

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

# EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *Licania platypus* (Hemsl.) Fritsch. SOBRE LA PROTECCIÓN GÁSTRICA Y LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL.

Orozco Aguilar, Josué<sup>1,2</sup>; Chavarría Rojas, Marianela<sup>2,3</sup>; Sandí Flores, Jennifer<sup>1</sup>; Alvarado Barboza, Gilbert<sup>4,5</sup>; Cordero García, Eugenia<sup>1</sup>; Morales Acuña, Juan Alberto<sup>6</sup>; Retana Salazar, Axel<sup>4,7</sup> y González Camacho, Sara.<sup>2,8</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

<sup>2</sup> Laboratorio de Ensayos Biológicos, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

<sup>3</sup> Escuela de Farmacia, Universidad Latina de Costa Rica.

<sup>4</sup> Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

<sup>5</sup> Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

<sup>6</sup> Servicio de Patología, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica.

<sup>7</sup> Escuela de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

<sup>8</sup> Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

**Resumen:** *Licania platypus* se distribuye ampliamente en países tropicales. Tradicionalmente, en América Central se ha utilizado para diversos problemas de salud, especialmente gastrointestinales.

**Objetivo:** Investigar la actividad antiulcerosa gástrica y el efecto sobre la motilidad gastrointestinal del extracto acuoso de hojas de *Licania platypus*.

**Métodos:** El daño gástrico fue inducido con los modelos de etanol e indometacina y se evaluaron otros parámetros en el modelo de ligadura pilórica. Además, se analizó el efecto sobre la motilidad gastrointestinal utilizando rojo de fenol.

**Resultados:** La administración oral del extracto acuoso (1000 mg/kg) redujo significativamente el área de las lesiones gástricas ( $p < 0,05$ ) en ambos modelos. Se observó un incremento en el volumen de las secreciones gástricas y en la secreción de moco gástrico, además de disminución en la acidez total y en la peroxidación lipídica ( $p < 0,05$ ). El extracto acuoso de *Licania platypus* redujo la tasa de vaciamiento gástrico ( $p < 0,05$ ) sin mostrar efecto alguno sobre el tránsito intestinal.

**Conclusión:** El extracto acuoso de *Licania platypus* brinda un efecto gastroprotector en diferentes modelos de inducción de úlceras agudas y una disminución en el vaciamiento gástrico. Las actividades demostradas en este estudio contribuyen con el conocimiento etnofarmacológico atribuido a *Licania platypus*.

**Palabras clave:** antiulcerosos, motilidad gastrointestinal, prostaglandinas, moco, antioxidantes.

Fuente: CeCS, BIREME.

Recibido: 30 Junio 2017. Aceptado: 20 Septiembre 2017. Publicado: 25 Octubre 2017.

Revista electrónica publicada por el Departamento de Farmacología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica. © All rights reserved. Licensed under a Creative Commons Unported License.



Contáctenos: [rev.med.ucr@gmail.com](mailto:rev.med.ucr@gmail.com). Tel: (506) 25-11 4492, Fax: 25-11-4489.

# EFFECT OF LEAVES AQUEOUS EXTRACT OF *Licania platypus* (Hemsl.) Fritsch. ON GASTROPROTECTION AND GASTROINTESTINAL MOTILITY.

**Abstract:** *Licania platypus* is a species widely distributed in tropical countries. Traditionally, it has been used in Central America for a variety of health problems, especially gastrointestinal problems.

**Aim:** To investigate gastric antiulcer activity and gastrointestinal motility effect of *Licania platypus* leaves aqueous extract.

**Methods:** Gastric lesions were induced by ethanol and indomethacin models; also other parameters were analyzed in pylorus-ligated model. Furthermore, was evaluated the effect on gastrointestinal motility using phenol red.

**Results:** Oral administration of aqueous extract (1000 mg/kg) significantly reduced the area of gastric lesions ( $p < 0,05$ ) on both models. It was observed a significantly increased the gastric secretion volume and gastric mucus, whereas decreased total acidity and lipid peroxidation ( $p < 0,05$ ). The aqueous extract of *Licania platypus* reduced the rate of gastric emptying ( $p < 0,05$ ), but did not show any effect on intestinal transit.

**Conclusion:** *Licania platypus* aqueous extract has a gastroprotective effect in different acute ulcer induction models and reducing the rate of gastric emptying. The activities proved in this study contribute ethnopharmacological toxicological knowledge attributed to *Licania platypus*.

**Key words:** anti-ulcer agents, gastrointestinal motility, prostaglandins, mucus, antioxidants.

Source: CeCS, BIREME.

## Abreviaturas:

**AU:** área de ulceración

**EALp:** extracto acuoso de *Licania platypus*

**EtOH:** etanol

**H&E:** hematoxilina-eosina

**IP:** índice de prevención

**MDA:** malondialdehído

**RAN:** ranitidina

**SUC:** sucralfato

## INTRODUCCION

La mucosa gástrica está continuamente expuesta a factores corrosivos, tales como ácido clorhídrico, pepsina, especies reactivas de oxígeno, consumo de alcohol, exposición a antiinflamatorios no esteroideos y el fumado [1, 2, 3]. Una úlcera péptica se entiende como una lesión de carácter crónico y recurrente que se caracteriza por la pérdida de integridad y presencia de un proceso inflamatorio en la mucosa gástrica o intestinal [4, 5, 6]. La fisiopatología de las úlceras gástricas se

atribuye al desbalance entre los factores corrosivos y los mecanismos de gastroprotección de la mucosa gástrica, los cuales incluyen una adecuada motilidad gastrointestinal y perfusión gástrica, una barrera de moco continua e intacta y mediadores bioquímicos como las prostaglandinas y el óxido nítrico [7, 8].

Una motilidad gastrointestinal incrementada podría promover la protección gástrica al acelerar el vaciamiento gástrico de aquellos agentes



dañinos de la mucosa [9]. Por otra parte, la disminución de la motilidad gástrica también podría ser un mecanismo de gastroprotección, pues implica menor exposición al agente corrosivo en términos de área superficial [1].

Existen varios compuestos sintéticos disponibles para el tratamiento de la enfermedad úlcero-péptica. Sin embargo, estas alternativas terapéuticas tienden a ser costosas y en muchos casos, se asocian con diversos efectos adversos [9, 10]. Por lo tanto, se ha recurrido al estudio de nuevas terapias alternativas o complementarias que brinden mayor seguridad, tales como los productos naturales [9, 11, 12].

Los productos derivados de plantas con actividad antioxidante y gastroprotectora están vinculados con ventajas que abarcan desde la reducción de efectos adversos hasta aspectos de índole socioeconómico [13, 14], convirtiéndolos en atractivas opciones de tratamiento [1, 3, 15].

La planta *Licania platypus* (Hemsl.) Fritsch. (código 354056), conocida localmente como “sonzapote” o “zapote mechudo”, es una especie que se encuentra principalmente en la costa Pacífica de Costa Rica [16]. Se ha estudiado su actividad biológica, específicamente la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de hojas de esta especie, demostrando un importante efecto gastroprotector asociado con un incremento en las barreras de gastroprotección físicas [17].

Por otra parte, se ha realizado un perfil fitoquímico de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de esta especie. Este análisis evidenció la presencia de metabolitos secundarios, diferentes en ambos extractos, que están vinculados con la actividad antioxidante y también gastroprotectora (datos no publicados). A partir de estas observaciones, surge la propuesta de estudiar la actividad del extracto acuoso de *L. platypus* sobre el tracto gastrointestinal.

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto del extracto acuoso de hojas de *L. platypus* sobre la

protección gástrica y tránsito gastrointestinal utilizando diversos modelos animales.

## MÉTODOS Y MATERIALES

### Material Vegetal

Los órganos vegetativos con los que se trabajaron fueron recolectados el 24 de mayo del 2010 en la Estación Ecoturística Manú en Limón, Costa Rica. Las hojas de *L. platypus* fueron identificadas por Luis J. Poveda Álvarez del herbario “Juvenal Valerio Rodríguez”, lugar donde se mantiene una muestra de este espécimen (código herbario.j.v.r.13918). El material vegetal fue secado a temperatura ambiente durante dos semanas y posteriormente pulverizado con un molino de especies Cuisinart® modelo SG-10.

### Preparación del extracto

El extracto crudo acuoso de *L. platypus* (EALp) fue preparado con agua destilada. Con 200 g de hojas pulverizadas y 500 mL del agua destilada a temperatura de ebullición se realizó la extracción por un periodo de 30 min en un beaker Pyrex® de 1000 mL. Seguidamente se filtró por gravedad con papel filtro Whatman® de calidad cualitativo. Luego se liofilizó para contar con material sólido y pulverizado para los experimentos con un liofilizador LABCONCO® FreeZone 6.

### Biomodelos

Se trabajó en su totalidad con ratas macho de la cepa *Sprague Dawley* (205 ± 30 g de peso y 7,0 ± 1,0 semanas de edad). Se les permitió un período de aclimatación de 5 días bajo condiciones ambientales en el lugar de trabajo (Temperatura: 20,0 ± 0,8 °C a 24 ± 0,9 °C. Humedad relativa: 73,6% ± 4,3% a 86,4% ± 3,9%. Ruido: 83,1 ± 2,9 decibeles. Fotoperíodo de 12 h) en el Bioterio Central del LEBi. Los animales se mantuvieron en cajas de policarbonato (1291H Tipo III H, Tecniplast®. Dimensiones: 425 x 266 x 185 mm) adecuadas para su tamaño, bajo dieta con *pellets* para roedores (Concentrados Aguilar & Solís®) suministrada por el Laboratorio de Ensayos Biológicos y agua acidificada (pH 3,1 ± 0,6) *ad libitum*. Para el modelo de protección gástrica se



mantuvieron en ayuno durante 18 horas antes de la inducción de úlceras, mientras que para el modelo de motilidad gastrointestinal el período fue solamente de 6 horas. Durante estos períodos los animales siempre permanecieron con libre acceso al agua acidificada. Además, en ambos casos y para evitar el consumo de otros elementos en el período de ayuno, se colocaron en las cajas rejillas adecuadas para aislar parcialmente las heces y la viruta. El manejo de los animales se realizó siguiendo la Ley Bienestar de los Animales (N° 7451) y las directrices estipuladas en la Guía para el Cuido y Uso de Animales de Laboratorio (Decreto N° 26668) y fue aprobado por el Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Costa Rica en su oficio n.º CICUA 004-15.

### Tratamientos

Para el modelo de efectos antiulcerosos la dosis del extracto fue establecida a partir de resultados previos en el momento de analizar la toxicidad a través de un modelo de toxicidad oral aguda. Para esto se trabajó con diferentes dosis (500-1000-1500-2000 mg/kg) en el modelo de inducción de úlceras por etanol (datos no mostrados), estableciéndose la dosis a utilizar en los ensayos posteriores definida en 1000 mg/kg.

Por otra parte, para el modelo de motilidad gastrointestinal fueron utilizadas dosis menores (75-125-250-500 mg/kg) debido al marcado efecto de retención gástrica observado en los ensayos mencionados anteriormente. Con estas dosis se pretendía demostrar dosis-dependencia, además de obtener la menor dosis efectiva.

Para todos los modelos, los tratamientos de interés se administraron por vía oral, preparándose cada disolución en el momento de utilizarse. Para determinar el efecto sobre el daño gástrico se administró el tratamiento una hora antes del agente gastrolesivo, mientras que en el caso del modelo de motilidad gastrointestinal la administración del EALp se realizó 1,5 horas antes del administrar el agente visualizador.

### Diseño experimental

El modelaje experimental fue por bloques, realizando ensayos individuales e independientes para cada modelo. La muestra se definió en un cálculo en base a incidencias seriadas.

Para analizar el efecto gastroprotector se trabajó con 3 grupos experimentales de 6 animales cada uno, el primero al que solamente se le administraba vehículo (agua potable, dosis de 1 mL/200g peso corporal) correspondiendo al control negativo, un segundo grupo tratado con SUC (500 mg/kg) como control positivo y el tercero de ellos tratado con EALp (1000 mg/kg) como grupo de interés.

En cuanto al modelo de motilidad gastrointestinal, se trabajó con 6 grupos experimentales de 6 sujetos cada uno, los controles positivo y negativo fueron tratados con atropina (3 mg/kg vía subcutánea) y agua potable (dosis de 1 mL/200g) respectivamente. Para los grupos de interés experimental, se trabajaron 4 diferentes dosis, las cuales fueron mencionadas en la sección de Tratamientos.

### Modelos de ulceración aguda

#### *Ulceración gástrica inducida por EtOH*

La actividad biológica se evaluó con la misma metodología de Orozco-Aguilar [17]. Para esto se administró a todos los sujetos una dosis de alcohol al 95% de 1 mL/kg de peso corporal vía oral por medio de una cánula esofágica para roedor (Cadence Science®, 7914). Luego de un período de 2 horas se aplicó eutanasia a los animales por medio de decapitación con guillotina. Los estómagos fueron diseccionados y lavados con solución salina para ser fotografiados con una cámara Canon Digital Ixus 160. En la observación realizada se consideraron como lesiones cualquier alteración de tipo erosiva observada en la mucosa gástrica. La cuantificación de dichas lesiones gástricas se realizó con ayuda del software computacional ImageTool 3.0®.

### Ulceración gástrica inducida por indometacina

El modelo se desarrolló de acuerdo con la metodología de Orozco-Aguilar [17]. El agente lesivo, indometacina (cápsulas M.K. Pharmaceuticals) a una dosis de 45 mg/kg de peso corporal, fue administrado vía oral por medio de una cánula esofágica a todos los animales posterior a la administración del tratamiento. Pasado un período de 5 horas se aplicó eutanasia a los animales con la misma técnica mencionada en la sección anterior. Los tejidos fueron tratados y analizados de igual manera que la sección anterior.

### Medición del índice de prevención

En los modelos anteriores se realizó la cuantificación de un índice de prevención (IP). Para esto se cuantificó la sumatoria del total de área gástrica dañada de cada tejido, la cual es considerada como área de ulceración (AU). El IP se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$IP = \left( \frac{AU_{controlnegativo} - AU_{tratado}}{AU_{controlnegativo}} \right) \times 100$$

### Modelo de ligadura pilórica

Se realizó de acuerdo a modificaciones del trabajo de Shay [18] presentadas en el trabajo de Orozco-Aguilar [17]. Brevemente, 1 hora después de la administración del tratamiento se realizó una laparotomía medial bajo anestesia profunda con pentobarbital (Eutanex® Invet), dosis de 50 mg/kg de peso corporal, para realizar una ligadura que limitara el paso a nivel del píloro. Así es posible recolectar fluidos gástricos para su respectivo análisis. Luego de un período de 4 horas seguido al proceso quirúrgico se aplicó eutanasia a los animales por medio de decapitación. Seguido a esto, se retiraron los estómagos mediante la sujeción del esófago para no perder fluidos gástricos durante este proceso. El tejido gástrico obtenido se maceró con suero salino para otros análisis. En este modelo se utilizó como control positivo ranitidina (RAN) a dosis de 100 mg/kg de peso corporal.

### Medición de parámetros fisicoquímicos en el modelo de ligadura pilórica

El contenido gástrico fue centrifugado a 1500 rpm durante 30 minutos. Luego de esto fue cuantificado el volumen y la acidez libre, con un pHmetro marca Thermo Scientific ORIONSTAR A211, del sobrenadante obtenido. La acidez total se determinó mediante una valoración ácido-base de una alícuota de cada muestra, para ello se utilizó como valorante NaOH 0,01 N (Laboratorios Químicos Arvi) y fenolftaleína como indicador. La acidez total se expresó como mEq H<sup>+</sup>/L/4h.

### Medición de parámetros bioquímicos en el modelo de ligadura pilórica

Se cuantificó el moco gástrico secretado durante este proceso de acuerdo al método descrito por Li [19], raspándose gentilmente cada estómago con un portaobjetos y determinando la masa de moco con una balanza analítica Adam® PW254. Estos resultados se reportan como mg de moco/4h en tejido gástrico. La protección *in vivo* y *ex vivo* contra la peroxidación lipídica se realizó mediante la medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico de acuerdo al método de Azofeifa [20]. Los resultados se expresan como nmol malondialdehído (MDA)/g de tejido gástrico.

### Histopatología

Para la examinación a nivel histopatológico de los estómagos obtenidos en los modelos de inducción de úlceras por etanol e indometacina, estos fueron fijados con una disolución de formalina al 10% con amortiguador de fosfatos (Laboratorios Químicos Arvi). Los tejidos fueron deshidratados por gradiente de alcohol y posteriormente colocados en bloques de parafina para seccionar. Los cortes realizados tuvieron un grosor de 5 μm y fueron teñidos con los colorantes hematoxilina-eosina (H&E). El análisis de las secciones se realizó por un patólogo experimentado en ensayo ciego.

### Modelo de motilidad gastrointestinal

Para determinar el efecto de los extractos en la motilidad gastrointestinal se trabajó con la metodología adaptada de Caldas [21]. Se utilizó como sustancia indicadora una dosis de 0,75 mg de

rojo de fenol (Riedel de Haenag, Seelze Hannover) administrado en disolución por cánula intragástrica en un volumen de 1 mL. Adicional a los grupos mencionados anteriormente, se utilizó un grupo control a tiempo cero al cual se le aplicó eutanasia inmediatamente después de la administración del colorante. Al resto de grupos se les aplicó eutanasia luego de un período de 30 minutos por la misma vía.

Para analizar el efecto en la motilidad gástrica, se extrajeron los estómagos y se lavó su contenido con 7 mL de agua destilada. El contenido fue centrifugado a 1250 rpm durante 15 minutos. Una alícuota de 1 mL del sobrenadante fue mezclada con 1 mL de hidróxido de sodio 1 N (Laboratorios Químicos Arvi) para leer su absorbancia a 560 nm con un lector de microplacas Biotek Sinergy HT. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de colorante retenido en el tejido gástrico luego de 30 minutos. En cuanto a la motilidad intestinal, los mismos sujetos experimentales fueron utilizados, ya que se obtuvo también el intestino delgado. Utilizando el tejido entre la región gastropilórica y la unión ileocecal se midió la distancia recorrida por el colorante. Se expresa el efecto en la motilidad como el porcentaje de distancia recorrida por el colorante en relación con el tejido analizado.

### Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como el promedio  $\pm$  error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía seguido por una prueba *post-hoc* de Tukey. Fue considerado un valor de significancia menor que 0,05 para determinar diferencias significativas. Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico GraphPad Prism 5.

## RESULTADOS

### *Efecto de EALp en las úlceras gástricas inducidas por etanol e indometacina*

En el grupo experimental control negativo, al cual se le administró agua como tratamiento en combinación con EtOH al 95 %, se pudo observar un área dañada con un valor de  $22,1 \pm 3,9 \text{ mm}^2$ . Los grupos que recibieron como tratamiento oral

EALp y SUC mostraron una disminución significativa del área lesionada al comparar con el grupo control (AU:  $1,3 \pm 1,2 \text{ mm}^2$  y  $6,0 \pm 3,6 \text{ mm}^2$  respectivamente) ( $p < 0,05$ , Figura 2A). El IP de EALp fue del 94 %, mientras que el de SUC fue del 73 %.

De la misma manera, los animales pertenecientes al grupo control negativo que recibieron indometacina como agente inductor de úlceras también presentaron lesiones gástricas importantes (AU:  $15,3 \pm 2,9 \text{ mm}^2$ ).

Con la administración de EALp como tratamiento, se observó una reducción significativa en el área dañada (AU:  $2,0 \pm 1,4 \text{ mm}^2$ ) ( $p < 0,05$ , Fig. 2B), correspondiente a un valor de IP de 87 %.

Al administrar SUC también se observó una tendencia de disminución en el área gástrica dañada (AU:  $8,7 \pm 1,2 \text{ mm}^2$ ). Sin embargo, esta disminución no fue significativa al comparar contra el grupo control, el valor de IP fue de 43 %. Cabe rescatar que el EALp mostró mayor eficacia en el tratamiento de las lesiones gástricas que el SUC.

Al analizar los tejidos por medio de un estudio histopatológico fue posible observar que las lesiones provocadas por el EtOH presentan congestión, erosión, necrosis e infiltración leucocitaria, como se observa en la Figura 3A y Figura 3B. La administración de EALp demostró brindar protección al tejido gástrico contra el efecto lesivo del EtOH, se observa únicamente un ligero edema en la submucosa (Figura 3C y Figura 3D).

Con la administración de indometacina, se observó que los tejidos analizados presentaron un importante proceso inflamatorio, disrupción del epitelio, necrosis e infiltración de leucocitos en el epitelio gástrico (Figura 4A y Figura 4B). Al administrar EALp el tejido se observa prácticamente sano, evidenciado el efecto gastroprotector de este tratamiento (Figura 4C y Figura 4D).

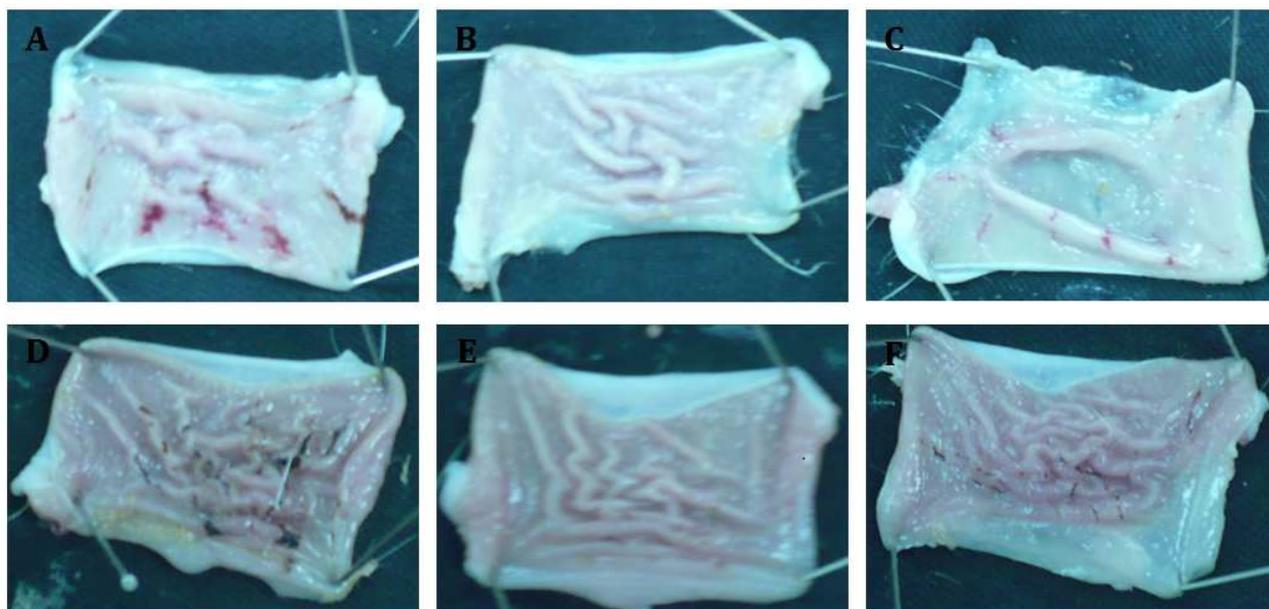


Figura n.º 1. Efecto de la administración oral de EALp sobre el proceso de ulceración gástrica inducido por EtOH e inducido por indometacina. Los animales recibieron vehículo (agua, dosis de 1 mL/200g de peso corporal) (A y D), EALp a dosis de 1000 mg/kg (B y E) o SUC a dosis de 500 mg/kg (C y F) 1h antes que el agente inductor de úlceras, EtOH (A, B y C) o indometacina (D, E y F).

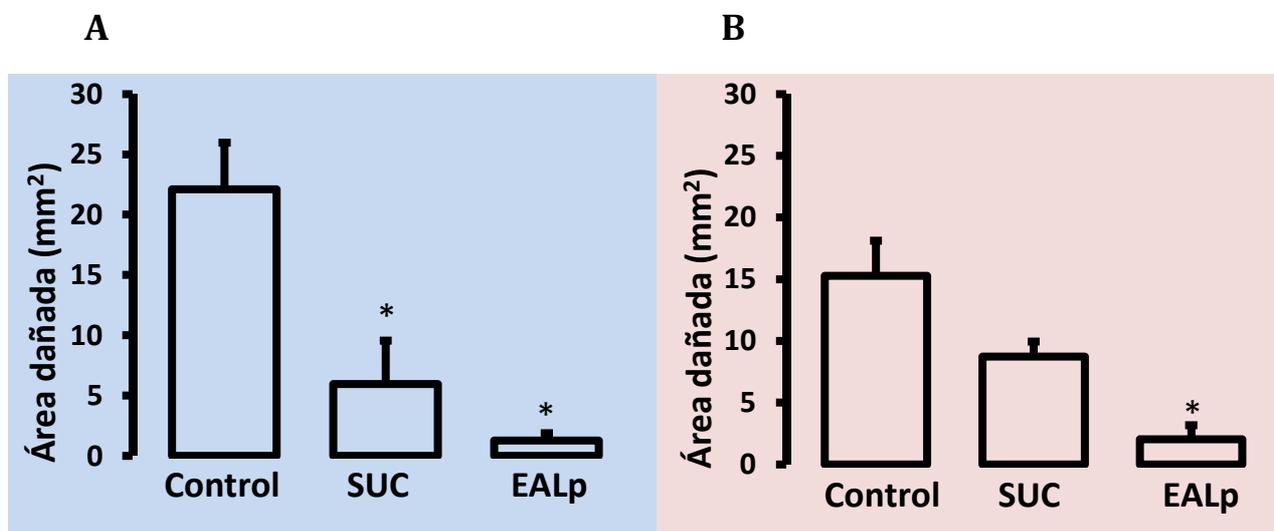


Figura n.º 2. Efecto gastroprotector del EALp sobre las úlceras gástricas inducidas por EtOH (A) e inducidas por indometacina (B). Los sujetos experimentales recibieron vehículo (agua, 1 mL/200g) en el control negativo, SUC (500 mg/kg) en el control positivo o EALp (1000 mg/kg) 1h antes que el agente inductor de úlceras. El área dañada (mm<sup>2</sup>) se expresó como promedio ± SEM, n=6 animales en cada grupo experimental. \* p < 0,05.

### *Efecto de EALp sobre parámetros fisicoquímicos y bioquímicos*

En la Tabla n.º 1 se detalla el efecto de EALp sobre varios parámetros relacionados con la secreción ácida.

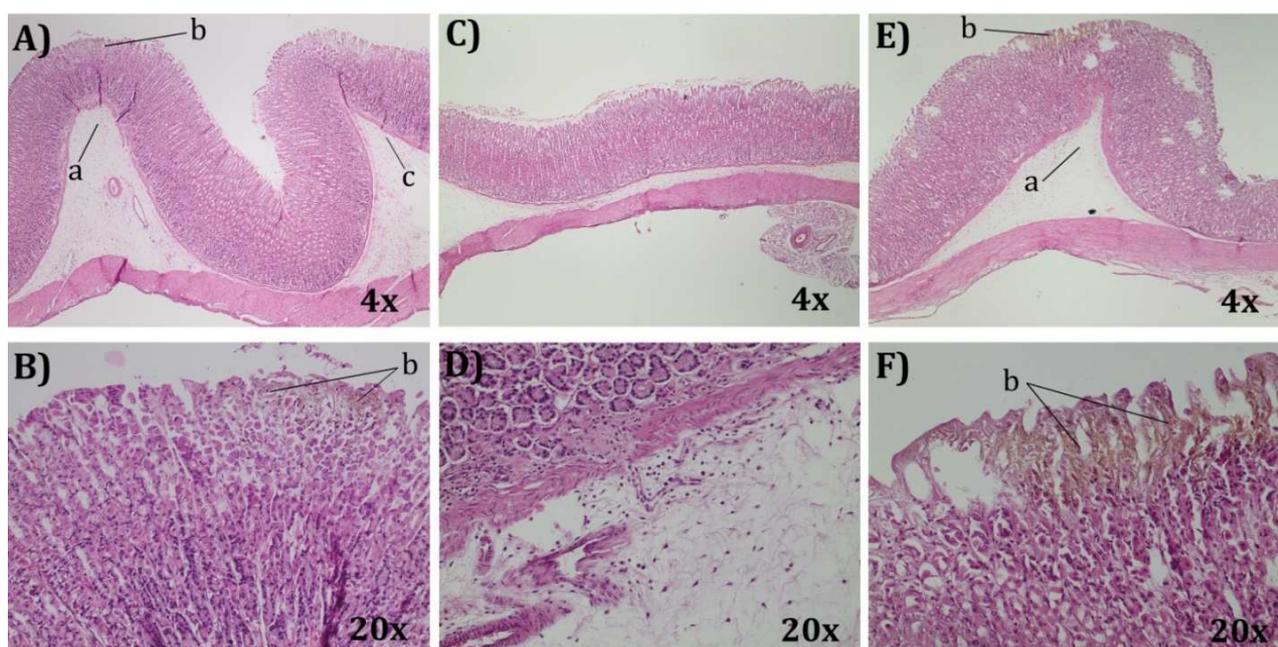
Se observó que la administración de EALp incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) el volumen de secreción gástrica y la cantidad de moco gástrico respecto al grupo control. Mientras que los valores de acidez total, MDA y MDA-TBPH inducido mostraron una El fármaco RAN, utilizado en este ensayo como control positivo, únicamente presentó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la acidez total al comparar contra el control negativo.

disminución significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al control negativo.

Ninguno de los otros parámetros bioquímicos resultó modificado por este fármaco.

### *Efecto de EALp sobre la motilidad intestinal y vaciamiento gástrico.*

Los animales tratados con atropina mostraron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la motilidad intestinal respecto al control negativo ( $61,6 \pm 2,5$  % y  $79,9 \pm 1,1$  %, respectivamente). Al administrar EALp en dosis de 500, 300, 150 y 75 mg/kg no se observó ningún efecto ( $p < 0,05$ ) sobre el tránsito intestinal al comparar contra el grupo control (Fig. 5A).



**Figura n.º 3. Hallazgos histopatológicos en estómagos extraídos bajo el modelo con EtOH. Cortes en microscopía de luz para los tejidos gástricos extraídos de ratas bajo dicho modelo. (A) imagen representativa del grupo tratado con agua, en (B) se observa en detalle un área focal de necrosis. (C) imagen representativa del grupo experimental con EALp (1000 mg/kg de peso corporal) en donde se observa un tejido sano, detallando en (D) la mucosa sin alteraciones. (E) imagen representativa del grupo control positivo tratado con SUC, (F) el detalle del área erosionada. En las fotografías se puede observar edema en la submucosa (a), áreas focales de necrosis (b) e infiltración leucocitaria (c).**

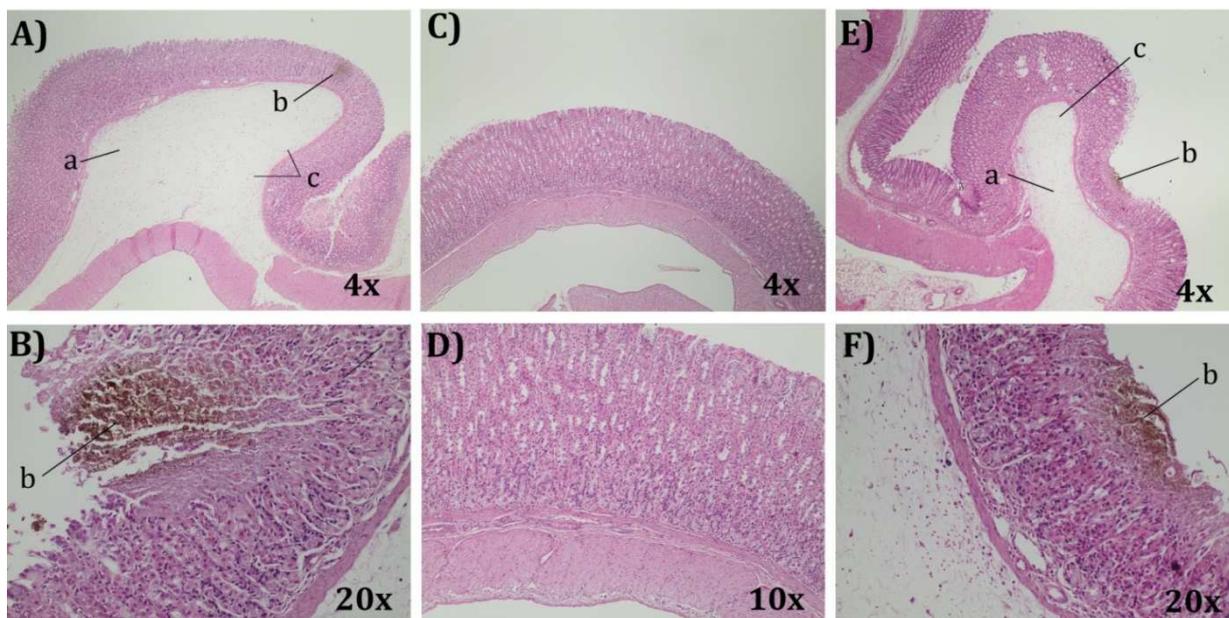
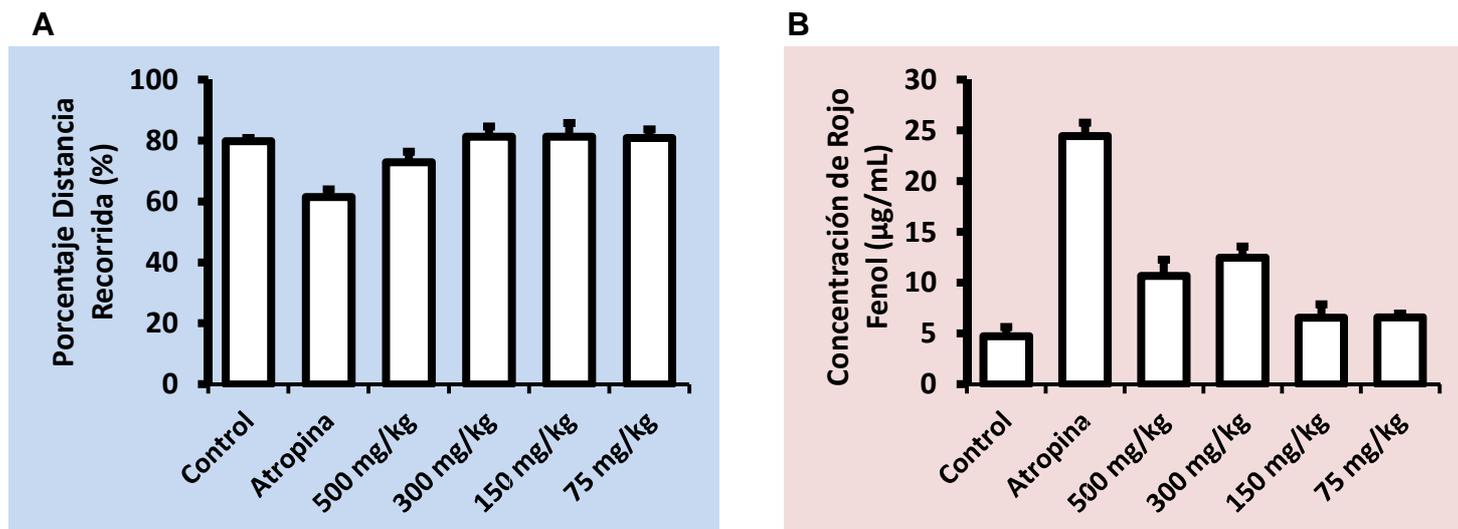


Figura n.º4. Hallazgos histopatológicos en estómagos extraídos bajo el modelo de indometacina. Cortes en microscopía de luz para tejidos gástricos extraídos de ratas bajo este modelo. (A) imagen representativa del grupo control negativo, en (B) se observa en detalle un área focal de necrosis presente en el tejido. (C) imagen representativa del grupo experimental con EALp (1000 mg/kg de peso corporal), en (D) se detalla un mínimo edema en la submucosa. (E) imagen representativa del grupo control positivo tratado con SUC, (F) el detalle del área erosionada. En las fotografías se puede observar edema en la submucosa (a), áreas focales de necrosis (b) e infiltración leucocitaria (c).

Tabla n. º1. Efecto de EALp sobre parámetros de contenido gástrico en el modelo de ligadura pilórica.

Tratamiento (mg/kg, P.O.)	Volumen de secreción gástrica (mL)	pH gástrico	Acidez total (mEq [H <sup>+</sup> ]/L/4h)	Moco gástrico (mg/4h)	MDA (nmol/g)	MDA TBPH-inducido (nmol/g)
Control	3,05 ± 0,46	2,30 ± 0,02	89,25 ± 1,25	28,45 ± 2,59	3,06 ± 0,07	9,08 ± 0,31
RAN(100)	4,50 ± 0,81	3,51 ± 0,60	34,50 ± 9,74 *	24,38 ± 1,51	3,38 ± 0,25	9,16 ± 0,30
EALp (1000)	8,05 ± 0,76*	3,09 ± 0,21	42,33 ± 13,46*	47,13 ± 9,94*	2,76 ± 0,08*	7,18 ± 0,31*

Valores expresados como el promedio ± SEM. \* p < 0,05 comparando contra grupo control.



**Figura n.º 5. Efecto de EALp sobre la motilidad intestinal (A) y sobre el vaciamiento gástrico (B). Los sujetos experimentales recibieron vehículo (agua, 1 mL/200g) en el control negativo, atropina (3 mg/kg) en el control positivo o EALp (500, 300, 150 y 75 mg/kg). El porcentaje de distancia recorrida (%) y la concentración de rojo fenol (µg/mL) se expresan como promedio  $\pm$  SEM,  $n=6$  animales en cada grupo experimental. \*  $p < 0,05$ .**

Para estudiar el efecto de EALp sobre el vaciamiento gástrico se cuantificó la concentración del colorante rojo de fenol a nivel gástrico. Se observó que los animales tratados con atropina y con EALp a dosis de 500 y 300 mg/kg presentaron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en el vaciamiento gástrico al comparar contra el grupo control, tratado únicamente con agua. El compuesto atropina provocó una disminución del 93,1 % en el vaciamiento gástrico, mientras que las dosis de 500 mg/kg y 300 mg/kg del EALp disminuyeron en 40,7 % y 47,5 % respectivamente. Esto porque la concentración del colorante fue mayor en los tres grupos mencionados, como se observa en la Figura 5B.

Al administrar EALp en dosis de 150 y 75 mg/kg el efecto observado no presentó diferencia significativa respecto al control (Figura 5B).

## DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó la actividad farmacológica de un extracto acuoso de hojas de *L. platypus* en lesiones gástricas inducidas por dos diferentes agentes, así como varios parámetros asociados a la secreción gástrica y el efecto en la motilidad gastrointestinal. Este reporte establece la primera evidencia de un extracto de esta planta y su efecto sobre la motilidad gástrica, además de apoyar el efecto antiulceroso reportado anteriormente con un extracto diferente que arrojó mecanismos de gastroprotección nuevos para esta especie.

Los resultados obtenidos demuestran que dosis altas de EALp confiere efectos gastroprotectores en varios modelos animales. Los agentes necrotizantes, como el EtOH, inducen daño en la mucosa gástrica por mecanismos asociados a la disminución en los factores gastroprotectores y una estasis en el flujo sanguíneo gástrico [22].

Estos fenómenos incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, aumentan la peroxidación lipídica y disminuyen la producción de moco gástrico [23].

En este modelo, el EALp induce un efecto gastroprotector incluso superior al SUC. Estos resultados sugieren un efecto local en la neutralización de contenidos estomacales y un efecto protector tisular, el cual podría relacionarse con un incremento en los factores protectores de la mucosa gástrica, como moco y bicarbonato [21, 24]. Estos mecanismos pueden verse potenciados por el efecto antiinflamatorio demostrado histológicamente a partir de la disminución en el edema y en la infiltración leucocitaria, que autores como Ahmad y colaboradores [25] asocian con una inhibición en la producción de citoquinas proinflamatorias.

En otro modelo, se observó que la supresión de la síntesis de prostaglandinas incrementa la susceptibilidad a lesiones sobre la mucosa gástrica. El tratamiento previo con EALp disminuyó significativamente este efecto, demostrando protección en este modelo ulcerogénico y sugiriendo una asociación de dicha actividad con los niveles de prostaglandinas locales. Además de confirmar su efecto preventivo ante la irritación directa sobre la mucosa. Da Silva et al. [26] proponen que una dosis aguda de un compuesto que tenga el potencial de prevenir alteraciones en los niveles de prostaglandinas locales y brindar protección directa a la mucosa gástrica, tal como lo mostrado por EALp, se asocian a una actividad gastroprotectora eficiente. Esto permite plantear un mecanismo dual de protección para el EALp. Además, nuevamente se confirma la prevención del efecto lesivo a nivel histológico, ya que se demostró una disminución en la infiltración leucocitaria y así un efecto antiinflamatorio que potencia el efecto gastroprotector [27].

Luego de demostrar la actividad biológica independiente del agente que se administre, quedó analizar mecanismos que atribuyan dicho efecto a la inducción positiva en el balance de los factores

de gastroprotección. Para esto, se trabajó con el modelo de ligadura pilórica, el cual induce lesiones a través de la acumulación de fluidos gástricos y la interferencia en el fluido sanguíneo local. Además facilita el análisis de otros parámetros de secreción gástrica [21, 28]. En este biomodelo, el tratamiento con EALp modifica casi todos los parámetros analizados. Este extracto aumentó significativamente el volumen de fluidos gástricos, al mismo tiempo que disminuyó la acidez de dicho contenido. Este comportamiento se diferencia al control tratado con RAN, en el cual la disminución no se ve acompañada con aumento de contenido gástrico.

Ishizuka y colaboradores [29] sugieren que el control de las secreciones ácidas son mecanismos fundamentales en la prevención de úlceras gástricas, de manera que estos resultados permiten sugerir otro eventual mecanismo de gastroprotección para el EALp. En conjunto con el aumento en el volumen gástrico, es sensato sugerir un efecto secretor básico por parte del EALp, el cual apoyaría la actividad observada en los biomodelos mencionados anteriormente.

El moco gástrico se considera el principal factor de protección al ser la primera barrera sobre la mucosa gástrica [1]. El extracto analizado en este trabajo, al igual que el reportado anteriormente por Orozco-Aguilar et al. [17], indujo un aumento en la cantidad de moco gástrico recolectado en el modelo de ligadura pilórica. Esto se podría asociar con los efectos sobre las prostaglandinas sugeridos anteriormente [3, 30]. Nuevamente se apoya la hipótesis de un eventual mecanismo de gastroprotección dual.

Tal como se ha mencionó anteriormente, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno afectan negativamente la estructura gástrica [2, 30]. Se ha demostrado que estos compuestos alteran la permeabilidad de la mitocondria induciendo incluso la muerte celular [31].

En este trabajo se utilizó como marcador del daño oxidativo el MDA liberado. El EALp demostró

brindar protección antioxidante en dos métodos diferentes, daño oxidativo inducido por la ligadura pilórica y potenciado por TBPH. Se sugiere que EALp disminuye el efecto de la hipoxia/reperfusión, protegiendo ante el daño provocado por las especies reactivas de oxígeno y disminuyendo la infiltración leucocitaria [19]. Este comportamiento se encuentra ausente en el grupo tratado con RAN, coincidiendo con reportes previos [32]. Nuevamente se justifica la gastroprotección observada en los modelos de inducción de úlceras por EtOH e indometacina.

El efecto marcado en la acumulación de líquidos gástricos permitió plantear un mecanismo protector, pero también la posible actividad sobre la motilidad gastrointestinal. Además se ha demostrado que los desórdenes en el vaciamiento gástrico se asocian a daño tisular [21, 33].

La evaluación biológica en la motilidad gastrointestinal demuestra que el EALp interfiere en el vaciamiento gástrico, mas no así en el tránsito intestinal. Este efecto se analizó a dosis menores por los resultados obtenidos en el modelo de ligadura pilórica. Esto a diferencia del tratamiento con atropina utilizado como control. Este último altera la vía colinérgica, la cual controla mayoritariamente el flujo desde el estómago hacia el duodeno. Sin embargo, la inhibición parcial del vaciamiento gástrico sin efecto sobre la motilidad intestinal mostrado por el EALp sugiere la relación parcial con la vía colinérgica o bien la asociación con otros mediadores gástricos [21, 34]. Por otra parte, Rozza y colaboradores [1] asocia la disminución en el vaciamiento gástrico con la subsecuente reducción en el área superficial gástrica, provocando un menor contacto efectivo con los factores gastrolesivos, contribuyendo así a los efectos descritos anteriormente.

## CONCLUSIONES

Este trabajo permite concluir que el tratamiento con dosis altas de EALp brinda un efecto gastroprotector en modelos animales de ulceración con EtOH e indometacina y el modelo de ligadura pilórica asociado con la disminución en

las secreciones ácidas, el aumento de la secreción de moco en el tejido gástrico y el efecto antioxidante que en conjunto hacen posible un aumento en las defensas físicas sobre la mucosa gástrica, además de provocar una disminución en el vaciamiento gástrico que puede potenciar el efecto anterior.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica bajo el proyecto N° B6-164. Se extiende un agradecimiento al Ph.D. Pedro García y Lic. Luis Poveda Álvarez por facilitar el material vegetal, además de a las Ph. D. Gabriela Azofeifa y Ph. D. Silvia Quesada por el asesoramiento en los ensayos de peroxidación lipídica.

## REFERENCIAS

1. Rozza A, Hiruma Lima C, Takahira R, Padovani C, Pellizzon C. Effect of menthol in experimentally induced ulcers: Pathways of gastroprotection. *Chem-Biol Interact.* 2013; 206: 272-278.
2. García Barrantes P, Badilla B. Anti-ulcerogenic properties of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) standardized extract in rodent models. *J Ethnopharmacol.* 2011; 134: 904-910.
3. Zakaria ZA, Balan T, Suppaiah V, Ahmad S, Jamaludin F. Mechanism(s) of action involved in the gastroprotective activity of *Muntingia calabura*. *J Ethnopharmacol.* 2014; 151: 1184-1193.
4. Al-Sayed E, El-Naga R. Protective role of ellagitannins from *Eucalyptus citriodora* against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Impact on oxidative stress, inflammation and calcitonin-gene related peptide. *Phytomedicine.* 2015; 22(1): 5-15.
5. Wallace J. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: Why doesn't the stomach digest itself?. *Physiol Rev.* 2008; 88: 1547-1565.
6. Zapata Colindres JC, Zepeda Gómez S, Montaña Loda A, Vázquez Ballesteros E, Villalobos J, Valdovinos Andraca F. The association of *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peptic ulcer disease. *Can J Gastroenterol.* 2006; 20(4): 277-280.
7. Chen H, Liao H, Liu Y, Zheng Y, Wu, X, Su Z, et al. Protective effects of pogostone from *Pogostemonis*



- herba* against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Fitoterapia*. 2015; 100: 110–117.
8. Morsy M, Heeba G, Abdelwahab S, Rofaeil R. Protective effects of nebivolol against cold restraint stress-induced gastric ulcer in rats: Role of NO, HO-1, and COX-1,2. *Nitric Oxide*. 2012; 27: 117-122.
  9. Júnior FEB, de Oliveira DR, Boligon AA, Athayde ML, Kamdem JP, Macedo GE, et al. Protective effects of *Croton campestris* A.St-Hill in different ulcer models in rodents: Evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. *J Ethnopharmacol*. 2014; 153: 469-477.
  10. Lau JY, Sung J, Hill C, Henderson C, Howden CW, Metz DC. Systematic review of the epidemiology of complicated peptic ulcer disease: incidence, recurrence, risk factors and mortality. *Digestion*. 2011; 84: 102–113.
  11. Borelli F, Izzo AA. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother Res*. 2000; 14: 581–591.
  12. García-González M, Morales C. Análisis de la literatura sobre plantas medicinales en Costa Rica (1930-2001). *LANKESTARIANA*. 2005; 5 (1), 3-40.
  13. Rocha GF, do Amaral Costa IM, Rodrigues da Silva JB, Farias da Nóbrega R, Galvao Rodrigues FF, Martins da Costa JG, Goncalves Wanderley A. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol*. 2011; 137: 886 – 892.
  14. Chen H, Liao H, Liu Y, Zheng Y, Wu X, Su Z, Zhang X, Lai X, Lin Z, Su Z. Protective effects of progostone from *Pogostemonis Herba* against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Fitoterapia*. 2015; 100: 110 – 117.
  15. Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional.2014-2023. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>. Accesada 23 de setiembre del 2016.
  16. Condit R, Pérez R, Daguerre N. *Trees of Panama and Costa Rica*. Princeton University Press, Princeton. 1<sup>st</sup> edition 2011, pp 130-131.
  17. Orozco-Aguilar J, Chavarría-Rojas M, Alvarado G, Cordero-García E, Morales-Acuña JA, Retana-Salazar A, González-Camacho S. Actividad gastroprotectora del extracto etanólico de hojas de *Licania platyus* (Hemsl.) Fritsch. *Rev Med UCR*. 2017; 11 (1): 1-11.
  18. Shay H, Komarov SA, Fels SS, Meranze D, Gruenstein M, Siplet H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology*. 1945; 5: 43-61.
  19. Li WF, Hao DJ, Fan T, Huang HM, Yao H, Niu XF. Protective effect of chelerythrine against ethanol-induced gastric ulcer in mice. *Chem-Biol Interact*.2014; 208: 18-27.
  20. Azofeifa G, Quesada S, Pérez AM. Effect of the microfiltration process on antioxidant activity and lipid peroxidation protection capacity of blackberry juice. *Rev Bras Farmacogn*. 2011; 21 (5): 829-834.
  21. Caldas GFR, Costa IMA, da Silva JBR, da Nóbrega RF, Rodrigues FFG, da Costa JGM, Wanderley AG. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol*. 2011; 137: 886-892.
  22. Andreo MA, Ballesteros KVR, Hiruma-Lima CA, Rocha LRM, Brito ARMS, Vilegas W. Effect of *Mouriripusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. *J Ethnopharmacol*. 2006; 107: 431-441.
  23. Choi HS, Lim JY, Chun HJ, Lee M, Kim ES, Keum B, et al. The effect of polaprezinc on gastric mucosal protection in rats with ethanol-induced gastric mucosal damage: Comparison study with rebamipide. *Life Sciences*. 2013; 93: 69-77.
  24. Mishra V, Agrawal M, Onasanwo S, Madhur G, Rastogi P, Pandey HP, et al. Anti-secretory and cyto-protective effects of chebulinic acid isolated from the fruits of *Terminalia chebula* on gastric ulcers. *Phytomedicine*. 2013; 20 (6): 506-511.
  25. Ahmad A, Gupta G, Afzal M, Kazmi I, Anwar F. Antiulcer and antioxidant activities of a new steroid from *Morus alba*. *Life Sciences*. 2013; 92: 202–210.
  26. da Silva L, Allemand A, Mendes D, dos Santos A, André E, de Souza L, et al. Ethanolic extract of roots from *Arctium lappa* L. accelerates the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the antioxidant system. *Food Chem Toxicol*. 2013; 51: 179-187.
  27. Nelson KK, Melende JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med*.



2004; 37: 768-784.

28. Patel AV, Santani DD, Goyal RK. Antiulcer activity and the mechanism of action of magaldrate in gastric ulceration models of rat. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2000; 44: 350-354.
29. Ishizuka N, Imazeki N, Senoo A, Sakurai J, Sonoda M, Kanazawa M, et al. Cell proliferation in ventromedial hypothalamic lesioned rats inhibits acute gastric mucosal lesions. *Obes Res Clin Pract.* 2012; 6: e233-e240.
30. Chakraborty S, Stalin S, Das N, Choudhury ST, Ghosh S, Swarnakar S. The use of nano-quercetin to arrest mitochondrial damage and MMP-9 upregulation during prevention of gastric inflammation induced by ethanol in rat. *Biomaterials.* 2012; 33: 2991-3001.
31. Abdelwahab SI. Protective mechanism of gallic acid and its novel derivative against ethanol-induced gastric ulcerogenesis: Involvement of immunomodulation markers, Hsp70 and Bcl-2-associated X protein. *Int Immunopharmacol.* 2013; 16: 296-305.
32. Zaman RU, Akhtar MS, Khan MS. Anti-ulcer activity of NS-EA 51: A fraction of *Nigella sativa* seed, in histamine plus pylorus-ligated and hypothermia plus restrain stressed rat models. *J Pharm Research.* 2013; 6: 16-20.
33. Takeuchi K, Tanaka A, Araki H, Komoike Y, Takeeda M. Roles of COX-1 and COX-2 inhibition in NSAID-induced gastric in rats: relation to gastric hypermotility response. *Gastroenterol.* 2001; 120: A594.
34. Chiba T, Bharucha AE, Thomforde GM, Kost LJ, Phillips FS. Model of rapid gastrointestinal transit in dogs: effect of muscarinic antagonists and a nitric oxide synthase inhibitor. *Neurogastroenterol Motility.* 2002; 14: 535-541.

## CORRESPONDENCIA

Orozco Aguilar, Josué

e-mail: [josue.orozco@ucr.ac.cr](mailto:josue.orozco@ucr.ac.cr)

