

UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

RED BIBLIOTECARIA MATÍAS

DERECHOS DE PUBLICACIÓN

Basados en

El Reglamento de Graduación de la Universidad Dr. José Matías Delgado

Capítulo VI, Art. 46

“Los documentos finales de investigación serán propiedad de la Universidad para fines de divulgación”

Publicado bajo la licencia Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual de Creative Commons
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>



Se permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra siempre que se especifique el autor y el nombre de la publicación y sin objetivos comerciales, y también se permite crear obras derivadas, siempre que sean distribuidas bajo esta misma licencia

Para cualquier otro uso se debe solicitar el permiso a la Universidad

Universidad
Dr. José Matías Delgado
Facultad de Ciencias de la Salud
Dr. Luis Edmundo Vásquez
Escuela de Medicina



TESIS

Efecto citoprotector de extractos acuosos de
Indigofera guatemalensis e *Indigofera suffruticosa* en modelos de
úlceras gástricas inducidas por etanol en ratones

Presentado por
Br. Rosa María Amalia González Melgar

Para optar al título de:
Doctorado en Medicina

Asesora:
Lic. María Teresita Bertolí Avella

2010

Cuadro de contenido

Planteamiento del problema	6
Justificación.....	7
Marco Teórico	8
Enfermedad úlcero-péptica (EUP)	8
Enfermedad úlcero-péptica por etanol	9
Secreción gástrica.....	10
Formación de las úlceras gástricas	13
Mecanismos de protección de la mucosa gástrica.....	13
Mecanismos de alteración de la mucosa gástrica.....	13
<i>Aumento del flujo sanguíneo</i>	14
Factores agresivos	14
Factores defensivos	14
Pepsina	14
Óxido nitroso.....	14
Gastrina	14
Sulfridrilos.....	14
Proteasas.....	14
Gangliósidos.....	14
Radicales libres	14
Prostaglandina	14
Isquemia	14
Dopamina	14
Leucotrienos.....	14
Mucus.....	14
Dismotilidad.....	14
Bicarbonato	14
Etanol	14
SDO/ Catalasa	14
Nicotina	14
Flujo sanguíneo de la mucosa	14
AINES	14

Interleucina.....	14
Estrés	14
Poliamidas	14
Helicobacter pylori.....	14
<i>Difusión de iones H+</i>	15
<i>Bicarbonato de sodio</i>	15
Modelos experimentales de inducción de úlceras	15
Anatomía del tracto digestivo del ratón de laboratorio.	15
Modelo de úlceras en ratones	16
Métodos para la cuantificación de úlceras inducidas experimentalmente.....	17
Métodos Macroscópicos.....	17
Métodos microscópicos.....	19
Tratamiento de la ulcera péptica	19
Plantas medicinales con actividad antiulcerogénica.	20
<i>Nim</i>	21
<i>Croton cajacura</i>	21
<i>Cistus inacanus</i>	21
El género <i>Indigofera</i>	21
Objetivos	24
General:	24
Específicos:	24
Delimitación del tema	25
Hipótesis.....	26
Hipótesis de trabajo:.....	26
Metodología	26
Tipo de estudio:.....	26
Población.....	26
Muestra.....	27
Grupos experimentales n= 60.....	27
Criterios de inclusión:	27
Criterios de exclusión:.....	27
Diseño experimental.....	27

Definición.....	30
Antiulceroso	30
Medicamento que protege la mucosa gástrica de erosión.	30
Organoprotector	30
Compuesto que protege un órgano de daño por erosión.	30
Gastroprotector.....	30
Compuesto que protege la mucosa estomacal.	30
Citoprotector	30
Compuesto que proteja las células por debajo del epitelio de la mucosa gástrica.	30
Aspectos Éticos	30
Obtención del extracto de plantas	31
Caracterización del Extracto	31
Procedimientos experimentales.....	31
Estandarización del modelo de inducción de úlceras gástricas por ETOH	31
Evaluación del efecto citoprotector.....	32
Métodos de recolección y análisis de muestra	32
Extracción del estómago	32
Análisis macroscópico.....	33
Análisis digital de imágenes.....	34
Análisis microscópico	34
Plan de análisis de datos.....	35
Resultados.	36
Caracterización espectrofotométrica de los Extractos de <i>Indigofera sufruticosa</i> e <i>Indigofera guatemalensis</i>	36
Estandarización del modelo de inducción de úlceras por Etanol en ratones	36
Características histopatológicas de las lesiones inducidas por el etanol en la mucosa gástrica de los ratones.....	38
Evaluación de efecto gastroprotector de los extractos de <i>Indigofera sufruticosa</i> e <i>Indigofera guatemalensis</i>	38
Evaluación de variables.....	38
Relación entre área de las lesiones determinadas por análisis digital de imágenes y los hallazgos histopatológicos.....	44
Análisis microscópico	41

Hiperemia, edema y erosión.....	41
Discusión.....	44
Estandarización del modelo de inducción de úlceras.....	45
Método digital de análisis de imágenes.....	45
Caracterización de los extractos de <i>I. guatemalensis</i> e <i>I. sufruticosa</i>	45
Efecto citoprotector de los extractos de <i>I. guatemalensis</i> e <i>I. sufruticosa</i>	46
¿Podría existir un sinergismo gastroprotector entre el género <i>Indigofera</i> y el EDTA?	48
Conclusiones	49
Recomendaciones.....	50
Anexo I.....	51
Pruebas de normalidad	51
Anexo II	52
Anexo III	52
Bibliografía	53

Planteamiento del problema

La úlcera gástrica es una enfermedad de origen multifactorial, con una etiología compleja. Entre sus principales causas podemos mencionar la infección por *Helicobacter pylori*, consumo crónico de analgésicos no esteroideos (AINES), estrés como factor desencadenante, consumo crónico de alcohol y la hipersecreción ácida.

Actualmente se sabe que las úlceras gástricas se presentan ante un desequilibrio entre los factores agresores y los factores defensivos de la mucosa gastroduodenal. De aquí que se considera que esta enfermedad puede ser prevenida, por ejemplo reforzando los mecanismos de defensa de la mucosa gástrica y disminuyendo los mecanismos que causan la ulceración de la mucosa (1). Se trata de una patología bastante frecuente, lo que en gran medida se debe al fracaso tanto en la prevención como del tratamiento adecuado, a pesar de todos los estudios y bibliografía que de esta se tienen (1) (2). Por lo que, la búsqueda de sustancias con nuevas actividades biológicas encaminadas a abordar este problema es también frecuentes en la literatura.

Se conoce a través de estudios preliminares el efecto gastroprotector o citoprotector de la *Indigofera suffruticosa* (3). En nuestro país, también se encuentra muy frecuentemente la especie de *Indigofera guatemalensis*, por lo que se desea establecer, como se ha demostrado en otros estudios, si el extracto acuoso de las hojas dichas especies de añil, es efectivo para proteger la mucosa gástrica. Debido a esto nos hemos planteado la pregunta: *I. guatemalensis* e *I. suffruticosa* ¿tienen igual actividad *citoprotectora* en modelos de úlceras gástricas inducidas por etanol en ratones?

Justificación

El uso de las plantas medicinales ha sido la base fundamental de la farmacoterapia actual y se sabe que su utilización, en Asia, se remonta más de 10,000 años (4). Durante mucho tiempo las plantas medicinales fueron la principal herramienta que utilizaban los médicos, para el tratamiento de las enfermedades, esto llevó con el paso de los años a que se ampliara la investigación de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales.

La ulcera gástrica es una enfermedad de altos índices endémicos (1), con antecedentes de fracasos terapéuticos, por lo cual nos parece importante y sumamente beneficioso investigar si las especies de *I. guatemalensis* y *I. suffruticosa* poseen similares efectos citoprotectores que las otras especies del género *Indigofera* descritas en diferentes estudios (3). La selección de las especies a estudiar se ha realizado con base a que estas especies son las más cultivadas en El Salvador, y por lo tanto de más fácil obtención¹.

Al hablar de plantas medicinales nos referimos a todas aquellas que contienen uno o más principios activos, los cuales, administrados en la dosis adecuada producen un efecto curativo a las enfermedades (4). Para la fabricación de muchos medicamentos se han usado los principios activos de determinadas plantas medicinales, en las cuales los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí (5).

Aunque en los últimos años han aumentado las investigaciones de las plantas con usos medicinales, todavía no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus cualidades, por la complejidad de los extractos vegetales y su inmensa variabilidad.

Debido al gran número de problemas de salud en poblaciones de bajos recursos económicos, muchas veces éstas son utilizadas en lugar de la medicina convencional como producto de una etnopráctica.

¹ Comunicación personal con Ing. Álvaro Zaldaña, Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA).

Dentro del reino vegetal podemos mencionar el género *Indigofera*, conocido en nuestra región con el nombre de añil, de la cual existen muchas diferentes especies, entre las que se pueden mencionar *guatemalensis*, *suffruticosa*, *mucronata*, *lespedizioides*, etc., que han sido utilizadas durante siglos, como tinturas para tela (6); pero existe evidencia del uso de sus propiedades curativas desde épocas prehispánicas (7), siendo hasta fechas más recientes que se han realizado estudios más rigurosos con el fin de demostrar sus propiedades antimicrobianas y gastroprotectoras (8).

Marco Teórico

Enfermedad úlcero-péptica (EUP)

Las úlceras pépticas, son defectos en la mucosa gástrica o duodenal que se extienden hacia la capa muscularis mucosa, los factores etiológicos más frecuentes son la infección por *H. pylori* y el uso de analgésicos no esteroideos (AINES). Bajo condiciones normales, existe un balance entre la secreción de ácido y las defensas de la mucosa, cuando este balance es roto se inicia el proceso de formación de una úlcera gástrica. Entre los factores agresores que contribuyen al rompimiento de este equilibrio, tenemos: AINES, infección por *H. pylori*, alcohol, sales biliares, ácido y pepsinas, todos estos alteran la mucosa permitiendo la difusión posterior de iones hidrógeno llevando subsecuentemente a un daño a las células epiteliales (1).

Actualmente la EUP representa una problemática a nivel mundial y se estima que globalmente existen 14.5 millones de personas afectadas con una mortalidad de 4.08 millones anuales (9). La prevalencia de la EUP es elevada, pues afecta al 10% de la población en algún período de la vida, con una prevalencia de úlcera activa en un momento determinado de 1% (10). La incidencia de úlceras gastroduodenales es de aproximadamente 1 a 2 personas por cada 1,000 habitantes por año (11). La úlcera gástrica era la forma más común de úlcera péptica en el siglo pasado (10). En los países occidentales, las úlceras duodenales ocurren más frecuentemente que las úlceras gástricas, siendo las primeras más frecuentes entre los 20 y 50 años de vida, y las segundas más frecuentes por encima de los 40 años de edad; dos tercios de los pacientes son masculinos y la enfermedad es más

frecuente en fumadores (11); en la actualidad la incidencia anual de úlcera gástrica es muy inferior a la de la úlcera duodenal, oscilando entre 0.3 y 0.4 por cada 1,000 habitantes

En el mundo, 14.5 millones de personas, padecen de úlcera péptica, con una mortalidad de 4.8 millones. El incremento en la insidencia, se debe los cambios en el estilo de vida, infecciones bacterianas y al uso tan extendido de los AINES de los cuales, se calcula que diariamente 30 millones de personas los consumen (9).

En un estudio llevado a cabo por Ramírez Ramos *et al* (12) en Perú se refiere de que durante el período de 1985 a 1999, la prevalencia tanto de úlcera gástrica y duodenal ha disminuido respectivamente del 3.15% al 1.62% y 5.05% al 2% (13). Mientras que en un estudio más reciente realizado por Teves P, *et al* también en Perú, reveló una prevalencia de úlcera péptica de 83.09 casos por cada 1000 endoscopías realizadas, además encontraron que la frecuencia de infección por *Helicobacter pylori* fue de 65.3%, siendo en los pacientes con úlcera duodenal de 74.3% y en los pacientes con úlcera gástrica de 55.4% (14). En México, Rodríguez Hernández *et al* (15) en su estudio determinaron una prevalencia de 8 y 12% para las úlceras duodenales y úlceras gástricas respectivamente y una incidencia anual del 6% para la úlcera péptica.

Enfermedad úlcero-péptica por etanol

No está claro el mecanismo por el cual el alcohol produce el daño a la mucosa, La resistencia del estómago a su propia auto-digestión por las enzimas que segrega se debe a la existencia de una barrera gástrica a la difusión del ácido luminal. Existe una etiopatogenia multifactorial en las lesiones que se producen en la mucosa gástrica debidas al alcohol, la primera consecuencia clínica de la alteración de esta barrera es el desarrollo de una gastritis aguda.

Estudios en voluntarios sanos han demostrado que tras una intoxicación alcohólica aguda se desarrolla una gastritis endoscópica con eritema, erosiones, petequias y exudado de la mucosa a las 6 horas siguientes en más del 80% de los casos (16), dicho daño en la mucosa produce áreas de hiperemia focal y hemorragia en las zonas afectadas, lo cual sugiere un papel fundamental en las alteraciones del flujo sanguíneo de la mucosa, que contribuye a la estasis sanguínea, incrementando la permeabilidad vascular, la liberación de mediadores de

la inflamación, la migración celular y finalmente la necrosis del tejido (17) dependiendo de la cantidad de etanol administrada, entre un 10 a 40 % de los estómagos de ratas y ratones, se cubren erosiones hemorrágicas y úlceras al ser examinados de 1 a 2 horas después de su administración .

Todavía no se conocen con exactitud cuáles son los mecanismos que utiliza el alcohol para producir las lesiones gástricas, los trabajos más recientes sugieren una hiperproducción de factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), aumento de la apoptosis e incremento de la peroxidación lipídica inducida por radicales libres (16).

La reversibilidad de la gastritis y la propensión a la hemorragia depende del grado de insulto de la barrera de la mucosa gástrica y de la concentración de ácido que entra en contacto con la mucosa lesionada (16). Diversos estudios muestran que la mayoría del daño gástrico aparece 1.3 minutos después de su instalación en el intestino y que la administración previa de agentes antiulcerosos (inhibidores de la secreción de ácido) como la Ranitidina, no poseen ningún efecto protector contra dicho daño (18)

Estas evidencias han permitido introducir el concepto de agentes citoprotectores los cuales reducen el efecto de la inducción de úlceras por otro mecanismo que no es la inhibición de la secreción de ácido (2). Entre estos agentes se encuentra el Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA por sus siglas en ingles), en un estudio llevado a cabo por Bertoli M², se determinó que el EDTA, ejercía un efecto de disminución en las lesiones, ya que el promedio del diámetro de la zona lesionada se veía reducido en aproximadamente 6 mm (ver Cuadro 1).

Secreción gástrica

La secreción ácida gástrica resulta de mecanismos sumamente complejos y estímulos múltiples interrelacionados, coordinados y finamente regulados. La producción y secreción de ácido en el estómago, permite la destrucción de microorganismos presentes en los alimentos; activa la pepsina, enzima que necesita de un pH ácido (entre 1,8 a 3,5) para

² Bertoli M, "Efecto del EDTA en un modelo de inducción de úlceras por Etanol" trabajo no publicado.

iniciar la digestión de las proteínas; y contribuye, químicamente, a la desintegración de los alimentos en sus componentes elementales, facilitando su absorción en la mucosa intestinal. Se puede iniciar por una variedad de factores, relacionados con la ingesta de alimento y el estado calórico del individuo. Siendo está regulada por diversos mecanismos nerviosos y humorales, que han permitido distinguir en ella tres fases: cefálica, gástrica e intestinal. En la fase cefálica están involucrados mecanismos regulatorios del sistema nervioso central (hipotálamo y bulbo raquídeo), mientras que en la fase gástrica e intestinal, están involucrados mecanismos periféricos, que incluyen elementos neuronales, hormonales, paracrinos y autocrinos (Figura 1).

Cuadro 1. Algunos factores involucrados en el daño a la mucosa gástrica inducidos por etanol (19).

-
- Disminución en la producción de moco gástrico
 - Incremento en la generación de radicales libres
 - Incremento en la difusión posterior del ácido
 - Disminución en la diferencia de potencial a través de la mucosa
 - Disminución en la motilidad gástrica
 - Disminución en la producción endógena de GSH
 - Aumento en la liberación de 5-hidroxiaminotriptamina
 - Aumento en la liberación de histamina
 - Aumento del eflujo de sodio y potasio
 - Aumento del influjo de calcio
 - Aumento en la producción de leucotrieno
 - Disminución en la producción de prostaglandina
 - Disminución del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica
 - Aumento de la isquemia
 - Aumento de la permeabilidad vascular
-

El ácido gástrico, es producido por las células parietales, en el estómago, esta producción es de un alto costo energético. Estas células son parte de las glándulas fúndicas epiteliales. El nivel de ácido, es mantenido por la bomba de protones H^+/K^+ ATPasa. La célula parietal libera bicarbonato en el proceso, elevando temporalmente el pH de la sangre, esto es conocido como marea alcalina.

Los iones cloruros y sodio son secretados activamente hacia el lumen del canáliculo, por el citoplasma de la célula parietal, esto crea en la membrana de la célula un potencial negativo de -40 mV a -10 mV, lo que causa que los iones de potasio y en menor cantidad

los de sodio se difundan del citoplasma al canalículo. La enzima anhidrasa carbónica, cataliza la reacción entre el dióxido de carbono y el agua, para formar ácido carbónico, el cual se disocia rápidamente en HCO_3^- y H^+ , estos últimos dejan la célula a través de un sistema antiporter, la bomba Na^+/K^+ ATPasa. La mayor parte del Sodio y el potasio, son reabsorbidos al citoplasma. Los iones Cl^- y Na^+ secretados, se mezclan en el lumen del canalículo.

La secreción gástrica, es regulada tanto por el sistema nervioso autónomo como por varias hormonas. La célula parietal, es estimulada a producir ácido, tanto por el sistema parasimpático como por la hormona gastrina, estos además de estimular directamente la producción de ácido, estimulan indirectamente, la producción de histamina por la célula enterocromafin. El péptido intestinal vasoactivo, la colesistoquinina, y la secretina inhiben la producción. Esta producción de ácido está estrechamente regulada tanto por retroalimentación positiva como negativa. Hay 4 tipos de células involucradas, parietales, C, D y enterocromafines.

A demás de estos, también existe una influencia significativa de las terminaciones del nervio vago y del plexo intramural del tracto digestivo. Las terminaciones nerviosas en el estómago, liberan acetilcolina y péptido liberador de gastrina, la acción de ambas es directa sobre la célula parietal, y mediada a través de la secreción de gastrina por las células G y de de histamina por las células enterocromafines.

La liberación de histamina es el regulador positivo más importante, en la secreción del ácido gástrico, su liberación es estimulada por la gastrina e inhibida por la somatostatina.

gástrica (Cuadro 2), de los cuales nos detendremos a estudiar detenidamente el flujo sanguíneo, ya que en años recientes estudios científicos han enfatizado el rol de flujo sanguíneo de la mucosa gástrica (FSMG) y en especial de la microcirculación, en la patogénesis del daño a la mucosa gástrica (2).

Aumento del flujo sanguíneo

Se cree que el aumento del FSMG, que ocurre cuando hay una hipersecreción gástrica, podría ser uno de los mecanismos por medio de los cuales la mucosa mantiene su integridad. Se ha demostrado que una reducción del 75% FSMG es necesaria para observar cualquier descenso significativo en equilibrio de la mucosa; en otro experimento Mersereau e Hinchey (2) demostraron que no se presentaban ulceraciones a una concentración de H⁺ de 25 µEq/L a menos que el flujo sanguíneo fuera eliminado totalmente. La isquemia por lo tanto va a exacerbar el efecto de los agentes que dañan la mucosa.

Cuadro 2. Factores defensores y agresores, cuya interacción puede determinar la patogénesis de la úlcera (19).

Factores agresivos	Factores defensivos
Pepsina	Óxido nitroso
Gastrina	Sulfridrilos
Proteasas	Gangliósidos
Radicales libres	Prostaglandina
Isquemia	Dopamina
Leucotrienos	Mucus
Dismotilidad	Bicarbonato
Etanol	SDO/ Catalasa
Nicotina	Flujo sanguíneo de la mucosa
AINES	Interleucina
Estrés	Poliamidas
Helicobacter pylori	

Difusión de iones H⁺

El daño a la mucosa gástrica, se ha visto asociado a una marcada difusión posterior de iones H⁺, cuando esto sucede hay un aumento en el FSMG, pero este se debe más que a la masa de iones hidrógeno, a la severidad de la lesión a la mucosa gástrica. Brugeman et al (2), en una muestra de estómago canino aislado, encontraron que posterior a la aplicación de 20 o 30 mM de ácido salicílico en 100 o 160 mN de HCL, había casi siempre a los 12 segundos una caída en la resistencia vascular periférica (RVP), que llegaba al 65% del valor control a los 7 minutos, este fenómeno no ocurría cuando el ácido salicílico, era diluido con solución salina normal a un pH de 2.2, pero la RVP volvió a caer cuando se diluyó nuevamente en una solución 160 mN. Se observa, que la integridad de la mucosa depende también de la innervación, ya que al inhibir la respuesta nerviosa, ya sea por denervación o agentes químicos, no existe este aumento del FSMG ya que no hay una retroalimentación de los mecanismos de respuesta ante la injuria.

Bicarbonato de sodio

Se ha demostrado en varios estudios, que el bicarbonato juega un papel importante en la protección de la mucosa gástrica, ya que al existir un aumento en la cantidad de iones hidrógeno, los niveles de bicarbonato en sangre se elevan. Los trabajos de Kivilaakso y Starling (2), demostraron la importancia del HCO₃⁻ y de la anhidrasa carbónica en el mantenimiento de la integridad de la mucosa, durante un shock hemorrágico, la administración intrarterial de una alta infusión de bicarbonato, eliminó completamente la acidosis y además previno la formación de úlceras debidas a un shock hemorrágico y a la instilación intragástrica de HCL 0.1N en ratas.

Modelos experimentales de inducción de úlceras

Anatomía del tracto digestivo del ratón de laboratorio.

Debido a que el presente estudio trata de los daños a la mucosa gástrica, nos detendremos particularmente en la anatomía del sistema gastrointestinal. el tracto intestinal puede dividirse de la siguiente manera: Esófago (4 cm), Duodeno, Yeyuno e Ileón (35 cm), Colon y Recto (14 cm). (20)

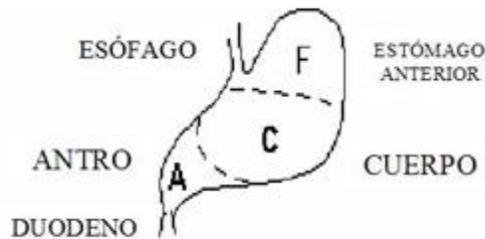


Figura 2. Regiones del estómago del ratón (vista ventral).

Como puede observarse el estómago se divide en dos grandes regiones, la cardiaca 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 por cambios macroscópicos visibles en la mucosa de ambas porciones.

Modelo de úlceras en ratones

Las características fisiológicas de la secreción gástrica tanto para humanos como ratones es muy similar, presentando inclusive secreción de ácido y pepsina con una distribución de los valores para pepsinógeno sérico tanto en humanos como ratones son similares. (21) . Es de hacer notar que de la misma forma que sucede en humanos, la formación de úlceras está determinada por factores genéticos propios de cada individuo (22).

En la figura 3³ podemos observar como el alcohol, genera un estrés oxidativo (OS) con la consiguiente liberación de radicales libres (FR), debido a una mala regulación en la bomba H⁺/K⁺ ATPasa, lo cual a su vez provoca un daño por OS en la mucosa, lo cual lleva finalmente a la disrupción de la mucosa; se ha visto que entre un 10 a 40 % de los estómagos de ratas y ratones, se cubren erosiones hemorrágicas y úlceras al ser examinados de 1 a 2 horas después de su administración.

³ Tomado de: Srikanta et al. "A novel phenol-bound pectic polysaccharide from *Decalepis hamiltonii* with multi-step ulcer preventive activity", disponible en: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/5196.pdf>.

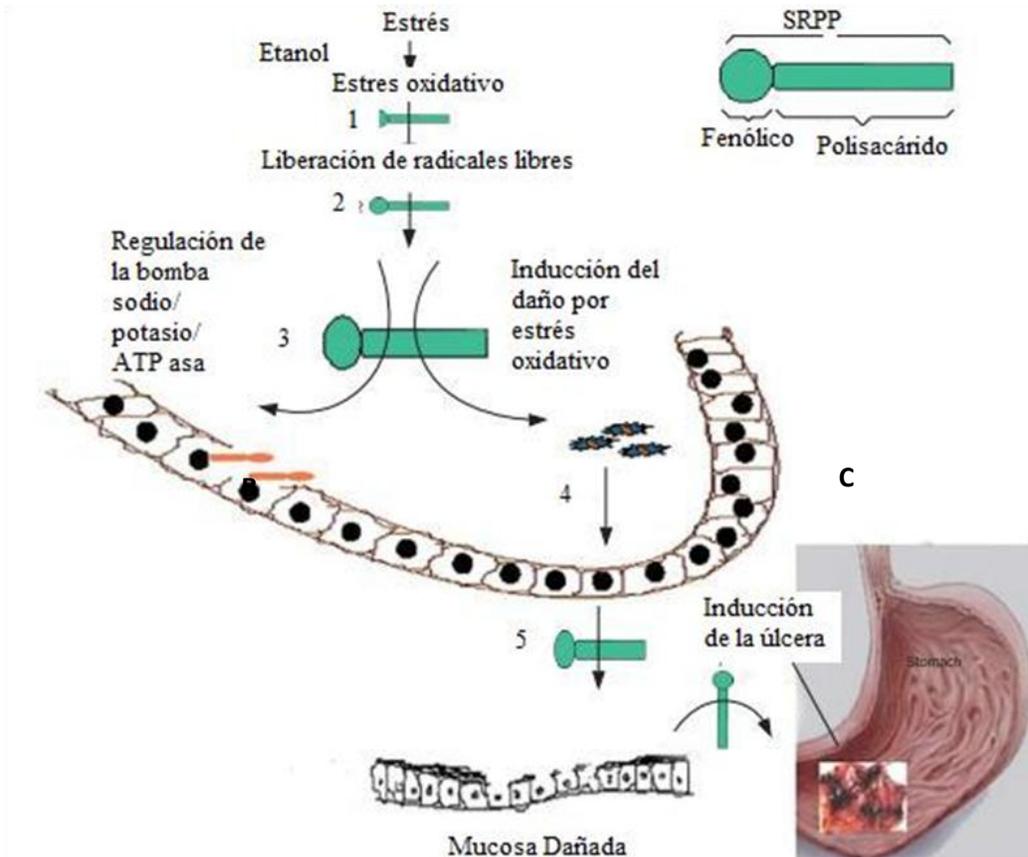


Figura 3. Mecanismo de inducción de úlceras por etanol en ratas.

Métodos para la cuantificación de úlceras inducidas experimentalmente

Métodos Macroscópicos

Existen varios métodos para cuantificar macroscópicamente el tamaño de las úlceras, entre estos tenemos, los cuantitativos no sistemáticos como lo son la suma de las longitudes de las lesiones o el índice de úlcera en el cual se multiplica el largo por el ancho de la úlcera para obtener su área. Como puede apreciarse, el problema de estos métodos es que debido a las formas irregulares que presentan las úlceras, hay áreas que se pierden (23).

También existen los métodos sistemáticos, en los cuales las muestras son colocadas en una lámina cuadrículada, midiendo así su tamaño, ya sea a simple vista o con un microscopio o estereoscopio, las desventajas de estos métodos son que si bien se obtiene una mejor

cuantificación del área, toman mucho tiempo, y en el caso del que emplea un estereoscopio, queda fuera del alcance de los laboratorios pequeños. (23).

Otro método muy innovador es el propuesto por Kahn H. (23), este se basa en el empleo del programa de manejo de imágenes *Scion Image Software* (accesible en http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm), evalúa la intensidad y la densidad del área hemorrágica de una imagen escaneada del estómago de ratones con úlceras inducidas por etanol e indometacina. El software asigna una cantidad determinada de píxeles⁴ por distancia lineal (PXL x mm), basándose en esto determina el tamaño del área afectada. Este método, ofrece la ventaja de tener muy bajo costo, y una alta eficacia para determinar el área afectada, por muy pequeñas que sean las lesiones.

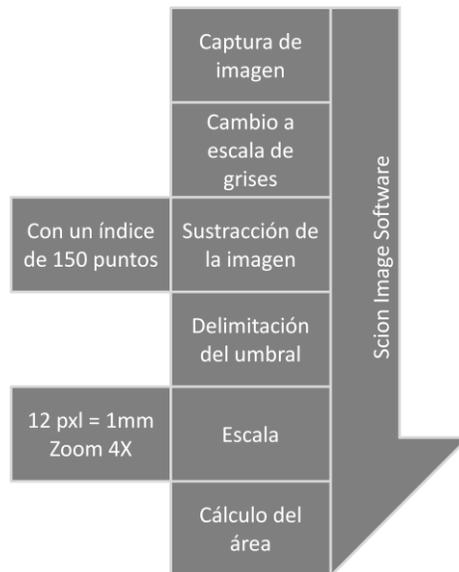


Figura 4. Pasos para el cálculo del área lesionada, con el programa Scion Image Software (accesible en http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm).

⁴ Un **píxel** o **pixel** (acrónimo del inglés *picture element*, "elemento de imagen") es la menor unidad homogénea en color que forma parte de una imagen digital, ya sea esta una fotografía, un fotograma de vídeo o un gráfico. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Píxeles>.

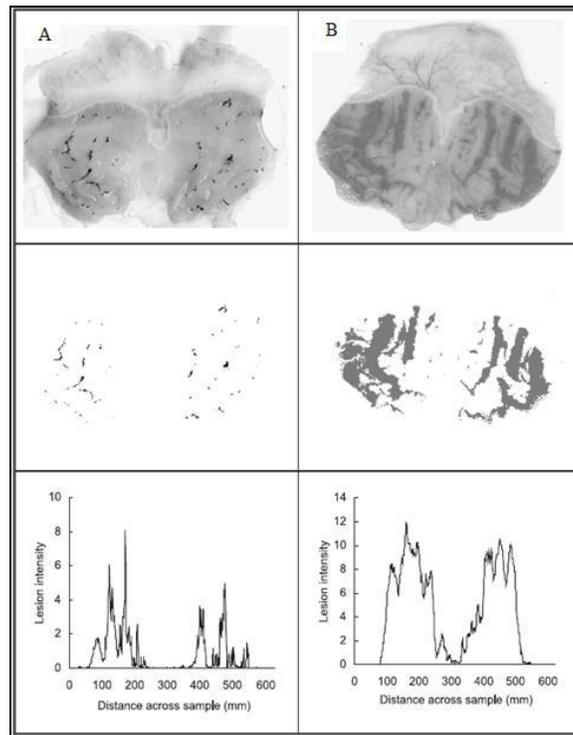


Figura 5. Imágenes escaneadas, de estómagos de ratón, con inducción de úlceras por indometacina (A) y etanol (B).

Métodos microscópicos

El estudio histopatológico de las lesiones se realiza fijando las biopsias en formalina al 5-10 %. Las muestras se incluyen en parafina durante 24 horas y se realizan los cortes en un micrótopo a 0.02 mm para su posterior fijación y tinción con eosina-hematoxilina.

Tratamiento de la úlcera péptica

En general el tratamiento de la úlcera-péptica se basa en medidas farmacológicas y no farmacológicas, entre las medidas no farmacológicas, se tiene (1):

1. Cambios en la dieta
2. Disminución en la ingesta de alcohol
3. Cese del fumado
4. Disminución de los condimentos en los alimentos
5. Disminución de las grasas en los alimentos

En cuanto a las medidas farmacológicas se tienen tres grandes grupos:

1. Antiácidos: que actúan disminuyendo la acidez estomacal por medio de una reacción de neutralización química del ácido entre estos tenemos por ejemplo al Hidróxido de Aluminio.
2. Anti H₂: Son medicamentos, que inhiben al receptor de histamina H₂, con lo cual se logra disminuir la producción de ácido, entre estos tenemos a la Ranitidina.
3. Inhibidores de la bomba de protones: Hasta el momento los más eficaces para el tratamiento, estos inhiben el funcionamiento de la bomba H⁺/K⁺/ATPasa, eliminando así la producción del ácido clorhídrico, entre estos tenemos al Omeprazol.

Cuando existe una infección por *H. pylori*, estos medicamentos se dan en combinación con antibióticos para erradicar dicha bacteria, siendo en general, una doble terapia de antibiótico en combinación con un inhibidor de bomba de protones. Cabe recordar que la mayoría de los medicamentos antiulcerosos están diseñados para disminuir la secreción de ácido ver Figura 3.

Robert (24) define el término citoprotección como la protección celular contra las lesiones por etanol, que ocurre en tejido por debajo del epitelio. Otros investigadores, para describir el fenómeno, mientras se desconozcan los mecanismos y objetivos de la citoprotección, prefieren el uso del término general organoprotección (por ejemplo gastroprotección).

Plantas medicinales con actividad antiulcerogénica.

La lista de compuestos obtenidos de plantas medicinales, que se usan en la medicina tradicional de varios países, porque poseen actividad antiulcerogénica es amplia. Por ello, las estructuras químicas y los mecanismos de acción propuestos para tales actividades son variados. Entre los compuestos estudiados, que poseen actividad sobre la úlcera gástrica o duodenal se encuentran flavonoides, triterpenos, diterpenos, alcaloides y glicósidos (25). La mayoría de los compuestos citoprotectores de origen vegetal ejercen su acción mejorando o favoreciendo los mecanismos de defensa de la mucosa gástrica, por ejemplo, aumentando la secreción de mucus o el nivel de prostaglandinas (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31).

Nim

Gar et al, describieron en 1993 el efecto antiulceroso del extracto de la hoja de Nim (*Azadirachta indica*), en ratas expuestas a un ambiente de frío por dos horas ó a las que se les dio alcohol por vía oral durante una hora. El extracto fue administrado en dosis de 10, 40 o 160 mg hoja/Kg de peso, ya sea en regímenes de una o cinco dosis pre tratamiento. La disminución de la severidad fue dependiente de la dosis en las ratas sujetas a estrés, y también disminuyó el daño en las tratadas con etanol. Aparentemente el extracto evitó la degranulación de las células caliciformes, y aumento la cantidad de mucus adherente en los animales sometidos a estrés (26).

Croton cajacura

Sauza-Brito et al, demostraron que la trans-Dehidrocrotonina (DHC), un diptireno aislado de la Croton Cajacura, fue útil en la citoprotección en diferentes modelos de inducción de úlceras en ratas. Una dosis de 100 mg/Kg de DHC, mostro un efecto antiulcerógeno en úlceras inducidas por hipotermia, estrés, etanol y ligadura pilórica. Por el contrario no hubo cambios significativos en el modelo de indometacina o modificaciones en los parámetros gástricos, como las paredes mucosas, razón de secreción, pH y contenido total del ácido, luego del tratamiento (30).

Cistus incanus

Attaguile et al, demostraron la actividad de las partes aéreas de *Cistus incanus*, en una solución acuosa, como gastroprotector en lesiones inducidas por agentes necrotizantes (HCL 1N y Etanol absoluto), indometacina, serotonina y reserpina. El extracto, contiene bioflavonoides, fue administrado por vía oral en dosis desde 0.25 a 0.50 g/Kg. Se determinó que presenta un efecto protector dependiente de dosis, en todos los modelos experimentales mencionados, y fue más efectiva contra la congestión mucosa y hemorragia causadas por reserpina y serotonina. Estos datos sugieren que los constituyentes activos del extracto crudo pueden ser responsables del efecto protector, debido a que mantienen una perfusión microvascular de la mucosa gástrica (27) (28).

El género *Indigofera*

El género *Indigofera* (Fabaceae) incluye especies de hierbas y arbustos que se encuentran principalmente en las regiones tropicales y subtropicales (32). Dentro de este género se encuentran diversas especies que comúnmente fueron conocidas lo largo de toda el área de

Mesoamérica como tinto, platanito, tinaco, añil de piedra, jiquelite, huiquiltil, haceoitli mahuitli, tlacecoitli, xiuquiltil, pitzauac y actualmente, como añil, índigo, añil de pasto, jiquilite o xiquilite, ti café, entre otras denominaciones (7).

Mucho se ha especulado sobre la procedencia del añil, atribuyéndole algunos un origen asiático y otros al área centroamericana, ya que las grandes culturas ancestrales (india, egipcia, romana y mesoamericana), hicieron gran uso del índigo o indiotina, el tinte que se obtiene a partir del procesamiento de alguna especie de *Indigofera* (7).

El añil es una planta herbácea, erecta de 1.5 – 1.8 m. de altura, poco ramificada, tallo angular, sub-leñoso y sus ramas se encuentran cubiertas con 10 o 12 hojuelas de color verde claro, dispuestas en pares regulares, como barba de pluma. Las flores son pequeñas de un color rojo claro y se encuentran en racimos de receptáculo también muy corto; su cáliz es gamosépalo de óvalos casi iguales, siendo los posteriores más cortos. La corola es papilionacea de pétalos sentados y soldados al androceo; la corona es erecta, obtusa, acuminada y está provista de un casco saliente. El fruto es una vainita cilíndrica, tetraedra, ligeramente comprimida y cuando está seca, puede ser un poco arqueada. Estas vainas contienen de 5 a 7 semillas ovaladas y oscuras. A pesar de no existir una caracterización edafoclimática que limite la frontera agrícola de este cultivo, la experiencia de los productores indican que los suelos pedregosos, de baja fertilidad, con pendientes desde fuertes a moderadas, de textura arcillosa – franco arenosa, arenas volcánicas, talpetate y con altas temperaturas, son muchas de las características que pueden garantizar altos rendimientos de añil. (6).

Muchos son los usos que se le han dado al añil, utilizándose como colorante en textiles, cerámica y murales, papel, madera, corcho y fibras naturales, además de pintura para niños, alimentos, cosméticos y usos medicinales (6).

Actualmente existen diversos estudios que demuestran sus diversas propiedades terapéuticas entre las que cabe mencionar: antimicrobiano (33), antifúngico (3), hepatoprotector (34), anticancerígeno (35) y citoprotector (8); con respecto a este último

efecto, Cola-Miranda utilizando un extracto metanólico de *Indigofera truxillensis* demostró que dosis de 250, 500 y 1,000 mg de este compuesto inhibían la aparición de úlceras gástricas en modelos de úlceras inducidas por etanol, AINE, estrés y ligadura pilórica, que este efecto era directamente proporcional a la dosis y que podría estar ligado a la presencia de flavonoides presentes en esta especie, además de esto no encontraron efectos tóxicos agudos con la utilización de este compuesto.

Objetivos

General:

- Determinar la actividad citoprotectora de extractos acuosos de *Indigofera suffruticosa* e *Indigofera guatemalensis* en modelos de úlceras gástricas inducidas por etanol en ratones.

Específicos:

- Estandarización del modelo de úlceras gástricas en ratones, inducidas por administración de etanol
- Validación del método de análisis digital de imágenes en modelo de úlceras gástricas inducidas por administración de etanol en ratones
- Caracterizar espectrofotométricamente los extractos de *Indigofera suffruticosa* e *Indigofera guatemalensis*
- Determinar si los extractos acuosos de *Indigofera suffruticosa* e *I. guatemalensis* poseen efecto citoprotector en un modelo de úlceras gástricas inducidas por etanol en ratones mediante estudio histopatológico
- Determinar si un extracto acuoso de *I. suffruticosa* y otro de *I. guatemalensis* poseen efectos citoprotectores similares en el modelo de úlceras producidas por etanol, mediante la cuantificación digital del área de las lesiones

Delimitación del tema

El presente estudio experimental pretende demostrar la actividad citoprotectora de *Indigofera guatemalensis* y *suffruticosa* en la mucosa gástrica, debido a la necesidad de comprobar de manera científica y con bases bien fundamentadas la eficacia de diferentes métodos terapéuticos que no representen alto costo, que sean de fácil acceso, con el fin de obtener una terapéutica accesible que en nuestro país, pudiese servir tanto como monoterapia ó terapia complementaria para los pacientes que no pueden tener acceso a los medicamentos considerados como estándares para el tratamiento de la enfermedad úlcero-péptica.

El modelo a emplear es el de daño a la mucosa gástrica por etanol, y la cuantificación de las lesiones se realizará mediante de medición del área por medios ópticos (23) y con análisis histopatológico.

A demás las pruebas estadísticas a emplear, pretenden asegurar una adecuada correlación entre el grado de lesión de la mucosa y el de protección de los extractos para determinar el grado de citoprotección que se logra.

Con ello se pretende hacer énfasis en la importancia de la medicina natural como alternativa terapéutica, ya que muchas veces entre las objeciones que se encuentran para su uso son la escasez en la evidencia científica y la dificultad de desarrollar estudios científicos acerca de productos naturales.

Hipótesis

Hipótesis de trabajo:

- Existe un efecto de tipo citoprotector al utilizar extractos acuosos de *Indigofera guatemalensis* o *Indigofera suffruticosa* en modelos experimentales de inducción de úlceras gástricas por etanol.

1- H₀ No Existen diferencias entre los grupos ETOH, Ayuno y Sano en las variables macroscópicas y microscópicas de evaluación de lesiones producidas por etanol

H₁ Existen diferencias entre los grupos ETOH, Ayuno y Sano en las variables macroscópicas y microscópicas de evaluación de lesiones producidas por etanol

2- H₀ No. Existen diferencias entre los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 en las variables macroscópicas y microscópicas de evaluación de lesiones producidas por etanol

H₁ Existen diferencias entre los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 en las variables macroscópicas y microscópicas de evaluación de lesiones producidas por etanol

Metodología

Tipo de estudio:

Experimental, controlado.

Población

Se utilizaron para el estudio ratones heterocigotos derivados de la línea de ratones albinos suizos adultos⁵, de ambo sexos, criados en las instalaciones del laboratorio de la Universidad Dr. José Matías Delgado en un ambiente de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con una temperatura de 27°C. La dieta fue dada base de comida para perro marca KNINO⁶ y agua *ad libitum*.

⁵ Mayores de 6 semanas

⁶ Que provee un estimado de 27g. de proteínas, 11g. de grasa y 3g. de fibra por porción.

Muestra

Estandarización de modelo

n= 15

Se dividieron en 3 grupos de 5 ratones cada uno de la siguiente forma: inducción de úlceras por etanol, control de mucosa gástrica normal y control de mucosa gástrica después de 24 h de ayuno.

Grupos experimentales n= 60

Se dividieron en cuatro grupos experimentales de 5 ratones cada uno, para un total de 20 ratones por experimento. El cual fue repetido en 3 ocasiones para completar el número total de la muestra. Se añadieron 5 ratones sanos para comparación.

Criterios de inclusión:

- Ratones albinos suizos mayores de 6 semanas.
- Ratones albinos suizos de ambos sexos
- Ratones con 24 horas o más de ayuno

Criterios de exclusión:

- Animales con malformaciones evidentes.
- Ratones del sexo femenino que se encuentren en cualquier etapa de embarazo.
- Ratones que mueran durante cualquier fase del experimento antes de su sacrificio por dislocación cervical.

Diseño experimental

Los ratones seleccionados al azar, fueron transferidos a jaulas anticoprofágicas 24 horas antes de los experimentos, en condiciones de ayuno y suministro de agua *ad libitum*. Teniendo en cuenta la distribución de los cuadros 1 y 2

Cuadro 3. Estandarización de modelo

Nombre grupo	Descripción del grupo	Intervención
Grupo ETOH	Grupo de inducción de úlceras gástricas con etanol	24 h ayuno 200 µl Etanol durante 60 min.
Grupo A	Grupo control de mucosa gástrica normal	
Grupo S	Grupo control de mucosa gástrica después de 24 h de ayuno	24 h ayuno

Cuadro 4. Grupos experimentales.

Nombre grupo	Descripción del grupo	Intervención
Grupo 1 n=5	Control positivo de inducción de úlceras inducidas por ETOH	24 h ayuno 200 µl ETOH durante 60 min
Grupo 2 n=5	Control positivo de efecto citoprotector	24 h ayuno 100 µl de EDTA 60 min, seguidos de 200 ul ETOH
Grupo 3 n=5	Grupo Experimental Extracto <i>I. sufructicosa</i>	24 h ayuno 100 µl de extracto 60 min, seguidos de 200 ul ETOH
Grupo4 n=5	Grupo Experimental Extracto <i>I.guatemalensis</i>	24 h ayuno 100 µl de extracto 60 min, seguidos de 200 ul ETOH
Grupo 5 n=5	Grupo control de mucosa gástrica normal	

Todas las intervenciones del cuadro 4, a excepción del grupo 5, ser realizaron 3 veces para obtener el número total de la muestra a estudiar.

Cuadro 5. Operativización de variables.

Variable	Definición conceptual	Dimensiones	Indicadores
Edad	Número de semanas transcurridas desde el nacimiento de cada ratón hasta la fecha de su estimación, tomando como una semana el transcurso de 7 días completos	Semanas	Número de semanas
Dosis	Cantidad de fármaco u otras sustancias que se administra en una vez.	Microlitros, µl	µl de extracto administrados µl de Solución de EDTA µl de Etanol
Espectro de absorción de luz	Todos los posibles niveles de energía que la luz puede tomar y que son percibidos por un espectrofotómetro	Valores de absorvancia obtenidos del espectro de luz visible	Valor de DO reportado por el espectrofotómetro

Variable	Definición conceptual	Dimensiones	Indicadores
Área total de las lesiones	Es la sumatoria de la extensión o superficie de todas las lesiones producidas. Analizadas con Scion Image	Milímetros cuadrados	Cantidad total de milímetros cuadrados
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
Índice de lesiones	Valor que se obtiene dividiendo el área total de lesiones entre el área media	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	Total de la Suma de las cruces de los hallazgos histopatológicos.	Unidades arbitrarias (0-9)	Entre mayor sea la suma mayor el grado de lesión
Porcentaje de protección	$100\% - \left(\frac{\text{var grupo exp.}}{\text{var en grupo 1}} \times 100 \right)$	%	Diferencia de porcentajes entre el grupo control positivo de lesión y el grupo experimental
Edema	Acumulación anormal de líquido en el espacio intersticial de los tejidos.	Cruces	+ Edema leve ++ Edema moderado +++ Edema severo
Hiperemia	Aumento de la sangre en una parte del cuerpo, causada por un aumento del flujo sanguíneo, como en la respuesta inflamatoria, por relajación local de las arteriolas o por obstrucción del	Cruces	+ Hiperemia leve ++ Hiperemia moderada +++ Hiperemia severa

Variable	Definición conceptual	Dimensiones	Indicadores
	flujo de retorno de la sangre desde un área.		
Erosión	Gradual destrucción por desgaste de una superficie, como la de una mucosa o la de la epidermis, como consecuencia de un proceso inflamatorio, lesiones u otros efectos.	Cruces	+ Erosión leve ++ Erosión moderada +++ Erosión Severa

Cuadro 6. Definiciones operacionales.

	Definición
Antiulceroso	Medicamento que protege la mucosa gástrica de erosión, por medio del control de la secreción de iones hidrógeno
Organoprotector	Compuesto que protege un órgano de daño por erosión.
Gastroprotector	Compuesto que protege la mucosa estomacal.
Citoprotector	Compuesto que proteja las células por debajo del epitelio de la mucosa gástrica.

Aspectos Éticos

El tratamiento que se les dio a los animales estuvo basado en el documento “Elementos esenciales para investigación animal, una guía para la investigación personal” del Centro de Información del Bienestar Animal del Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América⁷ y a su vez en el Acta de Bienestar Animal (AWA); provocando el mínimo dolor posible para los ratones tanto en la aplicación de los medicamentos como en el método utilizado para su sacrificio previo a la autopsia y extracción del estómago y demás órganos utilizados para el estudio histopatológico posterior. Los animales para el estudio fueron

⁷ <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/noawicpubs/essenti2.htm>

separados durante su crianza en grupos dependiendo de su sexo (hembras y machos), con el fin de evitar la reproducción entre ellos y así excluir la posibilidad de trabajar con hembras en gestación; sólo durante el tiempo de duración de los experimentos fueron colocados juntos por 24 horas sin distinción, con el fin de elegir de forma aleatoria el sexo los animales para cada uno de los modelos de producción de úlceras gástricas.

Obtención del extracto de plantas

Se utilizaron las hojas de *Indigofera guatemalensis* e *Indigofera suffruticosa*, las cuales fueron provistas por el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), a partir de una plantación con fecha de siembra en mayo de 2006 proveniente del valle de Zapotitán en el municipio de Ciudad Arce, La Libertad, y en la cual se utilizó como abono la fórmula 16-20-0,N-P-K y Sulfato de Amonio al 21% de nitrógeno, dichos especímenes fueron cosechados la primera semana de marzo del presente año.

Con el fin de obtener dos extractos acuosos distintos se utilizarán 500g. de hojas en fresco que se someterán a una decocción ⁸ durante 30 min en 300 mL de agua destilada. El extracto acuoso será decantado y el líquido será colocado en frascos para su utilización. De estos extractos se administraran a los ratones 100 µL en forma intragástrica.

Caracterización del Extracto

A cada extracto se le realizó un espectro de absorción, midiendo su absorbancia en el rango de la luz visible de 400 a 700 nm utilizando un espectrofotómetro.

Procedimientos experimentales

Estandarización del modelo de inducción de úlceras gástricas por ETOH

Se utilizó una n de 5 ratones por cada modelo experimental, con el fin de evaluar si el método que aplicamos en nuestro laboratorio era eficaz para la producción de úlceras gástricas en los animales de experimentación y de esta manera, evitar sesgos que pudieran reflejar falsos positivos con el uso de alguno de los extractos, derivados de fallas en la técnica de inducción de apareamiento de úlceras gástricas.

Después de las 24 horas de ayuno, se administraron 200µL de etanol al 99% de forma intragástrica, por medio de una cánula oral. El grupo ETOH, fue sacrificado por

⁸ Consiste en la colocación de las partes de la planta en agua a temperatura ambiente y luego llevarlas a punto de ebullición.

dislocación cervical, una hora después de la administración del etanol. Los grupos Ayuno y Sano, fueron sacrificados sin provocación de lesión gástrica (ver Cuadro 3).

Evaluación del efecto citoprotector

Se utilizaron 4 grupos, en los cuales se realizó la comparación de los extractos de Indigófera con un compuesto de propiedades citoprotectoras comprobadas, como lo es el EDTA⁹. Durante las 24 horas previas a la inducción de las úlceras por administración de etanol, los animales fueron escogidos al azar con respecto al sexo y se mantuvieron en jaulas anticoprofágicas, en ayuno y acceso de agua *ad libitum*.

Una hora previa a la administración de etanol se manejó cada grupo (ver Cuadro 4) de la siguiente manera:

- Grupo 1: Control de lesión
 - Grupo 2: Solución estéril de EDTA 0.01uM, 100µL de una forma intraperitoneal
 - Grupo 3: Extracto acuoso de *I. suffruticosa* a 100 µl
 - Grupo 4: Extracto acuoso de *I. guatemalensis* a 100 µl
- } Intragástrica

Una hora después de la administración de cada uno de los compuestos, se administraron 200µL de etanol al 90% de forma intragástrica oral, luego de una hora los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, para el análisis de las muestras.

Métodos de recolección y análisis de muestra

Extracción del estómago

Se realizó una incisión de laparotomía abdominal, se extrajo el estómago de cada animal, pinzando el cardias y el píloro, realizando luego la gastrectomía. El estómago se seccionaba a lo largo de la curvatura mayor para su observación, éste era lavado con solución salina normal y colocado sobre papel plástico transparente, para su análisis (Ver Figura 6).

⁹ Método utilizado por Bertolli M. en “Efecto del EDTA en un modelo de inducción de úlceras por etanol”, trabajo no publicado.

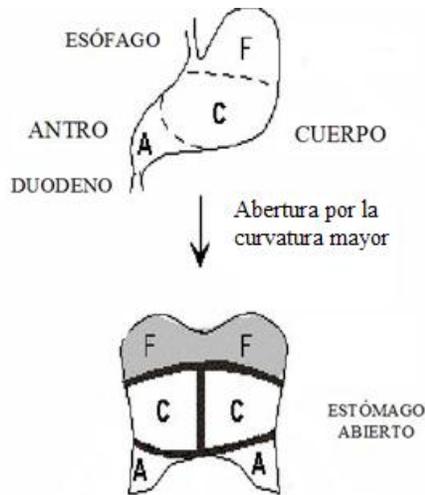


Figura 6. Diagrama de ubicación y gastrectomía del estómago de ratón.

Análisis macroscópico

Digitalización de imágenes

Los estómagos colocados en el papel transparente, fueron colocados en un escáner marca Epson modelo Stylus TX 160, el cual estaba previamente calibrado en modo profesional en una resolución de 600 dpi para la obtención de las imágenes. Dicha imagen se archivó en formato TIFF codificándola según el grupo y número de ratón en una base de datos (ver Figura 7).

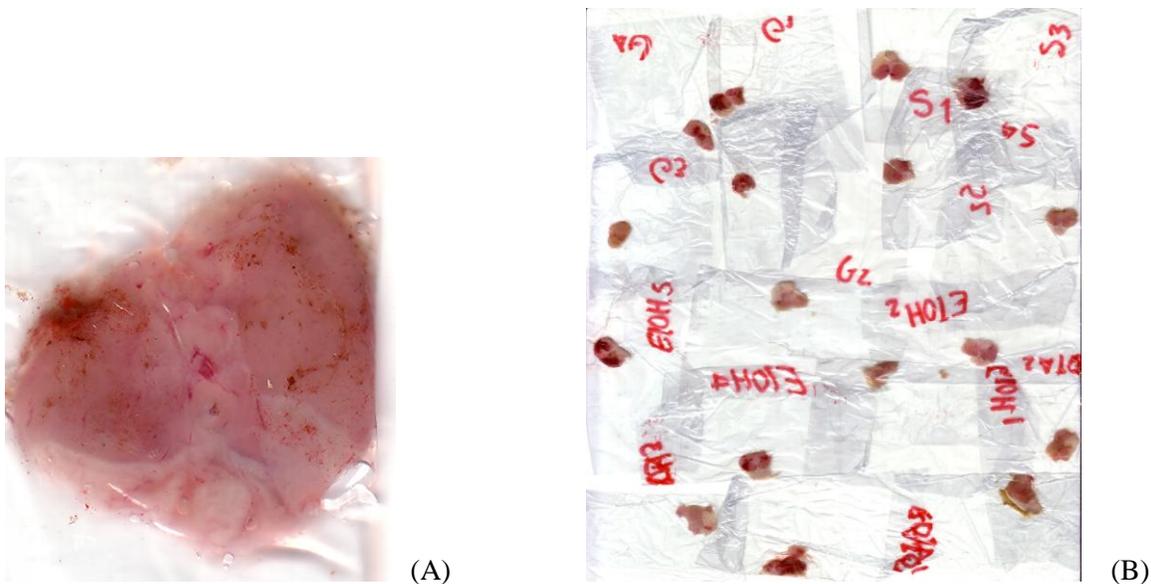


Figura 7. Imágenes digitalizadas. (A) Imagen de estomago guardada en archivo. TIFF para su análisis, (B) Vista panorámica de las muestras de un experimento

Análisis digital de imágenes

Este análisis se realizó utilizando el programa Scion Image Software (accesible en http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm), según el procedimiento descrito por Khan *et al.* (23). Luego de capturar la imagen se procedía el análisis en software antes mencionado, con los siguientes parámetros: Índice de sustracción de -150 puntos, y una calibración de 12 pixeles = 1mm a un aumento de 4X.

Análisis microscópico

Posteriormente a la digitalización de las imágenes los estómagos, estos fueron fijados en formalina al 10% y enviados al laboratorio de patología del Dr. José Nicolás Astacio Soria, quien determinó microscópicamente la presencia o no de lesión, y clasificó el tipo de lesión observada por medio de un sistema de 1-3cruces, en una escala de tipo creciente con relación a la gravedad de la lesión, del área de hiperemia, edema y necrosis individualmente medidas (ver Cuadro de Variables de Estudio).

Plan de análisis de datos

El almacenamiento de datos se realizó mediante una base creada en Microsoft Excel 2007 para Windows XP.

El análisis estadístico, se realizó con el programa SPSS 16.0 realizando las siguientes pruebas:

- Prueba de normalidad
- Prueba de Kolmogorov-Smirnov
- ANOVA
- Prueba Levene
- Prueba Duncan

Resultados.

Caracterización espectrofotométrica de los Extractos de *Indigofera sufruticosa* e *Indigofera guatemalensis*.

Como se puede observar en la gráfica, las composiciones químicas de ambos extractos son similares, y se caracterizan por tener una gran variedad de sustancias coloreadas características de los extractos vegetales, que absorben la luz entre los 400 y 700 nm, observándose un pico característico que se forma a los 480 nm en ambos extractos (Figura 8). Es importante que en todas las preparaciones realizadas siempre *I. guatemalensis* tuvo un mayor rendimiento en la extracción respecto a *I. sufruticosa* lo cual se podía notar por la intensidad del color café del rojizo del extracto.

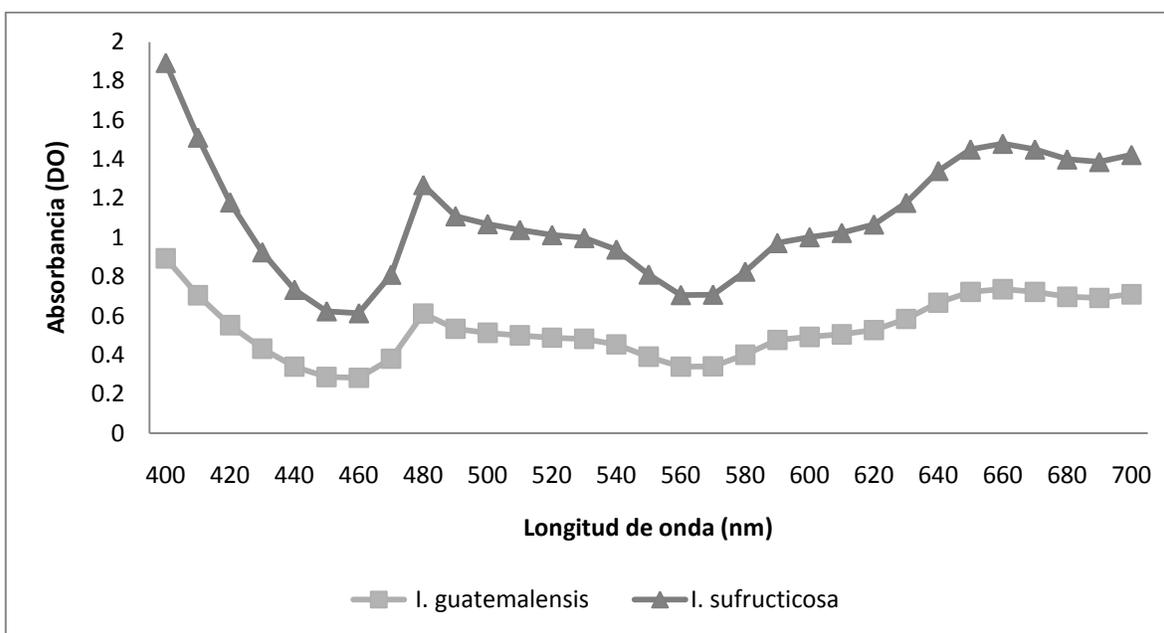


Figura 8. Espectro de absorción de los extractos acuosos *Indigofera sufruticosa* e *Indigofera guatemalensis*

Estandarización del modelo de inducción de úlceras por Etanol en ratones

En el cuadro 7, se observan los resultados de la estandarización del modelo, el cual se realizó con una n=16, excepto en la evaluación histopatológica, donde se excluyó al grupo S por reportes histopatológicos perdidos. En cuanto a la formación de lesiones gástricas, tanto en área de la lesión (evaluación macroscópica), como en la intensidad de la lesión (evaluación microscópica), en el grupo ETOH, comparado con los grupos A y S, se

observaron diferencias significativas con valores de p menores de 0.05 (Figura 9). Las variables área media e índice de lesiones resultaron no ser significativas en cuanto al modelo de inducción de úlceras por etanol de forma aguda, ya que no se observaron diferencias entre ninguno de los grupos.

Cuadro 7. Análisis de variable para la estandarización del modelo de inducción de úlceras por etanol

	Grupos estandarización	N	Rangos medios	P-valor
Área total Modelo (macroscópica)	Grupo ETOH	5	13.20	0.027*
	Grupo A	5	5.80	
	Grupo S	6	6.83	
	Total	16		
Área media Modelo (macroscópica)	Grupo ETOH	5	11.20	0.304
	Grupo A	5	7.60	
	Grupo S	6	7.00	
	Total	16		
Índice de lesiones (macroscópica)	Grupo ETOH	5	10.20	0.593
	Grupo A	5	7.20	
	Grupo S	6	8.17	
	Total	16		
Intensidad lesiones (microscópica)	Grupo ETOH	5	7.50	0.018*
	Grupo A	5	3.50	
	Total	10		

*Diferencia estadísticamente significativa con $\alpha=0.05$, por prueba de Krus-Kall-Wallis

A pesar de la significancia de las áreas de las lesiones inducidas, es importante señalar el efecto de los factores protectores frente a un factor agresor como el etanol, observándose la variación de magnitud en el área de lesión (ver Figura 9).

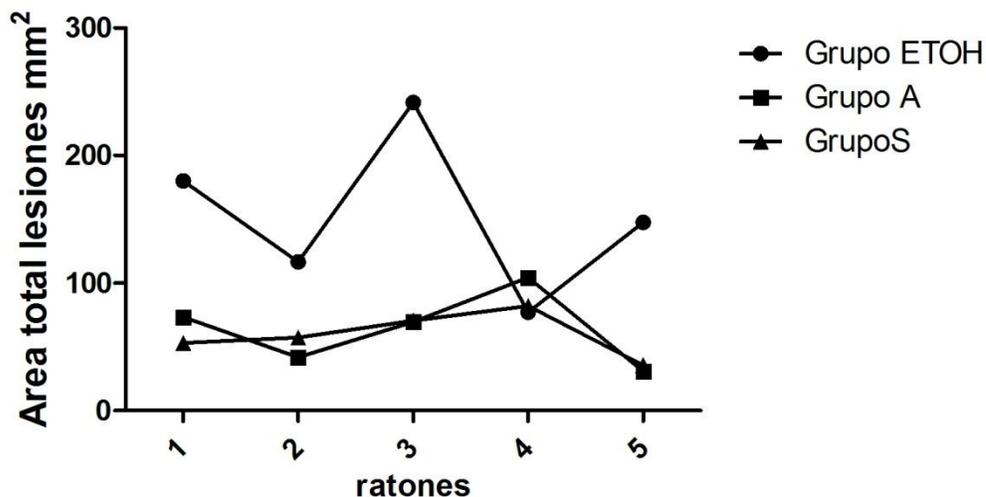


Figura 9. Variabilidad en el área de las lesiones producidas en la mucosa gástrica por etanol¹⁰.

Características histopatológicas de las lesiones inducidas por el etanol en la mucosa gástrica de los ratones

Como puede apreciarse en la Figura 10, las lesiones inducidas por el etanol se caracterizaron por una marcada hiperemia en la mucosa, así como también áreas de erosión. Además es de notar la ausencia de infiltrado inflamatorio, ya que este es un proceso agudo.

Evaluación de efecto gastroprotector de los extractos de *Indigofera suffruticosa* e *Indigofera guatemalensis*

Esta etapa se realizó en un total de 58 ratones, los cuales estaban distribuidos como lo indica el cuadro 2, se analizaron a demás 5 ratones sanos como controles normales. En los grupos 3 y 4 falleció una unidad experimental debido a regurgitación del etanol por lo que fueron excluidos del estudio.

Evaluación de variables

Como puede observarse en el Anexo II, únicamente el grupo 4 presenta valores mínimos y máximos inferiores al resto de grupos, con respecto al área de lesión, los cuales son ligeramente superiores al grupo de sanos.

¹⁰ Grupo 1: ETOH, Grupo 2: ETOH + EDTA, Grupo 3: ETOH + *I. suffruticosa*, Grupo 4: ETOH + *I. guatemalensis*, Grupo 5: Sanos

Los datos obtenidos del análisis macroscópico de las lesiones en los grupos experimentales se compararon mediante un prueba prueba de normalidad (ver anexo), como podemos apreciar en la Cuadro 8, las cuales fueron no significativas con $p > 0.05$.

Debido a la dispersión de los datos, que puede ser producto tanto de los factores genéticos como de los protectores de la mucosa gástrica, después de observar la tendencia de los resultado hacia un efecto protector de los extractos, por lo cual se decide realizar una prueba de Levene, al determinar que las varianzas son homogéneas, se puede asumir que realmente existía una diferencia entre los grupos y se realizó la Prueba de Duncan con un nivel de confianza $\alpha = 0.10$, lo cual se decidió hacer, debido a la imposibilidad de aumentar el número de la muestra.

Cuadro 8. Resultados de la prueba ANOVA¹¹

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Área total experimento	Entre grupos	22074.112	4	5518.528	1.783	0.145
	En los grupos	173358.479	56	3095.687		
	Total	195432.591	60			
Área media experimento	Entre grupos	463.528	4	115.882	0.678	0.61
	En los grupos	9570.926	56	170.909		
	Total	10034.454	60			
Índice de lesiones	Entre grupos	22.88	4	5.72	1.385	0.251
	En los grupos	231.362	56	4.131		
	Total	254.242	60			

Diferencias estadísticamente no significativas, con un $\alpha=0.05$, corrobora asumiendo normalidad de variable y homogeneidad de varianza

¹¹ Grupo 1: ETOH, Grupo 2: ETOH + EDTA, Grupo 3: ETOH + *I. suffruticosa*, Grupo 4: ETOH + *I. guatemalensis*, Grupo 5: Sanos

Cuadro 9. Subconjuntos con base al Área total y porcentajes de protección

Grupos experimentales	N	Subconjuntos $\alpha = 0.10$		
		1	2	% de Protección
5	11	68.0327		
4	12	83.3542	83.3542	23.5
3	10	91.0900	91.0900	16.4
1	15	109.0300	109.0300	0.00
2	13		121.9785	-11.9
Significancia		.105	0.127	

Se muestran las medias para los subgrupos homogéneos calculadas por la prueba de Duncan
Diferencia estadísticamente significativa por prueba de Duncan, $\alpha=0.05$

Como puede verse en el cuadro 10 en cuanto a la intensidad de las lesiones el grupo tratado con EDTA presentó una protección mayor que los grupos tratados con extracto de *Indigofera*.

La prueba de Duncan, permite determinar diferencias entre medias, en el cuadro 9 se puede observar que existen diferencias entre el grupo 5 (Sanos) y el grupo 2 (EDTA), cuando se compara esto con el índice de lesión, podemos ver que el porcentaje de protección del EDTA fue de -11.9 (aumento de lesión). En los grupos experimentales, tratados con extractos no se aprecian diferencias significativas. Sin embargo, al observar el porcentaje de protección con respecto al grupo de sanos, se observa que el extracto de *I. guatemalensis* y el de *I. suffruticosa*, presentan respectivamente un porcentaje de protección de 23.5 y 26.4 respectivamente.

Análisis microscópico

Según el análisis histopatológico, no se encontró ninguna muestra en la cual existiera necrosis, sin embargo, hay que destacar que el patólogo reportó en todos los estómagos de los sujetos sanos y con ayuno, hiperemia, edema y erosiones leves. Las cuales según la validación del modelo resultaron ser diferentes con el grupo de inducción de úlceras Ver figura 10.

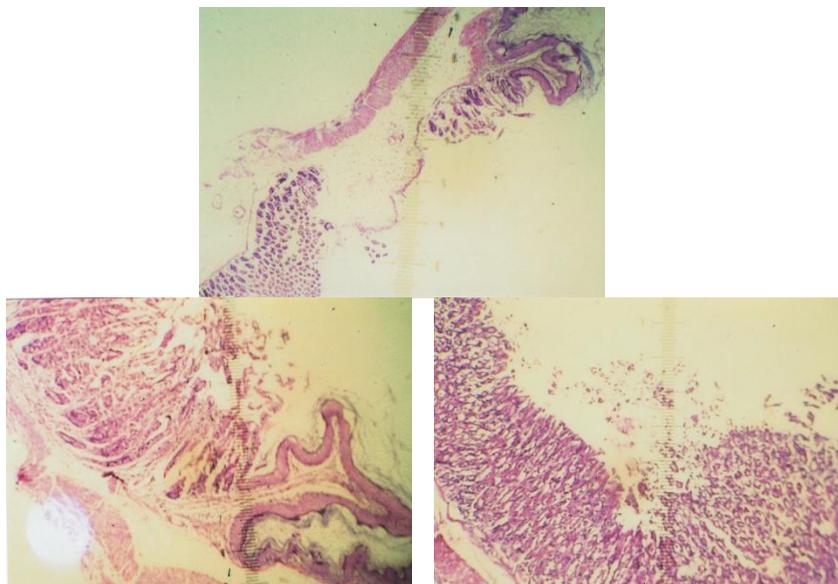


Figura 10. Cambios histopatológicos de los estómagos de ratón.

Hiperemia, edema y erosión

El grupo EDTA, fue mejor en cuanto a la cito protección, ya que como se observa en la figura 13C, este grupo no presenta lesiones moderadas o graves. Por el contrario, observamos nuevamente la relación inversa que existe con los extractos de *Indigofera*, ya que estos presentan un comportamiento gastroprotector, ya que tanto el edema como la hiperemia, fueron menores en estos grupos.

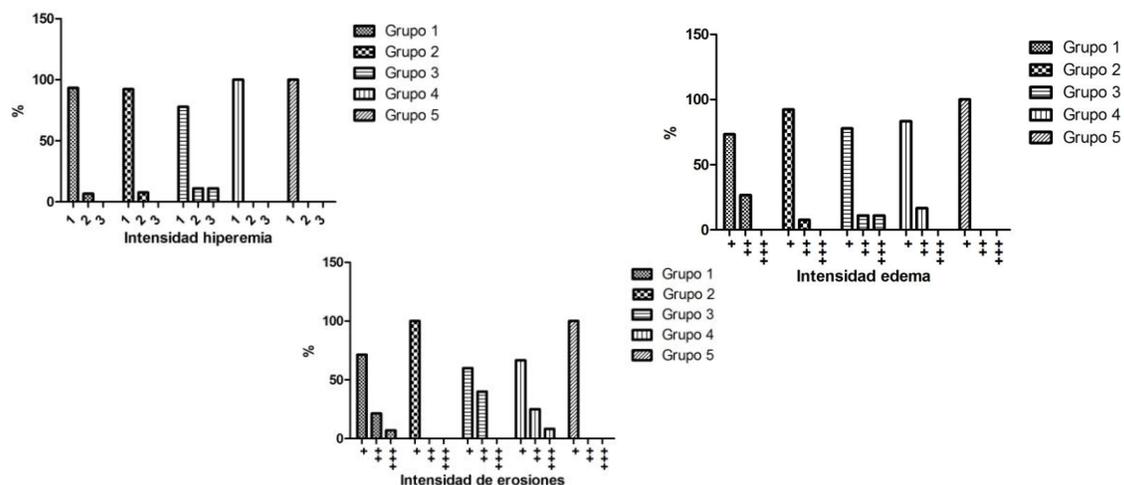


Figura 11. Gráficas del reporte histopatológico, A) Hiperemia, B) Edema y C) Erosión.

Al obtener la distribución de frecuencias y normalidad, se puede apreciar más clara mente la relación de protección de cada grupo (ver Figura 12).

Cuadro 10. Medidas de tendencia central, para la variable intensidad de la lesión.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
N	15	13	10	12	6
Media†	3.6	3.1538	3.8	3.5833	2.8333
Error Std. Media	0.23503	0.15385	0.61101	0.2599	0.16667
Mediana	3	3	3	3	3
Moda	3	3	3	3	3
Desviación Std.	0.91026	0.5547	1.93218	0.90034	0.40825
Varianza	0.829	0.308	3.733	0.811	0.167
Asimetría	0.315	3.606	1.16	1.048	-2.449
Error Std. Asimetría	0.58	0.616	0.687	0.637	0.845
Rango	3	2	7	2	1
Mínimo	2	3	1	3	2
Máximo	5	5	8	5	3
Percentil 60 ‡	4	3	3.6	3	3

† Diferencias Estadísticamente no significativas , $\alpha=0.05$ por prueba de Kruskal-Wallis

‡ Utilizando un máximo de inducción de lesione por grupo del 60%

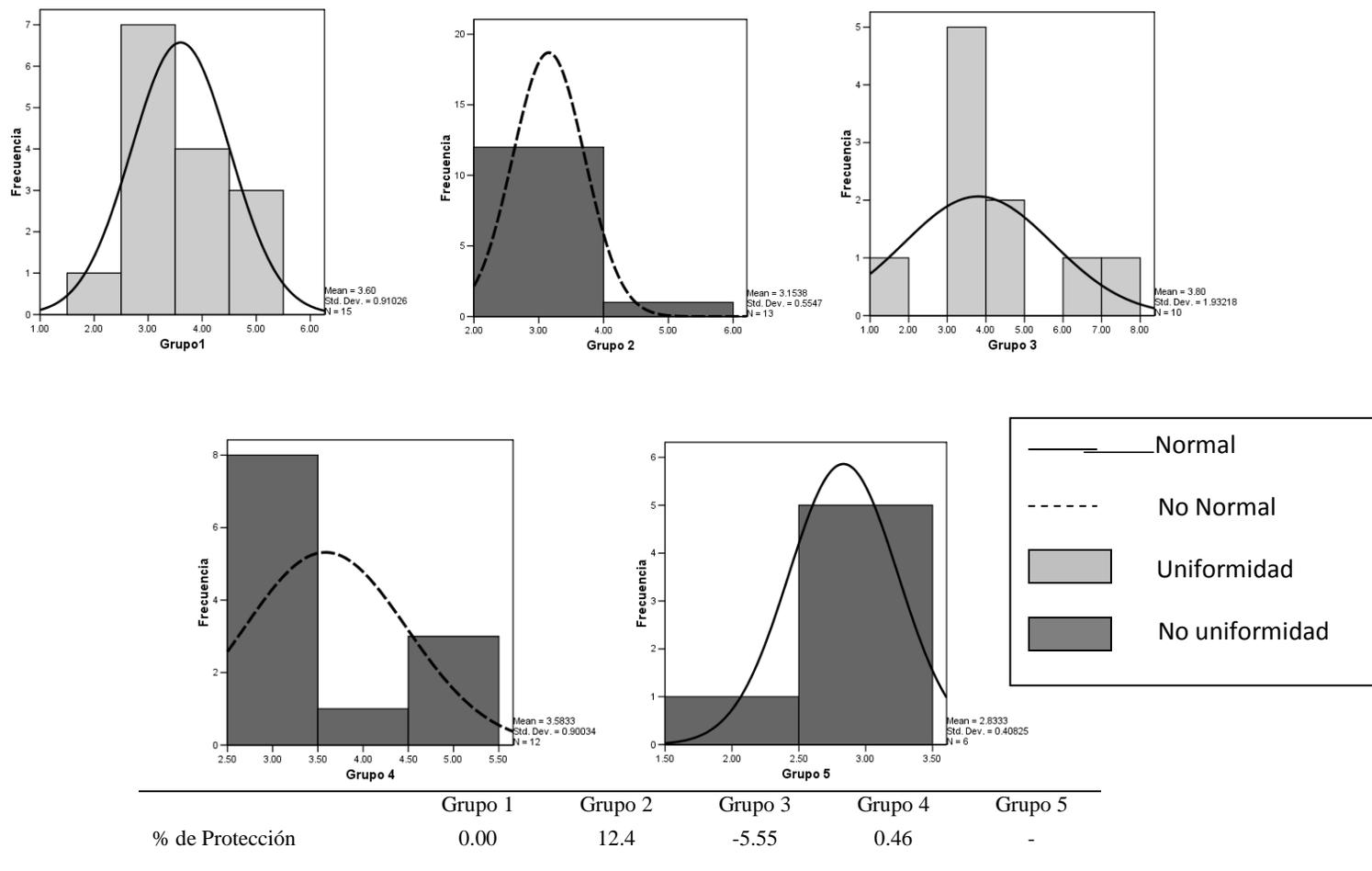


Figura 12. Distribución de frecuencias y normalidad de la variable Intensidad de la Lesión y porcentaje de protección

Como puede observarse en el cuadro 10, el grupo EDTA es el que más se asemeja al grupo de sanos, mientras que el grupo de *I. suffruticosa* (grupo 3), es el que más se asemeja al grupo 1 (control de daños).

Relación entre área de las lesiones determinadas por análisis digital de imágenes y los hallazgos histopatológicos

Se puede observar que existe una relación inversa, entre el área de la lesión y la intensidad de lesión para el grupo 2. Ningún dato queda excluido si observamos..., mientras que la relación es de forma proporcional para los grupos 1, 3 y 4.

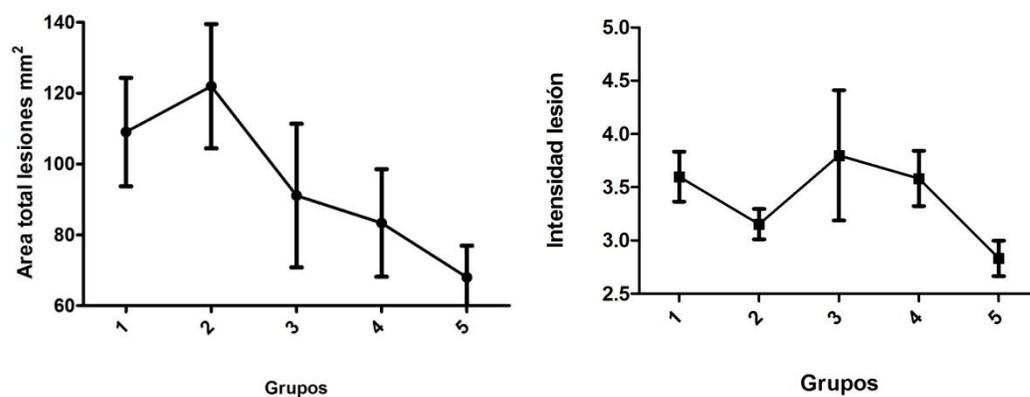


Figura 13. Relación entre área total de las lesiones y daño tisular¹².

¹² Grupo 1: ETOH, Grupo 2: ETOH + EDTA, Grupo 3: ETOH + *I. suffruticosa*, Grupo 4: ETOH + *I. guatemalensis*, Grupo 5: Sanos

Discusión

El tratamiento de la úlcera péptica, puede beneficiarse con la introducción de terapias nuevas, basadas en compuestos naturales. Recientemente se le ha puesto mucha atención hacia los extractos y compuestos biológicamente activos, los cuales son aislados de plantas de uso popular. El uso de plantas medicinales, juega un papel vital en las coberturas básicas de los sistemas de salud de los países en vías de desarrollo, pudiendo estas plantas ofrecer una nueva fuente de productos antibacteriales, antifúngicos o antivirales, con una actividad significativa contra los microorganismos(36).

Estandarización del modelo de inducción de úlceras.

Al realizar las pruebas del modelo experimental, se puede afirmar que el modelo es totalmente fiable para el estudio de úlceras, ya que tanto la intensidad como el área total de las lesiones demostró tener una asociación significativa ($p < 0.05$) entre ellas y el uso de etanol, lo cual se comprobó por medio de la prueba de Kruz-Kar-Wallis.

ETOH.

Existe una amplia variabilidad en los resultados, esto puede deberse a muchos factores entre los que cabe destacar que la compleja interacción entre los factores protectores y agresores que promueven la formación de úlceras, otros factores como el sexo desempeña un papel importante, en la deficiencia del pepsinógeno, lo cual ocurre en algunas cepas de ratones (36). Las hembras de ratón, generan más pepsinógeno, lo cual puede favorecer la formación de úlceras gástricas. Debido a que no existe uniformidad total en los modelos experimentales, las úlceras pueden formarse con una variabilidad 10 al 40% (36).

Método digital de análisis de imágenes.

El método empleado para este estudio por medio del Scion Image Software, es costo efectivo, de fácil acceso, no requiere una amplia preparación técnica para su realización, sin embargo, cabe aclarar que no puede desligarse del análisis histopatológico, ya que este software únicamente da información sobre el área superficial de la lesión.

Caracterización de los extractos de *I. guatemalensis* e *I. sufruticosa*

Como se puede observar en la Gráfica 1, las composiciones químicas de ambos extractos son similares, obsérvese el pico característico que se forma a los 480 nm en ambos extractos, lo cual podría ser compatible con la presencia de carotenos. En un estudio

llevado a cabo por Pereira Leite y otros (37), determinaron que el extracto de *I. suffruticosa* contiene alcaloides, iridoides, saponinas, carbohidratos, coumarinas, flavonoides, fenol, terpenoides, índigo y esteroides.

Efecto citoprotector de los extractos de *I. guatemalensis* e *I. suffruticosa*

La cantidad de ratones que presentaron hiperemia y edema, fue mayor en el grupo tratado con EDTA, ya que de los grupos tratados con extracto de *Indigofera*, presentan hasta un 6% de lesiones graves mientras que el grupo tratado con EDTA el presentó 8% lesión moderada. Esto concuerda con el resultado obtenido por Cola-Miranda (8) en el cual demostró que existía un efecto protector de la mucosa gástrica al emplear *I. truxillensis* comparado contra el control. En cuanto a la erosión, el grupo tratado con EDTA, presenta un 12% de lesiones graves, mientras que en los grupos de *Indigofera*, las lesiones graves llegan hasta un 30%, esto puede deberse tanto a que el extracto fue administrado oralmente como al tamaño molecular de los constituyentes del extracto (13), los cuales pudieran ser demasiado grandes para atravesar la mucosa gástrica o que sus cargas eléctricas impidan su completa miscibilidad, por lo que ejercen su acción superficialmente. Por el contrario, la vía de administración de EDTA al ser intraperitoneal, carece del efecto de paso por el estómago, ya que llega a las paredes gástricas a través de la microcirculación(19). El grupo tratado con el extracto de *I. guatemalensis* fue en el que se presentaron una mayor cantidad de lesiones leves, tanto en edema como hiperemia; por el contrario el extracto de *I. suffruticosa* fue mejor en cuanto a la protección a la erosión. Esto quizás pueda relacionarse a los datos de absorción de los compuestos, en los cuales se observa una menor concentración de los mismos en el extracto de la especie *guatemalensis*, lo cual quizás permitiría una mejor absorción gástrica que la presentada por a la especie *suffruticosa*.

Si bien no se conoce el mecanismo de acción exacto de los extractos del género *Indigofera* (37), estos son comparables a los obtenidos en el estudio de Gar G. y otros (26) llevado a cabo con un extracto de hojas de Nim, se observó igual que en nuestro estudio, una disminución significativa en la severidad de la úlcera, este extracto parece evitar la degranulación de los mastocitos, lo cual permite un aumento en la cantidad de mucus adherente en las paredes. Otros estudios llevados a cabo en extractos de *Croton canjura* (29) llevados a cabo por Souza, S y otros, en los que se demostró que dicho extracto también era gastroprotector, ya que reducía significativamente la severidad de la úlcera,

posiblemente por una sinergia entre dos mecanismos, los cuales podrían ser un aumento en la PGE-2 y un antagonismo no competitivo de los receptores H2.

En cuanto a la protección, EDTA, es muy superior a los extractos de *Indigofera*, pero es importante el efecto negativo de protección del extracto de *I. suffruticosa*, ya que sus media y desviación estándar son similares al grupo de ETOH, con lo cual pareciera promover en conjunto con el ETOH, el daño a la mucosa gástrica. Por el contrario, el extracto de *I. guatemalensis* presenta un pequeño porcentaje de protección. Nuevamente este efecto contrario, puede deberse a la composición química de ambos extractos, las que si bien son similares, pero tomando en cuenta que, desconocemos la composición química de *I. guatemalensis*, podríamos asumir que está diferencia de concentraciones promueve un accionar diferente de cada extracto sobre la mucosa.

Efecto citoprotector del EDTA

Cabe destacar que de los ratones que presentaban erosión, el grupo tratado con EDTA, quienes en su mayoría presentaban lesiones leves, lo cual ha sido descrito por estudios previos por Bertoli M T. en el cual se demostró que existía una disminución en la magnitud de las lesiones concluyendo por lo tanto, que el EDTA presentaba un efecto citoprotector, ante las lesiones por ETOH, ya que como puede verse en el Cuadro 10, es el grupo cuya media y desviación estándar es más cercana a la del grupo de sanos. Es el grupo que presentó la menor intensidad de lesión (52 ratones). Cabe destacar que en cuanto al área total de hiperemia, este grupo es quien presentaba la mayor extensión. En un estudio llevado a cabo por Glavin G. (19), en el cual se evalúa el efecto citoprotector del EDTA y el EGTA (bloqueadores moderados de calcio), observaron que ambos compuestos influían en la extinción de las lesiones gástricas tanto dependientes como independientes del ácido, ya que se observó que existe una disminución de la producción de ácido y pepsina, al administrar dichos compuestos. El calcio juega un papel muy importante en la patogénesis de la úlcera péptica, y los bloqueadores selectivos del calcio, como el verapamilo y la nifedipina, conducen a la formación de úlceras en ratas (38). Estos efectos al igual que los presentados por el EDTA en forma moderada, resultan principalmente de la inhibición del influjo de los iones calcio y de su interferencia con el reservorio intracelular de calcio. Lo anteriormente descrito fue demostrado por Süleyman H. y otros, en un estudio llevado a cabo con un extracto de *H. rhamonoides L.* en úlceras inducidas por etanol en un modelo,

donde demostró que este extracto disminuye la formación de úlceras en un modelo animal (38).

¿Podría existir un sinergismo gastroprotector entre el género *Indigofera* y el EDTA?

Teniendo en cuenta estos resultados, nuestro análisis nos lleva a la interrogante anteriormente planteada, ya que como se puede apreciar, el EDTA tuvo un mejor desempeño en la citoprotección, ya que las lesiones presentadas eran extensas pero no profundas, por el contrario los grupos tratados con el género *Indigofera*, presentaron lesiones menos extensas pero más profundas.

Conclusiones

- El modelo de formación de úlceras gástricas en ratones es adecuado para las pruebas realizadas, ya que existe una significancia entre en ETOH y la formación de lesiones.
- El método de análisis digital, brinda una forma fácil práctica de obtener resultados acertados sobre el área de la lesión.
- Las composiciones del extracto tanto de *I. guatemalensis* como de *I. sufruticosa* son similares.
- Los extractos de *I. guatemalensis* e *I. Suffruticosa*, presentan una tendencia a una actividad gastroprotectora, lo cual queda demostrado tanto en el análisis digital, como en la histopatología.
- El extracto de *I. guatemalensis* presenta una mejor acción protectora contra edema e hiperemia.

Recomendaciones

- Ampliar el ayuno de los sujetos de experimentación por un tiempo mayor de 24 horas ó realizar una disminución paulatina de la alimentación en días anteriores, y concluir con un ayuno de 24 horas, ya que esto puede contribuir a mejorar la formación de lesiones.
- Diseñar un experimento para probar la existencia de sinergismo entre el EDTA (actividad citoprotectora) y los extractos de *Indigofera sp.* ya que ambos presentan actividad gastroprotección.
- Aumentar el tiempo entre la administración del EDTA y la introducción del ETOH, con esto podría lograrse que el EDTA ascienda a la superficie de la mucosa.
- Hacer la corrección del factor de sustracción teniendo en cuenta nuestro modelo.
- Trabajar con extractos a concentraciones conocidas.
- Probar el efecto de los extractos en otros modelos de inducción.
- Realizar un estudio cualitativo al extracto de *I. guatemalensis*, para determinar su composición química exacta.

Anexo I

Pruebas de normalidad

Prueba normalidad variable Área total experimento

		grupo1	grupo2	grupo3	grupo4	grupo5
N		15	13	10	12	11
Normal Parameters(a,b)	Mean	109.0300	121.9785	91.0900	83.3542	68.0327
	Std. Deviation	59.25262	63.28881	64.07411	52.58441	29.62231
Most Extreme Differences	Absolute	.171	.206	.206	.206	.157
	Positive	.171	.206	.206	.206	.157
	Negative	-.111	-.121	-.152	-.162	-.105
Kolmogorov-Smirnov Z		.664	.744	.652	.714	.520
Asymp. Sig. (2-tailed)		.770	.637	.789	.687	.950

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Prueba de Normalidad: Variable Área media experimento

		grupo1	grupo2	grupo3	grupo4	grupo5
N		15	13	10	12	11
Normal Parameters(a,b)	Mean	26.2660	25.4646	27.0930	83.3542	20.4800
	Std. Deviation	13.74248	10.36352	13.09785	52.58441	11.07656
Most Extreme Differences	Absolute	.151	.140	.255	.206	.162
	Positive	.151	.140	.255	.206	.162
	Negative	-.107	-.101	-.184	-.162	-.104
Kolmogorov-Smirnov Z		.584	.503	.807	.714	.538
Asymp. Sig. (2-tailed)		.884	.962	.532	.687	.935

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Prueba de normalidad: Variable índice de lesiones

		grupo1	grupo2	grupo3	grupo4	grupo5
N		15	13	10	12	11
Normal Parameters(a,b)	Mean	4.8467	4.7769	3.4800	3.4583	3.9818
	Std. Deviation	2.64247	1.28138	1.54977	2.07341	2.12123
Most Extreme Differences	Absolute	.171	.154	.155	.159	.224
	Positive	.171	.107	.098	.159	.224
	Negative	-.093	-.154	-.155	-.113	-.112
Kolmogorov-Smirnov Z		.662	.554	.492	.550	.742
Asymp. Sig. (2-tailed)		.773	.919	.969	.923	.641

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Prueba de Normalidad: Variable intensidad de lesiones

		grupo1	grupo2	grupo3	grupo4	grupo5
N		15	13	10	12	6
Normal Parameters(a,b)	Mean	3.6000	3.1538	3.8000	3.5833	2.8333
	Std. Deviation	.91026	.55470	1.93218	.90034	.40825
Most Extreme Differences	Absolute	.278	.532	.261	.408	.492
	Positive	.278	.532	.261	.408	.342
	Negative	-.188	-.391	-.239	-.259	-.492
Kolmogorov-Smirnov Z		1.078	1.919	.824	1.414	1.205
Asymp. Sig. (2-tailed)		.195	.001	.506	.037	.110

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Anexo II

Prueba de homogeneidad de Varianzas

Variables	Estadístico Levene	df1	df2	Sig.
Área total experimento	1.760	4	56	0.150
Área media experimento	0.520	4	56	0.721
Índice de lesiones	0.932	4	56	0.452

$\alpha=0.05$

Anexo III

Resumen de histopatología

Variable	Análisis histopatológico										
	grupo1		grupo 2		grupo 3		grupo 4		grupo 5		
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Erosión	+	10	71.4%	13	100.0%	6	60.0%	8	66.7%	5	100.0%
	++	3	21.4%	0	.0%	4	40.0%	3	25.0%	0	.0%
	+++	1	7.1%	0	.0%	0	.0%	1	8.3%	0	.0%
	Total	14	100.0%	13	100.0%	10	100.0%	12	100.0%	5	100.0%
Hipereimia	+	14	93.3%	12	92.3%	7	77.8%	12	100.0%	6	100.0%
	++	1	6.7%	1	7.7%	1	11.1%	0	.0%	0	.0%
	+++	0	.0%	0	.0%	1	11.1%	0	.0%	0	.0%
	Total	15	100.0%	13	100.0%	9	100.0%	12	100.0%	6	100.0%
Edema	+	11	73.3%	12	92.3%	7	77.8%	10	83.3%	6	100.0%
	++	4	26.7%	1	7.7%	1	11.1%	2	16.7%	0	.0%
	+++	0	.0%	0	.0%	1	11.1%	0	.0%	0	.0%
	Total	15	100.0%	13	100.0%	9	100.0%	12	100.0%	6	100.0%

Bibliografía

1. **Tri H Le, MD, George T Fantry, MD.** eMedicine. *Peptic-Ulcer disease*. [En línea] WebMD, 29 de Diciembre de 2009. [Citado el: 15 de Enero de 2010.]
<http://emedicine.medscape.com/article/181753-overview>.
2. *Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview.* **Abdel-Salam O, Czimmer J, Debreceni A, Szolcsányi J, Mózsik G.** Paris : Elsevier, 2001, Journal of Physiology - Paris, Vol. 95, págs. 105-127. Disponible en:
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VMC-46GC3BR-H&_user=10&_coverDate=12%2F31%2F2001&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1211460471&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_ur.
3. *Antibacterial and antifungal activity of small protein of Indigofera oblongifolia leaves.* **U, Dahot.** s.l. : Journal of Ethnopharmacology, 1999, Vol. 64, págs. 277-282.
4. **Botanical On Line.** Botanical On Line. *Usos benéficos de la ortiga*. [En línea] Botanical On Line, 2007. [Citado el: 12 de Febrero de 2009.] <http://www.botanical-online.com/lesortigues3castella.htm>.
5. **E., Da Silva.** Monografias.com. *Productos Naturales*. [En línea] [Citado el: 12 de Febrero de 2009.] <http://www.monografias.com/trabajos61/productos-naturales/productos-naturales.shtml>.
6. **Ministerio de Agricultura y Ganadería del El Salvador.** Ministerio de Agricultura y Ganadería de El Salvador. *Informes sobre CAFTA* . [En línea] 2004. [Citado el: 14 de Marzo de 2009.] http://www.mag.gob.sv/administrador/archivos/1/file_1171.pdf .
7. **Batres C, Batres L, Gamica M, Martínez R, Valle R.** Foundation for the advancements of mesoamerican studies. *Las evidencias de la industria del añil en la cuenca Copán-Chorti*. [En línea] [Citado el: 12 de Marzo de 2009.]
http://www.famsi.org/reports/03101es/53batres_batres/53batres_batres.pdf.
8. *Antiulcerogenic activity of Indigofera truxillensis Kunth.* **Cola-Miranda, Maira, y otros.** 3, 2006, Biota neotropica, Vol. 6. Disponible en:
<http://www.biotaneotropica.org.br/v6n3/pt/abstract?article+bn01006032006>. ISSN 1676-0603.
9. *A novel phenol-bound pectic polysaccharide from Decalepis hamiltonii with multi-step ulcer preventive activity.* **Srikanta B, Siddaraju M, Dharmesh S.** 39, Karnataka : World J Gastroenterol, 2007, Vol. 13, págs. 1596-5207.
10. **J., Piqué.** *Gastritis*. 13va edición. s.l. : Mosby-Doyma, 2007. págs. 86-106. Vols. Medicina Interna Farreraz-Rosman, Edición digital.

11. **Ernst J. Kuipers, Martin J., Goldman L., Ausiello D.** *Acid Peptic Disease: Epidemiology and Pathobiology*. [ed.] Cecil's Internal Medicine. 23th edition. s.l. : Elsevier, 2007. pág. Chapter 141. Edición Digital.
12. *Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants.* **Gonzales E., Iglesias I., Carretero E., Villar A.** s.l. : Journal of Ethnopharmacology., 2000, Vol. 70, págs. 329-333.
13. *Helicobacter pylori, gastritis cronica, úlcera gástrica y úlcera duodenal: Estudió de 1683 pacientes.* **Ramírez-Ramos A, Recavarren S, Ariastella J, Gilman RH, León-Barua R et al.** 19, Lima : Rev Gastroenterol Perú, 1999, págs. 196-201.
14. *Cambios en la Epidemiología de la Úlcera Péptica y su Relación con la Infección con Helicobacter Pylori.* **Teves P, Salazar Ventura S, Monge Salgado E.** Callao : s.n., 2007, Hospital Daniel Carrión. Disponible en:
<http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bvrevistas/gastro/vol27n4/pdf/a07v27n4.pdf>.
15. *Factores de riesgo clínico para hemorragia y recurrencia de úlcera péptica.* **Rodríguez-Hernández H, Guerrero-Romero J, Jacobo-Karam J, Rodríguez-Morán M.** Supl (3), Mexico DF : Rev Gastroenterol Mex, 1995, Vol. 60.
16. *Efectos del alcohol en la fisiología humana.* **Struch, Ramón.** Suplemento 1, Bcelona : s.n., 2002, Adicciones, Vol. Volumen 14.
17. *Efecto antiulceroso de una solución viscosa oral a partir de un extracto de Bidens pilos L.(Romerillo) en ratas.* **Alvarez A, Robaina Y, Sanchez E, Cuevas M.** 1, 1996, Rev cubana Plant Med, Vol. 1, págs. 25-29.
18. *Endothelin induces vascular en mucosal lesions, enhances the injury by HCl/ethanol, and the antibody exerts gastroprotection.* **Morales R.E., Johnson B.R and Szabo S.** 1992, The FASEB journal, Vol. Vol. 6, págs. 2354-2360.
19. *Effects of the Ca²⁺ chelators EGTA and EDTA on ethanol- or stress-induced gastric mucosal lesions and gastric secretion.* **Glavin, Gary y Szabo, Sandor.** 1-3, Londres : European Journal of Pharmacology, 1993, Vol. 223. doi:10.1016/0014-2999(93)90060-U.
20. **Cook, Margaret J.** Mouse Genome Informatics. *The Anatomy of the laboratory mouse 1965*. [En línea] Academic Press, Febrero de 2008. [Citado el: 15 de Febrero de 2010.]
<http://www.informatics.jax.org/cookbook/index.shtml>.
21. *Plasma pepsinogen level in rat and man.* **R, Ader.** 218-220, s.l. : Psychosom Med, 1963, Vol. 25.
22. *Use of Animal Models in Peptic Ulcer Disease.* **H., Weiner.** 58, s.l. : Psychosomatic Medicine, 1996, págs. 524-545.

23. *Computer-assisted visualization and quantitation of experimental gastric lesions in rats*. **Khan, H.** Riyadh : Elsevier, 2003, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, Vol. 49, págs. 89-95. Disponible en: www.elsevier.com/locate/jpharmtox.
24. *Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies*. **Glavin, Gary B y Szabo, Sandor.** 826, s.l. : Elsevier, 1992, The FASEB Journal, Vol. 6. 0892-6638/92/0006-825.
25. **Programa de actualización médica continua.** Enfermedad Úlcero-péptica. *Legis Información en salud*. [En línea] 2007. [Citado el: 14 de junio de 2009.] <http://www.medilegis.com/bancoconocimiento/T/Tribuna102n6pamc2/pamculcera.htm>.
26. *The gastric antiulcer effects of the leaves of neem tree*. **Gar G.P., Nigam S.K., Ogle C.W.** s.l. : Planta Med, 1993, Vol. 59, págs. 215-217.
27. *Gastroprotective effect of aqueous extract of Cistus incanus L. in rats*. **Attaguile G, Caruso A, Pennisi G, Savoca F.** 31, s.l. : Pharmacol Res., págs. 29-32.
28. *Inhibition of gastric acid secretion by the aqueous extract and purified extracts of Stachytarpheta cayenensis*. **Vela S.M., Souccar C., Lima- Landman M.T., Lapa A.J.** s.l. : Planta Med., 1995, Vol. 63, págs. 36-39.
29. *Antiulcerogenic activity of trans-dehydrocrotonin from Croton cajucara*. **Souza- Brito A.R., Rodriguez J., Hiruma-Lima C, Haun M, Nunes D.** s.l. : Planta Med., 1997, Vol. 64, págs. 126-129.
30. *Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from Croton cajucara*. **Hiruma-Lima, C.A., Spadari-Bratfisch, R.C., Gras-Kassisse, D.M., Souza Brito, R.M.** [ed.] Planta Med. 1999, Vol. 65, págs. 325-330.
31. *Effect of D-002 on gastric mucus composition in etanol-induced ulcer*. **Carvajal D., Molina V., Noa M., Valdes S., Arruzazabala M.L., Aguilar C.** s.l. : Pharmacol Res., 2000, Vol. 42, págs. 329-332.
32. *Antiulcer Drugs from Plants*. **Lewis, G.P.** London : Chemistry in Britain, 1992, Vol. 28, págs. 141-144.
33. **Sônia Pereira Leite, Jeymesson Raphael Cardoso Vieira , Paloma Lys de Medeiros , Roberta Maria Pereira Leite , Vera Lúcia de Menezes Lima , Haroudo Satiro Xavier , and Edeltrudes de Oliveira Lima.** eCam Oxford Journals. *Antimicrobial Activity of Indigofera suffruticosa*. [En línea] 1 de Junio de 2006. [Citado el: 14 de Marzo de 2009.] <http://ecam.oxfordjournals.org/cgi/citmgr?gca=ecam;3/2/261>. DOI 10.1093/ecam/nel010..
34. *Hepatoprotective Activity of Indigtone—A Bioactive Fraction from Indigofera tinctorial Linn*. **B. Singh, A. K. Saxena, B. K. Chandan, V. Bhardwaj, V. N. Gupta, O. P. Suri* and S. S. Handa.** Phytother Res. : s.n., 2001, Vol. 15, págs. 294-297.

35. **Cardoso Vieira J, de Souza I, do Nascimento S, Pereira Leite S.** eCam Oxford Journals. *Indigofera suffruticosa: An Aternative Anticancer Therapy.* [En línea] 1 de Septiembre de 2007. [Citado el: 14 de Marzo de 2009.] <http://ecam.oxfordjournals.org/cgi/citmgr?gca=ecam;4/3/355>.
36. *Antimicrobial Activity of the Indigofera Sufrutticosa.* **Pereira Leite, Sônia, y otros.** Oxford : Oxford University Press., 2006. DOI: 10.1093/ecam/nel010.
37. *Use of Animal Models in Peptic Ulcer Disease.* **Weiner, Herbert.** 58, s.l. : Psychosomatic Medicine, 1996, págs. 524-545.
38. *The effects of Hippophae Rhamnoides L. extract on ethanol-induced gastric lesion and gastric tissue gluthatione.* **Süleyman, Halis, y otros.** 2001, Indian Journal of Pharmacology, Vol. 33, págs. 77-81.