), en ratas [Internet]. [cited 2012 Mar 3]. Available from: <http://ateneo.unmsm.edu.pe/ateneo/handle/123456789/1131>
32. ADER R. Plasma Pepsinogen Level in Rat and Man. *Psychosomatic Medicine*. 1963 May 1;25(3):218 –220.
33. Weiner H. Use of animal models in peptic ulcer disease. *Psychosom Med*. 1996 Dec;58(6):524–45.
34. The Anatomy of the Laboratory Mouse [Internet]. [cited 2011 Mar 26]. Available from: <http://www.informatics.jax.org/cookbook/>
35. McConnell EL, Basit AW, Murdan S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J. Pharm. Pharmacol*. 2008 Jan;60(1):63–70.
36. Kratz A, Ferraro M. Normal Reference Laboratory Values — NEJM [Internet]. [cited 2011 Sep 10]. Available from: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMcp049016>
37. Fornai M, Colucci R, Antonioli L, Awwad O. Pharmacological Research : Effects of esomeprazole on healing of nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced gastric ulcers in the presence of a continued NSAID treatment: Characterization of molecular mechanisms [Internet]. [cited 2011 Dec 17]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661810002057>
38. Nair V, Arjuman A, Gopalakrishna HN, Dorababu P, Mirshad PV, Bhargavan D, et al. Evaluation of the anti-ulcer activity of NR-ANX-C (a polyherbal formulation) in aspirin & pyloric ligation induced gastric ulcers in albino rats. *Indian J. Med. Res*. 2010 Aug;132:218–23.
39. Devi RS, Narayan S, Vani G, Shyamala Devi CS. Gastroprotective effect of *Terminalia arjuna* bark on diclofenac sodium induced gastric ulcer. *Chem. Biol. Interact*. 2007 Apr 5;167(1):71–83.

40. Sandoval-Vegas M, Huamán-Gutiérrez O, Oré-Sifuentes R, Loli-Ponce A, Ayala-Pío S. Efecto antioxidante y citoprotector del *Solanum tuberosum* (papa) en la mucosa gástrica de animales de experimentación. *An. Fac. med.* 2010;71(3):147–52.
41. Khan HA. Computer-assisted visualization and quantitation of experimental gastric lesions in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2004 Apr;49(2):89–95.
42. Scion Image Software Informer: Latest version download, news and info about this Scion Corporation program. Scion Image may be used to capture, display, analyze, and output images. [Internet]. [cited 2011 Jun 11]. Available from: <http://scion-image.software.informer.com/>
43. Morini G, Grandi D. Methods to measure gastric mucosal lesions in the rat. *Curr Protoc Toxicol.* 2010 Feb;Chapter 21:Unit 21.2.
44. Takeuchi K, Tanigami M, Amagase K, Ochi A, Okuda S, Hatazawa R. Endogenous prostaglandin E2 accelerates healing of indomethacin-induced small intestinal lesions through upregulation of vascular endothelial growth factor expression by activation of EP4 receptors. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2010 May;25 Suppl 1:S67–74.
45. Fornai M, Colucci R, Antonioli L, Ghisu N, Tuccori M, Blandizzi C, et al. Effects of pantoprazole on ulcer healing delay associated with NSAID treatment. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* 2008 Oct;379(3):305–13.
46. Solmaz A, Şener G, Çetinel Ş, Yüksel M, Yeğen C, Yeğen BÇ. Protective and therapeutic effects of resveratrol on acetic acid-induced gastric ulcer. *Free Radic Res.* 2009 Jan;43(6):594–603.
47. Pérez Gastell PL, Pérez de Alejo JL. Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Medica Militar.* 2000 May 12;29(3):192–8.
48. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 1993 Nov;123(11):1939–51.
49. Thurmon JC, Benson GJ, Tranquilli WJ. *Fundamentos de anestesia y analgesia en pequeños animales.* Elsevier España; 2003.
50. *Elementos Esenciales Para Investigación Animal, Una Guía Para La Investigación Personal* [Internet]. [cited 2011 Jun 13]. Available from: <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/noawicpubs/essenti2.htm>
51. Zeptometrix Corporation. Oxitek TBARS Assay Kit Thiobarbituric Acid reactive substances [Internet]. Zeptometrix Corporation; Available from: www.zeptometrix.com
52. Abdel-Raheem IT. Gastroprotective Effect of Rutin against Indomethacin-Induced Ulcers in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2010 Sep;107:742–50.