



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

Facultad de Química – Farmacia
Departamento de Farmacia

**Tesis para optar por el Título de Licenciado en
Ciencias Farmacéuticas**

***Evaluación de la actividad antiinflamatoria del
extracto hidroalcohólico de Agave brittoniana T.
en un modelo de colitis ulcerativa.***

Autor: Eniel Fernández Triana.

Tutores: Dra. Leisy Nieto Reyes.

MSc. Yisel González Madariaga.

Lic. Dayli Santiesteban Muñoz.

Santa Clara

2014

Exergo

...La ciencia no es, ni misterio de iniciados, ni privilegio de los aristócratas de la mente, sino el medio único que tiene el hombre para explicarse las leyes de la vida...

José Martí

Dedicatoria

A mi mamá, por el infinito amor que me brinda y por todos los sacrificios.

A mis Hermanos, por ser mi referente y mi orgullo.

A mi Padrastro, por ser mi guía y ejemplo.

A TODOS LOS AMO.

Agradecimientos

- ❖ *En especial a mi mamá, mis hermanos y mi padrastro por su gran apoyo, cariño y constante preocupación hacia mí durante todos estos años, facilitando así que hoy se haga realidad este sueño.*
- ❖ *A toda mi familia, por su apoyo incondicional.*
- ❖ *A mis tutoras Leisy Nieto, Yisel González y Dayli Santiesteban que me brindaron su dedicación, apoyo y sabiduría hasta el final.*
- ❖ *A Idiana Rosa por su amor, cariño y comprensión.*
- ❖ *A mis compañeros de aula, en especial a Rogelio, Neybi, Yenisbel, Yadira y Arlety, con los que he compartido momentos buenos y malos en todo el transcurso de la carrera.*
- ❖ *A mis amigos Andy, Maikel y el Nene por estar siempre presentes cuando los he necesitado.*
- ❖ *A todos los profesores, que al ofrecer sus conocimientos hicieron posible mi preparación durante todos estos años.*

A TODOS MUCHAS GRACIAS.

Resumen

La colitis ulcerativa (CU) es un proceso inflamatorio crónico y recidivante, de etiopatogenia desconocida, limitada a la mucosa y la submucosa colorrectal, con distribución difusa y continua. El *Agave brittoniana* Trel.ssp. *Brachypus.*, especie endémica de la región central de Cuba, contiene dentro de sus metabolitos secundarios saponinas esteroidales, que pueden presentar múltiples acciones farmacológicas, como: antiinflamatoria y protectora de la mucosa intestinal. En este trabajo se llevó a cabo la evaluación farmacológica como antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de las hojas de esta planta en CU inducida por ácido acético 2,5%, en ratas Sprague Dawley. Se conformaron cuatro grupos experimentales de 8 animales: Grupo 1: sanos; Grupo 2: inducción sin tratamiento, Grupo 3: inducción tratado con prednisolona (10 mg/kg) y Grupo 4: inducción tratado con extracto (600 mg/kg). Se evaluó la variación de peso corporal considerándose que se afectó negativamente en grupos con CU inducida, observándose incremento del peso corporal de animales tratados con el extracto, estadísticamente similar al grupo sano. El índice de daño colónico en el grupo de animales tratados con el extracto hidroalcohólico fue significativamente menor a los restantes grupos que recibieron el inductor. La determinación de los parámetros bioquímicos mostraron que los valores de malondialdehído (MDA) fueron similares y que la mieloperoxidasa (MPO) disminuyó discretamente, en relación con los grupos restantes; mientras que la catepsina disminuyó significativamente, resultado consecuente con bajo índice de necrosis y daño hístico en colon. El extracto hidroalcohólico de *Agave brittoniana* T. mostró cualidades adecuadas como tratamiento potencial para colitis ulcerativa.

Abstract

Ulcerative colitis (UC) is limited to the mucosa and submucosa colorectal, diffuse and continuous distribution with chronic and recurrent inflammatory process, of unknown etiology,. The *Agave brittoniana* Trel.ssp. . *Brachypus*, endemic to the central region of Cuba, contains within its steroidal saponins secondary metabolites, which may have multiple pharmacological actions, such as anti-inflammatory and protective of the intestinal mucosa. This work was conducted as an antiinflammatory pharmacological evaluation of hydroalcoholic extract of the leaves of this plant in acetic acid-induced CU 2.5% in Sprague Dawley rats. Group 1: four experimental groups of 8 animals were formed healthy; Group 2: induction without treatment, Group 3: induction treated with prednisolone (10 mg / kg) and Group 4: induction treated with extract (600 mg / kg). The change in body weight was negatively affected considering that in groups with induced CU, increase in body weight observed in animals treated with the extract, statistically similar to healthy group animals were evaluated. The rate of colonic damage in the group treated with hydroalcoholic extract animals was significantly lower than the other groups that received the inductor. The determination of the biochemical parameters showed that the values of malondialdehyde (MDA) were similar and the myeloperoxidase (MPO) discretely decreased in relation to the other groups; while cathepsin significantly decreased, consistent results with low rate of necrosis and tissue damage in colon. The hydroalcoholic extract of *T. brittoniana* *Agave* showed suitable as a potential treatment for ulcerative colitis qualities.

Índice

Introducción.....	1
Problema Científico:.....	2
Hipótesis:.....	2
Objetivo general:.....	3
Objetivos específicos:.....	3
Capítulo I: Marco teórico.....	4
1.1 Aspectos generales del uso de plantas medicinales.....	4
1.2. Familia Agavaceae.....	5
1.3. Inflamación.....	8
1.4. Colitis Ulcerativa o Ulcerosa (CU).	9
Capítulo II: Materiales y métodos.....	22
2.1. Materiales y Reactivos empleados.....	22
2.2. Tipo de estudio.....	23
2.3. Universo.....	23
2.4. Muestra.....	24
2.5. Recolección del material vegetal.....	24
2.6. Caracterización físico-química del extracto.....	24
2.7. Evaluación fitoquímica del extracto.....	26
2.8. Evaluación farmacológica del extracto hidroalcohólico de <i>A. brittoniana</i> en colitis ulcerativa.....	26
2.9. Análisis estadístico.....	31
2.10. Aspectos éticos y de bioseguridad.....	31

Capítulo III: Resultados y discusión.....	33
3.1. Recolección del material vegetal.....	33
3.2. Caracterización físico-química del extracto.....	34
3.3. Evaluación fitoquímica de los extractos.....	35
3.3.1. Determinación cualitativa de los metabolitos presentes en la planta (Tamizaje fitoquímico).....	35
3.4. Evaluación farmacológica del extracto hidroalcohólico de <i>A. brittoniana</i> en colitis ulcerativa.....	36
3.4.1. Variación del Peso Corporal.....	36
3.4.2. Análisis del Peso de los Fragmentos de Colon.....	37
3.4.3. Caracterización macroscópica.....	38
3.4.4. Caracterización microscópica del tejido colónico.....	40
3.4.5. Determinaciones bioquímicas.....	43
Conclusiones	47
Recomendaciones.....	48
Referencias bibliográficas	49

Introducción

La colitis ulcerativa es reconocida como un proceso inflamatorio crónico y recidivante, de etiopatogenia desconocida, limitada a la mucosa y la submucosa colorrectal, con distribución difusa y continua. Provoca diarreas con sangre, dolor abdominal, y a veces fiebre. Suele aparecer entre los 15 y los 30 años, es una enfermedad crónica que evoluciona en forma de brotes o ataques intermitentes, de intensidad variable e independiente para cada brote y que alternan con períodos de remisión, con escasos o nulos síntomas.^[1-7] Los pacientes con colitis ulcerosa tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, un mal que constituye la segunda causa de muerte por cáncer en la población general. Este riesgo es más evidente a partir de los diez años de evolución de la enfermedad y es independiente del grado de la misma. Los afectados por esta enfermedad ven mermada su calidad de vida dado su carácter crónico.^[8] En la actualidad no existe un tratamiento etiológico para la curación de la colitis ulcerosa, y el tratamiento sintomatológico empleado se dirige a controlar la inflamación, reducir los síntomas y la pérdida de líquidos y nutrientes.^[9]

El estudio y validación de productos naturales y de síntesis química, que demuestren su efectividad para paliar el cuadro inflamatorio que se produce en los procesos agudos y de crisis de esta enfermedad, necesita contar con una herramienta eficaz para mimetizar los efectos de esta enfermedad en el humano y que sea sensible a modificaciones tras las diferentes intervenciones farmacológicas. Contar con esta herramienta, caracterizada y estandarizada en nuestras condiciones, permitirá contribuir al conocimiento más profundo de esta patología que aún tiene muchas incógnitas, así como a comprobar posibles terapias preventivas, curativas o paliativas. El empleo de las plantas con fines terapéuticos mantiene aún una amplia validez a

pesar del poderío y de la competencia de la industria farmacéutica; quien, con sus colosales intereses económicos distribuidos por todo el mundo, así como las indudables ventajas ofrecidas por numerosos productos industriales, ha tratado de minimizar esta práctica.^[10, 11] Se conoce que para el año 2020 la población mundial habrá alcanzado la cifra de 7500 millones de habitantes de los cuales el 75 % vivirá en países en vías de desarrollo, que hoy consume menos del 15 % del mercado farmacéutico, lo que hace suponer que esta masa poblacional buscará cada vez más plantas medicinales como principal recurso terapéutico para satisfacer sus necesidades de salud.

El *Agave brittoniana* Trel. spp. *Brachypus* pertenece a la familia agavaceae y se caracteriza por presentar en su composición un alto contenido de fibra vegetal constituida por ceras, polialcoholes, poliazúcares. Además, contiene dentro de sus metabolitos secundarios saponinas esteroidales, las que en dependencia de su estructura pueden presentar múltiples acciones farmacológicas, entre las que se encuentran las propiedades antiinflamatorias. Esta composición fitoquímica de esta planta sugiere que podría ser muy útil en el tratamiento de la colitis ulcerativa, así como en la prevención de una de sus complicaciones principales, el cáncer.

Problema Científico:

No se refiere en la literatura ningún estudio farmacológico que avale la utilidad del *Agave brittoniana* T en el tratamiento de la colitis ulcerativa, a pesar de las potencialidades que presenta, teniendo en cuenta su composición fitoquímica.

Hipótesis:

Si se comprueba experimentalmente el efecto farmacológico del extracto hidroalcohólico de *Agave brittoniana* T en un modelo agudo de colitis ulcerativa, se dispondría de un producto natural candidato a ser empleado en la terapéutica.

Objetivo general:

Estimar el efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Agave brittoniana* T. en un modelo de colitis ulcerativa inducido por ácido acético.

Objetivos específicos:

1. Determinar la variación del peso corporal, durante la evolución del modelo, con vistas a estimar el estado general de salud de los animales.
2. Evaluar experimentalmente el efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Agave brittoniana* T. a través de los índices de daño ulcerativo macroscópico y microscópico.
3. Evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Agave brittoniana* T. a través de la determinación de los parámetros bioquímicos mieloperoxidasa (MPO), malondialdehído (MDA) y catepsina en tejidos colónico de un modelo experimental de colitis ulcerativa.

Capítulo I: Marco teórico

1.2 Aspectos generales del uso de plantas medicinales.

Las plantas medicinales han constituido desde tiempos remotos un recurso de gran importancia, para cubrir las necesidades terapéuticas. Su uso como agentes de la salud es ampliamente conocido en múltiples culturas del mundo y ha sido transmitido a través de generaciones. Este saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, tamizado hoy, por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos; para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta y que permite además la vigencia de su empleo.^[11]

El hombre utiliza las plantas con propósitos medicinales desde tiempos prehistóricos y aún hoy tienen un papel clave en el mantenimiento de la salud de la mayor parte de la población mundial, pese a los avances de la medicina moderna. Esto si se tienen en cuenta las diversas formas en que se utilizan, que van desde la preparación de decocciones e infusiones en zonas rurales y países pobres, pasando por los productos fitoterapéuticos, hasta la obtención de principios activos en países desarrollados para la elaboración de medicamentos. Se estima que en el mundo se utilizan cerca de 10 000 especies vegetales con fines medicinales, la mayor parte en sistemas de medicina tradicional.^[10] La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha determinado que alrededor del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para atender las necesidades primarias de asistencia médica. Analizando el interés por el estudio y empleo de medicina tradicional en la asistencia médica y el reconocimiento de la importancia de las plantas medicinales para el sistema de salud de países en desarrollo, la OMS acordó promocionar la medicina tradicional y establecer pautas para la identificación de medicamentos herbarios que sean inocuos y eficaces.^[12]

Las plantas medicinales representan cerca del 25% del total de las prescripciones médicas en los países industrializados. Sin embargo en los países en desarrollo el uso de las plantas medicinales representa hasta el 80% del arsenal terapéutico tradicional y son utilizadas como materia prima para la producción de extractos o para el aislamiento de sustancias naturales puras, por lo que representan un área en franca expansión.^[13]

1.2. Familia Agavaceae.

1.2.1. Generalidades.

La familia agavaceae se caracteriza por presentar en su composición un alto contenido de fibra vegetal constituida por ceras, polialcoholes, poliazúcares. Además numerosas especies de agave contienen dentro de sus metabolitos secundarios saponinas esteroidales, las que en dependencia de su estructura pueden presentar múltiples acciones farmacológicas entre las que se encuentra sus propiedades antiinflamatorias.^[14] Esta composición fitoquímica de estas plantas sugiere que podrían ser muy útiles en el tratamiento de la colitis ulcerativa, así como en la prevención de una de sus complicaciones principales, el cáncer.

El género Agave, cuyo significado es “noble” o “admirable”, fue dado a conocer por Carlos Lineo en 1753. Dicho género comprende aproximadamente 200 especies, de las cuales el 75 % se encuentran en México, lugar considerado el centro de origen. Junto con el frijol y el maíz, el agave fue una de las primeras plantas cultivadas en Mesoamérica y gracias a su gran cantidad de usos, es también considerado como el “árbol de la vida”.^[15]

1.2.2. Distribución.

Este género se distribuye a lo largo del continente americano en zonas que van desde los 40 grados latitud norte hasta los 20 grados latitud sur. Al norte se encuentra presente en zonas áridas y semiáridas de Norteamérica y México, bajando por las islas del Caribe hasta Colombia y Venezuela. En la cuenca Europea del Mediterráneo fueron introducidas con fines ornamentales, posteriormente se dispersaron fuera de los cultivos y actualmente se encuentran naturalizados.^[15]

El *Agave brittoniana* Trel. subespecie *brachypus* (fam. Agavaceae) es oriunda de la región central de Cuba. Entre otras áreas, crece en la conocida zona protegida Cubanacán, aledaña a la ciudad de Santa Clara. Otra especie, el *Agave legreliana*, también es endémica de la región central de Cuba.^[16-18]

1.2.3. Diferentes Usos del *Agave brittoniana* T.

El estudio del género *Agave*, se encuentra representado prácticamente por las secciones *Rigidae* y *Sisalanae*, las cuales son cultivadas en gran medida para diversos propósitos como son: a.) la obtención de bebidas alcohólicas como el tequila y el mezcal; b.) la obtención de fibras naturales de gran resistencia c.) la obtención de compuestos esteroidales y otros de uso medicinal y agrícola.^[19]

➤ Uso Medicinal.

Desde tiempos muy antiguos en México, el agave ha sido considerado como una planta con propiedades medicinales, sobre todo dentro de la medicina indígena.

Algunos tipos de agave son utilizados para tratar procesos inflamatorios, artritis y fiebre. Las pencas machadas y aplicadas en cataplasma provocan supuración; sirve también para desalojar los piojos de las bestias; las infusión de raíz es depurativa y mezclada con raíces de zarzaparrilla se dice que tiene valor curativo.^[20]

➤ Uso Agrícola.

La fibra es utilizada principalmente para la confección de sacos o costales para el empaquetamiento de granos como el café, también son utilizadas para la elaboración de artículos como alpargatas, colchones, cordelería y tapetes. Las plantas jóvenes son utilizadas para preparar un encurtido; se hierven para quitar lo mucilaginoso y posteriormente se agrega agua, sal y vinagre. Finalmente el sumo de las hojas es utilizado por las lavanderas para el lavado de la ropa delicada.^[20]

1.2.4. Fitoquímica del *Agave brittoniana* T.

La fitoquímica es la ciencia que ha permitido la detección y posteriormente la identificación de los principios activos responsables de alguna propiedad atribuida a alguna planta, tal es el caso de la familia agavaceae que se caracteriza por presentar en su composición un alto contenido de fibra constituida por ceras, polialcoholes,

poliazúcares.^[21] También estudios previos han detectado la presencia de aminas y/o aminoácidos, grasas, aceites esenciales y esteroides.^[22] Además, numerosas especies de agave contienen dentro de sus metabolitos secundarios saponinas esteroidales, las que en dependencia de su estructura pueden presentar múltiples acciones farmacológicas entre las que se encuentra sus propiedades antiinflamatorias, como es el *Agave brittoniana* T.

Esta composición fitoquímica de estas plantas sugiere que podrían ser muy útiles en el tratamiento de la colitis ulcerativa, así como en la prevención de una de sus complicaciones principales, el cáncer.

1.2.5. Clasificación Taxonómica.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida (Monocotiledóneas)

Subclase: Liliidae

Orden: Liliales

Familia: Agavaceae

Género: *Agave*

Subgénero: *Agave*

Sección: Rigidiae

Especie: *Agave brittoniana* T

1.2.6. Descripción de *Agave brittoniana* T.

Dicha planta es de tipo herbáceo suculenta, sus hojas se encuentran dispuestas en forma de roseta, generalmente con espinas en los márgenes o “dientes” y una espina terminal. Es una planta perenne o monocárpicas. Su inflorescencia emerge del centro de la roseta y puede ser en forma de espiga o ramificada, con las flores creciendo en umbelas sobre los pedúnculos laterales, después de varios años de crecimiento llega a alcanzar una altura que sobrepasa los 6 metros y agota la planta que muere poco después. Su reproducción puede ser sexual o asexual mediante los vástagos que emergen de rizomas de la planta madre.^[15]

1.3. Inflamación. Generalidades.

Cuando se produce una rotura de la piel o de las mucosas, los microorganismos pueden pasar del medio externo al interno. Como reacción y en un intento de localizar al agente invasor, se produce una reacción en el tejido conectivo vascularizado que se denomina inflamación. Este complejo proceso produce el acúmulo de fluidos y leucocitos en el espacio extravascular. La inflamación puede ser originada por factores endógenos (necrosis tisular o rotura ósea) o factores exógenos como lesiones por agentes mecánicos (corte, etc), físicos (quemaduras), químicos (corrosivos), biológicos (microorganismos) e inmunológicos (reacciones de hipersensibilidad). Aunque en algunos casos, como la hipersensibilidad, la inflamación puede tener consecuencias nocivas, por lo general es una respuesta protectora que trata de restaurar los tejidos lesionados.^[1, 2] La respuesta inflamatoria está formada por plasma, células circulantes, vasos sanguíneos y constituyentes celulares y extracelulares del tejido conectivo. Entre las células circulantes se incluyen los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y plaquetas. Las células del tejido conectivo son los mastocitos, que rodean los vasos sanguíneos y los fibroblastos. La matriz extracelular consiste en proteínas fibrosas estructurales (colágeno, elastina), glicoproteínas adherentes (fibronectina, laminina, entactina, tenascina y otras) y proteoglicanos. La membrana basal es un componente especializado de la matriz extracelular que consiste en glicoproteínas adhesivas y proteoglicanos.^[1, 2]

Los cinco signos cardinales de la inflamación son:

1. rubor (coloración roja)
2. tumor (hinchazón)
3. calor
4. dolor.
5. pérdida de función

La coloración y el calor se deben a un aumento del flujo sanguíneo en el área traumática y a la constricción de las vénulas. Los cambios de la microcirculación son inducidos por mediadores químicos. Estos mediadores, además, aumentan la permeabilidad capilar con lo que los líquidos y las células sanguíneas pasan al espacio

extravascular provocando la hinchazón y un aumento de la presión local que es el que origina el dolor.

1.3.1. Tipos de inflamación.

La inflamación según su duración se divide en aguda y crónica:

- La aguda es de duración relativamente corta (minutos, horas o unos pocos días), se inicia muy rápidamente y se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos predominantemente neutrófilos.
- La inflamación crónica dura semanas, meses o incluso años y se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos y macrófagos con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo.

Las Enfermedades Inflamatorias Intestinales (EII) constituyen un grupo de enfermedades en las cuales existe una inflamación de la pared intestinal patológica, que tienden a tener una evolución crónica con períodos de actividad y remisión de la inflamación y de etiología aún desconocida. Actualmente las EII incluyen principalmente a tres entidades: la Colitis Ulcerosa (CU), la Enfermedad de Crohn (EC), las dos más importantes, y la Colitis Indeterminada (CI) las cuales poseen en ocasiones similitudes que las hacen difícil de diferenciar. Algunos autores incluyen a la Colitis Microscópica (Colitis Colágena y Colitis Linfocítica) en este grupo; pero nos referiremos en forma independiente.^[1, 2]

1.4. Colitis Ulcerativa o Ulcerosa (CU). Concepto.

Es una enfermedad inflamatoria intestinal que afecta la mucosa del intestino grueso o colon de forma difusa y continua, y no afecta otros tramos del aparato gastrointestinal, de extensión variable, con compromiso rectal en casi todos los casos y afectando rara vez el íleon distal.^[23]

La CU se produce como consecuencia de la acción, en sujetos genéticamente predispuestos, de determinados factores medioambientales y de las bacterias que componen la microflora intestinal normal que desencadenan una serie de eventos, que dan lugar a la pérdida de tolerancia y activación tanto del sistema inmune intestinal como de otras células.^[23, 24] La respuesta inmune celular induce la activación de

linfocitos T efectores, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, etc. La respuesta humoral da lugar a la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. A través de la secreción de mediadores solubles y de la expresión de moléculas de adhesión se produce una amplificación de la síntesis y secreción de anticuerpos y autoanticuerpos, citoquinas, factores de crecimiento, eicosanoides, neuropéptidos, enzimas proteolíticas, radicales libres y óxido nítrico, que lleva al desarrollo de inflamación intestinal y daño tisular que caracterizan a esta enfermedad.

Los síntomas comunes observados en esta enfermedad inflamatoria intestinal son la reducción de la ingesta de alimentos, del peso corporal y del consumo de agua debido a una menor tolerancia a los alimentos y el agua. También se observa incremento en la deposición de heces fecales líquidas o semisólidas con sangre.

Factores como el estrés oxidativo, el aumento de la permeabilidad vascular, la infiltración neutrofílica prolongada y el aumento de la producción de mediadores inflamatorios, están presentes en la fase inicial inflamatoria intestinal humana.^[25, 26]

El malondialdehído es el producto final de la lipoperoxidación lipídica y es un buen indicador del alcance del estrés oxidativo.

La mieloperoxidasa (MPO, EC 1.11.1.7) es una enzima que se almacena en los gránulos azurófilos de los leucocitos polimorfonucleares y es secretada al medio extracelular ante diversos estímulos nocivos; ejerce su actividad catalítica por medio de la formación del ácido hipocloroso (HClO[•]) que es un potente agente oxidante y halogenante de proteínas ejerciendo, entre otras, una actividad bactericida.^[25-27]

Cuando la reacción inflamatoria se exagera hay degranulación masiva provocando la muerte del neutrófilo con la consecuente liberación de MPO y otras enzimas proteolíticas.^[28]

La catepsina D (3.4.4.23) es una proteína con actividad proteolítica. Se encuentra en tejidos animales, cataliza la hidrólisis de proteínas a polipéptidos. Las catepsinas tienen una importancia fundamental en el recambio proteico de las células de mamíferos. Esta enzima constituye un buen indicador de necrosis celular.^[29]

1.4.1. Clasificación:

Existen varias clasificaciones entre las que se encuentran: ^[30]

- Según las zonas afectadas:
 - Proctitis Ulcerosa: La enfermedad se limita al recto, desde margen anal interno hasta unos 15 cm desde el esfínter anal. Representa aproximadamente el 30-42% de los casos.
 - Proctosigmoiditis: La inflamación se extiende hasta sigma. *Colitis distal o izquierda*: La inflamación afecta a recto, sigma y colon descendente hasta ángulo esplénico. Estas dos últimas representan hasta el 44-48% de los casos.
 - Colitis extensa: La inflamación se extiende por colon transverso hasta ángulo hepático.
 - Pancolitis o colitis total: Afecta todo el colon hasta ciego. Ambas representan el 9-17% de los casos.
- Según el curso evolutivo:
 - Crónica-Recidivante: Es la forma más frecuente representando un 70% del total. Se caracteriza por la alternancia de periodos de actividad sintomática con otros de remisión. Puede evolucionar tanto hacia la forma aguda fulminante
 - Crónica-Continua: Constituye un 20% y se produce cuando un brote se extiende más allá de seis meses a pesar de tratamiento, con recidivas frecuentes y seguidas de cortos intervalos de mejoría. Suele acompañarse de complicaciones locales.
 - Aguda-Fulminante: Supone el 10%, siendo la forma más grave de presentación. Comienza de manera brusca con diarrea abundante y rectorragia, pudiéndose acompañar de megacolon tóxico e incluso debutar con un cuadro de perforación colónica de alta mortalidad. Suele ocurrir en el seno de una pancolitis, siendo excepcional en las rectitis.

Clasificación de Montreal para la CU.^[31]

- Según la extensión (E):
 - **E1: Proctitis ulcerosa:** Afectación limitada al recto (el límite superior de la inflamación no supera la unión rectosigmoidea)
 - **E2: Colitis izquierda o distal:** Afectación limitada al colon izquierdo (el límite superior de la inflamación no supera el ángulo esplénico).
 - **E3: Colitis extensa o pancolitis:** Afectación que se extiende más allá del ángulo esplénico.
- Según la gravedad (S):
 - **S0: Colitis en remisión o silente:** No hay síntomas de la enfermedad.
 - **S1: Colitis leve:** Cuatro o menos deposiciones al día con sangre, sin fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia, ni aumento de la VSG.
 - **S2: Colitis moderada:** Criterios intermedios entre leve y grave, siempre con signos de afección sistémica leves.
 - **S3: Colitis grave:** Seis o más deposiciones diarias con sangre, fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia y aumento de la VSG, a menudo con signos de afectación sistémica grave.

1.4.2. Etiopatogenia.

Las causas principales de la CU continúan siendo una incógnita, aunque cada vez se conoce más su patogenia. En términos generales, se considera que existe un factor iniciador (un factor medioambiental en un sujeto genéticamente predispuesto) que provoca una pérdida de la tolerancia inmunológica a la flora intestinal saprófita, induciendo una respuesta inflamatoria prolongada e inapropiada en la mucosa cólica. A continuación pasaremos a comentar cada uno de los factores implicados.^[32]

1.4.2.1. Factores genéticos.

La probabilidad de que un familiar de un paciente con CU o EC desarrolle la enfermedad es diez veces superior a la del resto de la población. Se estima que entre el 10 y el 20% de los pacientes con CU tienen al menos un familiar de primer grado 18

afectado por la enfermedad. Sin embargo, la concordancia en gemelos monocigotos del 6-14% es menor que en el caso de la enfermedad de Crohn (44-55%). Igualmente, se ha observado que existen más enfermos con CU entre familiares de EC que al revés, lo que hace sospechar que ambas enfermedades comparten una herencia poligénica que confiere a sus portadores una mayor sensibilidad a factores externos que precipitan el desarrollo de EII.^[31, 32]

Se han implicado varios genes que intervienen en la regulación de la inmunidad: genes de la región del complejo mayor de histocompatibilidad, de receptores de linfocitos T e inmunoglobulinas, del sistema del complemento y de citoquinas y moléculas de adhesión.

1.4.2.2. Factores ambientales externos.^[33]

El hecho de que la tasa de concordancia en gemelos monocigóticos sea menor en CU que en EC nos da una idea de la importancia de los factores medioambientales en la aparición de esta enfermedad. Varios son los factores estudiados hasta ahora:

➤ **Tabaco.**

En las primeras observaciones ya se constató la mayor frecuencia de CU entre no fumadores. Se han descrito riesgos relativos de desarrollar CU de hasta un 4,4 en exfumadores, 1 en no fumadores y 0,6 en fumadores activos. Otros autores destacan un efecto beneficioso para la CU. Así, se ha observado que el abandono del uso tabáquico puede asociarse a la aparición del primer brote de CU, que tiene un efecto protector para la CU activa y que puede ser útil para el mantenimiento de la remisión. Incluso, según algún estudio, la exposición en niños al humo del tabaco es factor protector para el desarrollo de CU.^[32, 34]

Aunque no está claro qué sustancias químicas presentes en el humo del tabaco son las causantes de esta asociación, la evidencia de la utilidad de los parches transdérmicos de nicotina asociados a la terapia convencional en la CU leve-moderada orienta a que pueda ser ésta la principal implicada. Se han sugerido como mecanismos responsables, el efecto inhibitorio sobre los linfocitos T colaboradores tipo 2 (predominantes en la respuesta inmune celular de la CU), el incremento de la

producción colónica de mucina y la capacidad de alterar la motilidad intestinal. Otros estudios, sin embargo, no han demostrado tal utilidad.

➤ **Dieta.**

Puesto que lo que ingerimos supone la mayoría de los antígenos no bacterianos presentes en el tubo digestivo, parece lógico suponer que la dieta pueda tener influencia sobre la susceptibilidad de desarrollar CU. Existen varios estudios caso-control en los que se han examinado diversos hábitos dietéticos, aunque en general presentan numerosos sesgos que dificultan la interpretación de sus resultados.

Se ha asociado el consumo de hidratos de carbono refinados (en EC, sin que se haya demostrado relación en CU) y la “comida rápida”, el reciclaje de aceite y el uso de distintos tipos de aceites implicados en la cadena del ácido araquidónico como factores de riesgo. Por otro lado hay datos que sugieren un posible efecto beneficioso la suplementación dietética con ácidos grasos poliinsaturados.

La fibra, en relación con la producción de ácidos grasos de cadena corta (fundamentalmente butirato) tendría un efecto protector, y se ha mostrado eficaz para mantener la remisión en pacientes con CU.^[33]

La retirada de los lácteos se ha relacionado con una mejoría en el curso clínico de la enfermedad, mientras que su reintroducción se asocia a una reaparición de los síntomas, y parece existir asociación entre la sensibilización a las proteínas de la leche de vaca en la infancia y el desarrollo posterior de CU. Sin embargo, no existe ningún fundamento científico para prohibir el consumo de productos lácteos a los pacientes con EC y CU, ya que hasta ahora ningún componente de la leche ha demostrado ser favorecedor de la inflamación intestinal, ser capaz de desencadenar un brote o causar la enfermedad. Bien es cierto que un determinado porcentaje de personas no son capaces de asimilar totalmente la lactosa de forma que en el colon puede provocar diarrea o gases. Por esta razón, se recomienda limitar el consumo de leche durante los brotes sólo si este consumo de leche aumenta claramente su diarrea.

1.4.3. Síntomas.^[25]

Los síntomas pueden ser más o menos graves. Pueden comenzar gradual o repentinamente. Aproximadamente la mitad de las personas sólo tienen síntomas leves. Otras tienen episodios más graves que ocurren con mayor frecuencia. Muchos factores pueden llevar a que se presenten ataques. Los síntomas abarcan:

- Dolor abdominal (área ventral) y cólicos.
- Un sonido de gorgoteo o chapoteo que se escucha sobre el intestino.
- Sangre y pus en las heces.
- Diarrea, desde sólo unos cuantos episodios a diarrea muy frecuente, que puede conllevar a la pérdida de peso.
- Fiebre.
- Sensación de que necesita evacuar las heces, aunque los intestinos ya estén vacíos. Puede implicar esfuerzo, dolor y cólicos.
- Pérdida de peso.

Otros síntomas que pueden ocurrir con la colitis ulcerativa abarcan los siguientes:

- Dolor e hinchazón articular.
- Llagas (úlceras) bucales.
- Náuseas y vómitos.
- Protuberancias o úlceras en la piel.

1.4.4. Epidemiología:

La CU es una enfermedad de distribución universal pero cuya incidencia ha presentado tradicionalmente importantes variaciones geográficas, existiendo zonas de alta incidencia con entre 6 y 15 casos por 100.000 habitantes, y de baja (Asia y América del Sur) con una incidencia 10 veces menor. En la actualidad, en nuestro país las tasas rondan entre 0,6 a 8 casos por 100.000/año con un valor medio de 3,8.^[35] Además, el llamado gradiente norte-sur se ha hecho cada vez más discreto siendo la incidencia de EC y CU en Asturias semejante a la de los países del norte de Europa.^[36] En cualquier caso, resulta difícil establecer la incidencia y prevalencia real de EII por la diversidad de los métodos diagnósticos empleados en los distintos estudios.

➤ **Raza y etnia.**

Es más frecuente en la raza blanca y en los judíos Ashkenazi centroeuropeos, siendo mínima en la raza negra.

➤ **Edad y sexo.**

La mayor parte de los enfermos inician su enfermedad entre los 15 y los 40 años, con un segundo pico de aparición entre los 55 y los 65 años. En nuestro país hay dos picos máximos de incidencia, uno entre los 25 y 35 años y otro entre los 65-75 años, siendo la edad media de los enfermos de 43,95 (IC 95%:42,48-45,42). Este hecho es de gran importancia para la evolución y el pronóstico, ya que a mayor precocidad del debut, peor suele ser la evolución.

La enfermedad tiende a ser más frecuente en mujeres, aunque muchas otras series no han demostrado diferencias entre ambos sexos.^[37]

1.4.5. Clínica de la colitis ulcerosa.

La clínica de la CU varía según la extensión de la afectación colónica y el grado de actividad inflamatoria de la mucosa. Su inicio suele ser insidioso, de tal forma que el diagnóstico puede retrasarse semanas o meses. En otras ocasiones, en cambio, se presenta de forma grave con un curso rápido semejando cuadros infecciosos con los que debe realizarse el diagnóstico diferencial. Los síntomas más frecuentes de la enfermedad son la rectorragia y la diarrea. El número de deposiciones esta aumentado y su volumen disminuido, como consecuencia de la inflamación rectal, lo que a su vez ocasiona urgencia, tenesmo e incontinencia rectal. Cuando la afectación es intensa se produce la emisión de moco, sangre y/o pus que aparece mezclada con heces de consistencia normal en los casos de rectitis (incluso pueden presentar estreñimiento por enlentecimiento del tránsito colónico en el tramo sano) o sangre aislada, y heces líquidas cuando la afectación es más extensa.

El dolor abdominal suele ser de tipo cólico, estando en relación con el incremento de la tensión en la pared del colon inflamado durante sus contracciones musculares. Otros síntomas sistémicos son astenia, anorexia, pérdida de peso, náuseas, vómitos y fiebre que aparecen junto con el dolor abdominal casi de forma exclusiva en las formas

extensas. Otra sintomatología secundaria puede venir determinada por anemia ferropénica por la rectorragia, por la supresión medular característica de las enfermedades crónicas o secundaria a los fármacos utilizados en el tratamiento como la sulfasalacina, azatioprina o 6-mercaptopurina.

1.4.6. Criterios histológicos:

1.4.6.1. Hallazgos macroscópicos.

La CU es una enfermedad que afecta exclusivamente al colon siendo la distribución de la inflamación variable. La afectación es habitualmente más intensa en el recto y se extiende, de forma continua, en sentido proximal en una longitud variable: entre el 40 y el 50% de los pacientes presentan una enfermedad limitada al recto (rectitis o proctitis ulcerosa) o al recto y sigma (rectosigmoiditis ulcerosa); del 30 al 40 % de los casos muestran afectación inflamatoria más allá del sigma pero sin afectar a todo el colon (colitis izquierda y colitis extensa); el 20% restante desarrollan inflamación que afecta a todo el colon (pancolitis).^[38]

Asimismo puede haber presentaciones atípicas: puede objetivarse una mucosa rectal aparentemente indemne como consecuencia del uso de tratamientos tópicos (supositorios, enemas o espuma), y más raramente en brotes agudos graves, una afectación en el colon proximal mucho más grave que en el recto. Por otro lado, pueden aparecer áreas aisladas de afectación cecal o apendicular en el contexto de una colitis izquierda (parche cecal). Hasta en el 10%, puede observarse una ileítis terminal limitada denominada “ileítis por reflujo”.

En casos de inflamación leve, la mucosa colónica aparece hiperémica, edematosa y granular, mientras que en la afectación grave se observa una mucosa hemorrágica, con lesiones ulceradas inicialmente de pequeño tamaño pero que pueden llegar a confluir y profundizar hacia la lámina propia. Más raramente pueden parecerse a las úlceras lineales serpenteantes de la EC. Con frecuencia los bordes necrosados de úlceras adyacentes conectan entre sí creando puentes mucosos. En la enfermedad de larga evolución suelen aparecer los llamados “pseudopólipos” como resultado de la regeneración epitelial exagerada. Durante los periodos de remisión, la mucosa puede ser macroscópicamente normal, pero tras años de recurrencias va presentando una

aparición atrófica con disminución del diámetro de la luz y pérdida de la haustración normal y persistencia de los pseudopólipos. Más raramente pueden aparecer estenosis fibrosas, aunque mucho menos frecuentemente que en la EC.^[38]

1.4.6.2. Hallazgos microscópicos.

El diagnóstico anatomopatológico de la CU implica una serie de datos característicos, aunque no patognomónicos, a nivel histológico. Los fenómenos inflamatorios se limitan a la mucosa a diferencia de la EC. La lámina propia aparece edematosa y sus capilares dilatados y congestivos con extravasación de hematíes. Existe un infiltrado inflamatorio compuesto por neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, eosinófilos y mastocitos de mayor a menor número. Además ese infiltrado pasa a ser transmucoso. Los neutrófilos invaden el, habitualmente en las criptas, originando los abscesos crípticos característicos de la enfermedad. También pueden invadir la pared de la cripta (criptitis) o producir daño epitelial destruyendo las criptas.^[38] Entre los cambios arquitecturales que ocurren en la cripta destacan:

- ✓ Acortamiento de las criptas y aumento de la separación entre ellas y la muscularis mucosae (lo que se conoce como plasmocitosis basal).
- ✓ Desaparición de las criptas.
- ✓ Bifurcación y ramificación de las criptas.

Es frecuente el acúmulo de células plasmáticas entre el fondo de la criptas y la muscularis mucosae (lo que se conoce como plasmocitosis basal), constituyendo otro dato fiable para el diagnóstico de CU. Desde el punto de vista estructural, además de las alteraciones descritas en las criptas, existe una irregularidad de la superficie epitelial que adquiere un aspecto villiforme o pseudovilliforme. En los casos de mayor gravedad, la superficie epitelial se aplanada y ulcera hasta la muscularis mucosae. En casos de dilatación aguda grave, la ulceración puede incluso alcanzar la muscular propia y dar lugar a un patrón de miocitolisis difusa. Además, los pequeños vasos inmediatamente subyacentes a una zona ulcerada pueden mostrar fenómenos de vasculitis aguda. Todos estos datos también pueden observarse en la EC, sin embargo son más frecuentes en la CU. Igualmente, apoyan el diagnóstico de CU, la existencia de alteraciones más intensas en zonas distales de colon y la intensa depleción de

mucina. En los períodos de remisión clínica, la histología colónica puede regresar a la normalidad, sobre todo en brotes leves al comienzo de la historia natural de la CU; pero con el tiempo es más frecuente la evidencia de distorsión arquitectural con disminución del número de las criptas, glándulas bífidas y acortadas, así como la presencia de otros hallazgos como la metaplasia de las células de Paneth, la hipertrofia neuronal y la hiperplasia fibromuscular de la muscularis mucosae.^[38]

El estudio histológico no sólo es importante desde el punto de vista diagnóstico sino que su examen permite también una evaluación de la actividad de la enfermedad. Este uso de la histología se introdujo en los años 50 evaluando hechos como la naturaleza y distribución del infiltrado inflamatorio, el grado de destrucción glandular y la ulceración. Posteriormente se han desarrollado diversos baremos que se utilizan especialmente para estudios de investigación y que son de especial utilidad en la evaluación de los períodos de actividad de la enfermedad. También es importante en la identificación de complicaciones tardías como la displasia o el cáncer, mediante colonoscopia con toma de biopsias múltiples. Para mejorar la identificación de la displasia se han desarrollado técnicas de citometría de flujo para detectar cambios en el contenido nuclear de ADN, técnicas de inmunohistoquímica para objetivar mutaciones del gen supresor de tumores p53, y otras.

1.4.7. Diagnóstico de la CU.

No existe ningún síntoma ni signo de la enfermedad que sea patognomónico, por lo que para llegar al diagnóstico de CU deben reunirse una serie de datos clínicos, biológicos, endoscópicos, radiológicos e histológicos sugestivos de ella y descartar otras entidades que pueden cursar con sintomatología parecida por inflamación de colon. Los criterios propuestos por Lennard-Jones son los más comúnmente utilizados. Consideran unos criterios de inclusión y otros de exclusión.

1.4.8. Tratamiento de la colitis ulcerosa.

En la actualidad no existe un tratamiento etiológico para la curación de la colitis ulcerosa, y el tratamiento sintomatológico empleado se dirige a controlar la inflamación y reducir los síntomas y la pérdida de líquidos y nutrientes. Algunos investigadores han reportado sustancias de origen natural con actividad antiinflamatoria en la colitis

ulcerativa, como es el caso del producto natural pleural (β -1,3 glucano), aislado de *Pleurotus ostreatus*, y la leptina, hormona producida principalmente por el tejido adiposo. Diversas terapias nutricionales se recomiendan para los pacientes con colitis ulcerativa: glutamina, RNA, aceite de pescado, fórmula multinutriente, gamma ácido linoleico, enemas de butiratos, pancreatina y fibras vegetales. Aunque estas últimas no son digeribles en la porción alta del tracto gastrointestinal, pueden ser metabolizadas por las bacterias intestinales a nivel del colon, para producir ácidos grasos de cadena corta. Se conoce que cuando disminuye la cantidad de ácidos grasos de cadena corta en el colon puede producirse daño a nivel de la membrana de la mucosa lo que se aprecia en el caso de la colitis, donde la ausencia de esta protección convierte inactivo a un segmento del intestino. El estado inflamatorio puede ser revertido por una aplicación intraluminal (enemas) de ácidos grasos o butiratos, aunque tanto en pacientes como en animales de experimentación estos resultados no siempre se obtienen. La suplementación oral con fibras o prebióticos en general, se cree pueda ser una alternativa a la aplicación de los enemas.^[39]

1.4.9. Colitis Ulcerativa (CU) experimental.

En la actualidad se están buscando diferentes estrategias y/o alternativas que contribuyan a dilucidar los mecanismos implicados durante la iniciación, desarrollo y prolongación del proceso inflamatorio que se desencadena en la Colitis Ulcerativa de una forma que no podría ser posible en humanos. Los modelos animales que se han venido utilizando han ayudado a comprender distintos aspectos de la patogenia, uno de ellos es que apoyan la hipótesis de que la iniciación y perpetuación de inflamación intestinal son el resultado de una respuesta inmune exagerada mediada principalmente por linfocitos TCD4+ y macrófagos ante antígenos bacterianos normalmente presentes en el intestino.^[23]

Existe una gran variedad de modelos experimentales de colitis: genéticos o inducidos por agentes químicos. La mayoría de estos modelos han sido desarrollados en roedores, especialmente en rata o en ratón, debido a las características clínicas que en ellos se puede generar siendo muy similares, hasta cierto punto, a las propias de los pacientes con colitis ulcerosa.^[40]

Los modelos animales más empleados para el estudio de esta patología, básicamente están clasificados en cuatro categorías: modelos inducidos por agentes exógenos o químicos, modelos espontáneos, modelos inducidos por manipulación genética y modelos de transferencia de células T a animales inmunodeficientes.

1.4.9.1. Colitis experimental inducida químicamente:

En este grupo se incluyen los modelos experimentales en los que la inflamación intestinal es inducida por la administración de agentes exógenos. Son modelos muy sencillos que permiten estudiar los mecanismos implicados en el desarrollo de la respuesta inflamatoria intestinal. La colitis experimental puede inducirse por medio de la administración de enemas intracolónicos de ácido acético, ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) y oxazolona, o por vía oral, como en el caso de los polímeros sulfatados, siendo el más empleado el Sulfato de Dextrano Sódico (DSS).

- Colitis ulcerativa inducida por ácido acético.

El ácido acético diluido es un agente químico que actúa como un irritante sobre la mucosa del colon a través de la instilación intrarrectal, desencadenando una colitis aguda difusa y transitoria. Puede contribuir a la lesión aguda en la que se desencadena un aumento de algunos marcadores inflamatorios que se correlacionan con la gravedad del proceso inflamatorio intestinal.^[41]

La lesión inicial es una necrosis epitelial que afecta la submucosa y las capas musculares en función de la concentración y el tiempo de exposición. Se caracteriza por engrosamiento del colon, infiltración de linfocitos, macrófagos y neutrófilos, incremento de la permeabilidad de la mucosa y aumento de la producción de óxido nítrico y citosinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8.

Capítulo II: Materiales y métodos

2.1. Materiales y Reactivos empleados:

➤ **Equipos, instrumentos de medición, instrumental:**

- Estufa (Binder USA)
- Molino de cuchillas (KMf 10 basic .IKA^R WERKE)
- Densitómetro (Density Specific Gravity Meter DA-130N, Kyoto)
- Homogeneizador de tejidos (Heidolph)
- Sonicador (Sonics vibracell)
- Micrótopo Tipo deslizamiento horizontal (Reichert)
- Destilador de agua automático (PN 1430 Selecta)
- Balanza analítica (Gibertini)
- Balanza técnica (Sartorius BP410).
- Espectrofotómetro Photolab 6100vis
- Microscopio (Olympus)
- Cristalería variada
- Cánulas esofágicas y rectales
- Instrumental quirúrgico

➤ **Reactivos:**

- Etanol, UNI-Chem.
- n-butanol-piridina.
- Dodecilsulfato de sodio (SDS).
- Ácido tiobarbitúrico (TBA).
- Ácido acético, UNI-Chem.
- Solución Salina Fisiológica (SSF) 0.9%, UNI-Chem.

- o-dianisidina (sigma).
- Tampón de dicloro etano de o-dianisidina.
- Tampón fosfato salino.
- Tampón de HCl-glicocola.
- Solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (BHTA) al 0,5%.
- Tetrametilbencidina (TMB).
- Peróxido de hidrógeno al 1%.
- Butil-hidroxi-tolueno (BHT).
- Triton X-100 al 0,1%.
- Buffer glicina CIH.
- Hemoglobina ácida al 3,3%.
- Tricloro acético al 5%.
- HCl 1N.
- Hidróxido de sodio 0,1 M.
- Tricloruro de hierro (III) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Formaldehido (Formol).
- Agua destilada.

2.2. Tipo de estudio.

Se llevó a cabo un estudio experimental, fitoquímico y farmacológico, del extracto hidroalcohólico de *Agave brittoniana* T. (*A. brittoniana*), en el período comprendido entre los meses de enero y mayo de 2014.

El estudio fitoquímico se realizó en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. El estudio farmacológico del extracto se llevó a cabo en el Centro de Toxicología de Villa Clara.

2.3. Universo.

Se utilizaron ratas Sprague- Dawley, machos, de peso corporal 180 a 200 g provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), sometidas a condiciones de alimentación convencional, agua *ad libitum*, así como ciclo de luz/oscuridad de 12/12, temperatura ambiente de 25°C y humedad controlada de 50% a 70%.

2.4. Muestra.

Se corresponde con 32 ratas machos SD con peso corporal entre 180 a 200g. Una vez terminado el estudio se colectaron muestras de tejido colónico, para determinaciones bioquímicas y análisis histopatológico.

2.5. Recolección del material vegetal.

Las hojas de *Agave brittoniana* T. fueron recolectadas en horas de la mañana en el Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, entre los meses de enero y mayo de 2014. El material recolectado fue trasladado en bolsas de nylon al Laboratorio de Química Farmacéutica del departamento de Licenciatura en Química de la Facultad de Química-Farmacia y lavado con abundante agua potable. Previo al procesamiento del material, se realizó la comprobación botánica de la especie por un experto, el MsC. Idelfonso Castañeda Noa, profesor auxiliar del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Ejemplares de la planta se compararon con muestras identificadas en el herbario localizado en la citada institución, bajo el número de serie HPVC # 5445.

2.5.1. Preparación del material vegetal.

Cada hoja de la planta se cortó en pequeños pedazos, retirándole la corteza, posteriormente se secó mediante calor artificial utilizando estufa Binder (USA) a 50°C, extendiendo estos pequeños pedazos en toda la superficie de la estufa. Las hojas se secaron durante aproximadamente 10 días hasta obtener un peso constante, para luego ser molinadas en un molino de cuchillas con una apertura de malla de 3 mm marca KMf 10 basic .IKA^R WERKE, logrando obtener un polvo fino.

2.6. Caracterización físico-química del extracto.

2.6.1. Obtención del extracto.

Una vez que el material vegetal se encuentra seco y molinado, se procedió a la maceración con agitación manual protegido de la luz, durante 7 días, de 322 g del polvo fino previamente obtenido en etanol al 70%, hasta decoloración total de la mezcla.

El extracto hidroalcohólico obtenido se evaporó a 40° C y presión de vapor, hasta obtener una mezcla pastosa que contiene el crudo de metabolitos, la cual fue colocada en la estufa a 40° C hasta su secado total. La mezcla seca se resuspendió en agua para preparar el extracto blando a una concentración de 60 mg/mL en base a los sólidos totales.

Para la caracterización del extracto se determinaron los siguientes parámetros según se establece en la Norma Ramal de Salud Pública #312: Extractos, fluidos y tinturas. Métodos de ensayo”.^[42]

2.6.2. Características organolépticas.

2.6.2.1. Determinación del olor.

Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de anchura por 10 cm de longitud y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo. Se olió y se determinó si correspondía con la característica del producto.

2.6.2.2. Determinación del color.

Se tomó un tubo para ensayos bien limpio y seco, se llenó hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observó el color verde olivo, no transparencia, ni presencia de partículas y separación en capas.^[42]

2.6.3. Determinación del pH.

Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación del valor del pH de la muestra. Se introdujo directamente los detectores del pH-metro en la muestra y se realizó la lectura.^[42]

2.6.4. Determinación del índice de refracción.

Se colocó sobre el prisma de medición una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio sin cantos agudos, se ajustó el equipo seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

Se realizaron tres lecturas y se calculó el promedio de las mismas.^[42]

2.6.5. Determinación de la densidad relativa.

Se determinó la densidad relativa a las cuatro muestras de ensayo con el densitómetro.

2.7. Evaluación fitoquímica del extracto.

Con el objetivo de profundizar en la composición química del extracto evaluado en el acápite anterior se realizó la evaluación fitoquímica de este, para lo cual se llevó a cabo un tamizaje fitoquímico.

2.7.1. Determinación cualitativa de los metabolitos de la planta presentes en el extracto.

Para evaluar la posible composición química del extracto de *Agave brittoniana* T. en cuanto a metabolitos secundarios se llevó a cabo el tamizaje fitoquímico siguiendo la técnica descrita por Miranda y Cuéllar.^[43]

2.8. Evaluación farmacológica del extracto hidroalcohólico de *A. brittoniana* en colitis ulcerativa.

Se utilizó un modelo agudo de inducción de la colitis, usando como modelo biológico ratas Sprague-Dawley con 18 h de ayuno. Los animales, previamente anestesiados con éter, recibieron una única administración intracolón de 1 mL de ácido acético al 2,5 % para inducir la CU. Antes de la aplicación rectal del irritante, se lavó con SSF 0,9%, el área correspondiente a 8,0 cm de recto, que coincide con el lugar de aplicación. Una vez instilado el ácido acético, se retiró a los 60 segundos de contacto con la mucosa, igualmente con SSF 0,9%. La cánula se introdujo con el auxilio de un lubricante hidrófilo, para evitar cualquier daño mecánico ajeno al modelo de irritación colónica que se evalúa.

Se emplearon cuatro grupos experimentales, de 8 animales cada uno. Fue utilizado como control positivo una suspensión de concentración 1 mg/kg del antiinflamatorio esteroideo prednisolona. El diseño de experimento se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Diseño experimental de la aplicación de los productos evaluados en cada grupo.

Vía de administración	Grupos experimentales			
	I	II	III	IV
Intracolónica	SSF 0,9%	Ácido acético	Ácido acético	Ácido acético
Oral	Agua	Agua	Prednisolona (1mg/kg)	Extracto hidroalcohólico (600mg/Kg)

Las sustancias por vía oral fueron administradas después de inducida la colitis experimental, cada 24 horas. La administración oral se realizó utilizando un catéter esofágico (volumen 5 mL/kg).

Los animales fueron pesados al comienzo del ensayo y previo al sacrificio a las 48 h de la inducción con el ácido acético. Posterior al sacrificio se tomaron las muestras de tejido colónico para su pesaje, el análisis macroscópico, microscópico y las determinaciones bioquímicas.

Las alteraciones intestinales inducidas en el proceso inflamatorio se caracterizaron macroscópica, microscópica y bioquímicamente para ser comparados entre los diferentes grupos.

2.8.1. Caracterización macroscópica.

Después de sacrificadas las ratas, se tomó una muestra del colon similar en daño y longitud (10 cm) en todos los animales de manera aséptica y se colocó sobre una placa con hielo. Se limpiaron de heces y mesenterio con agua destilada y solución salina, se colocaron sobre papel de filtro y se pesaron. Considerando la extensión y la severidad del daño colónico, dos observadores graduaron cada muestra, en una escala de 0 a 10 según como se lista a continuación:

- 0 apariencia normal
- 1 hiperemia
- 2 hemorragia
- 3 una úlcera
- 4 2 sitios de ulceración o más
- 5 ulceración extendida mayor que 1 mm a través de la longitud del colon
- 6-10 si el daño cubre más de 2 cm a lo largo de la longitud del colon. La escala se incrementa en 1 punto por cada centímetro adicional involucrado.

2.8.2. Caracterización microscópica.

Se analizaron muestras de colon (0,5 cm de longitud), de la zona adyacente al mayor daño macroscópico. El tejido colónico se fijó en una solución tamponada de formaldehído (al 4% en tampón fosfato, pH 7,2), durante tres días. Luego se deshidrataron con alcohol a concentraciones crecientes hasta alcohol absoluto y se incluyeron en parafina. Con ayuda de un micrótopo se realizan cortes de 3 – 5 µm, de grosor que son posteriormente teñidos con hematoxilina-eosina para su evaluación histológica mediante microscopía óptica.

Se utilizó la siguiente escala de valoración del daño histológico en el intestino:

- Infiltración leucocitaria -----Ninguna: 0 Leve: 1 Severa: 2
 - epitelio(ILE), lámina propia (ILLP), musculares mucosa ((ILMM), submucosa (ILSM), musculares propia (ILM) y/o serosa (ILS)
- Fibrosis ----- Ausente: 0 Presente: 1
 - mucosa (FM) y submucosa (FSM)
- Marginación de neutrófilos a la submucosa (MNSM): ----Ausente: 0 Presente: 1
- Edema en la submucosa (ESM): ----- Ausente: 0 Parcheado: 1 Confluyente: 2
- Necrosis epitelial (NE): ----- Ausente: 0 Localizado: 1 Extensivo: 2
- Ulceración epitelial (UE): ----- Ausente: 0 Presente: 1

El por ciento de inhibición del daño colónico macro y micro se evaluarán según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición DC} = \frac{\text{IDC}_c - \text{IDC}_t}{\text{IDC}_c} \times 100 \quad (1)$$

Siendo:

DC: Daño colónico.

IDC_c: Índice de daño colónico (macro o micro) grupo control.

IDC_t: Índice de daño colónico (macro o micro) grupo tratamiento.

Donde el índice del daño colónico se determinó por la sumatoria de todos los parámetros evaluados.

2.8.3. Determinaciones bioquímicas.

Fragmentos de colon correspondientes a la zona de mayor daño observable macroscópicamente fueron tomados. Se pesaron fragmentos de 100mg para cada animal, los cuales fueron conservados en nitrógeno líquido las primeras 48 horas, y después en - 40°C para ser procesadas en las primeras 96 horas de su extracción. Se cuantificó la actividad de mieloperoxidasa (MPO), malondialdehído (MDA) y catepsina.

2.8.3.1. Obtención de homogenatos colónicos

Los fragmentos del colon previamente pesados (100mg) y triturados sobre hielo, se homogenizaron (homogenizador Heidolph) en una solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (BHTA) al 0,5% p/v en tampón fosfato salino con una disolución final 1:20 (p/v) durante 1 minuto. Seguidamente, el homogenizado se sonicó (Sonics vibracell) por 20 min, y luego se sometió a tres procesos de congelación/descongelación. Tras la última descongelación el homogenizado se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para la determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO), malondialdehído (MDA) y catepsina.

2.8.3.2. Determinación mieloperoxidasa (MPO, EC 1.11.1.7).

Para este ensayo empleamos la técnica de la o-dianisidina reportada por Payá M y colaboradores, donde la mieloperoxidasa reduce al peróxido de hidrógeno y el oxígeno liberado en esta reacción se combina con o-dianisidina produciendo un compuesto coloreado, la intensidad de color es proporcional a la actividad de MPO.^[44]

Se utilizaron 10 μL del sobrenadante más 200 μL de una solución tampón de dicloroetano de o-dianisidina y posterior adición de 50 μL de peróxido de hidrógeno al 1%. Cada ensayo se realizó por duplicado. La mezcla se incubó durante 3 minutos a 37° C. Seguidamente la muestra se centrifugó a 3 000 rpm durante 5 min. La actividad de la enzima se determinó por el método del punto final en un espectrofotómetro marca Photolab 6100vis a una longitud de onda de 460 nm. Se definió una unidad de actividad de MPO como la cantidad de enzima necesaria para catalizar un incremento en la absorbancia de 0,1 a 460 nm por minuto a 25°C. La actividad específica de MPO se expresó en U/mg de proteína.

2.8.3.3. Determinación del malondialdehído (MDA)

Para la determinación de lipoperóxidos en tejido colónico se empleó una técnica colorimétrica basada en la reacción del TBA descrita por Asakawa y Matsushita,^[45] que producen un compuesto coloreado que se leyó a 535nm en espectrofotómetro marca Photolab 6100vis.

Se añadieron 100 μL de homogenato, 100 μL de H₂O destilada (blanco), 100 μL de disolución patrón o 100 μL de disolución control (muestra control). A continuación se añade la mezcla reactivo (0,1 mL de reactivo antioxidante, 0,1 mL de reactivo catalizador y 1,5 mL de disolución tampón. La mezcla de reacción se mantuvo 60 minutos a 5° C. Transcurrido este tiempo, se llevó a ebullición en un baño de agua a una temperatura entre 95°C y 100°C durante 60 minutos, para desarrollar la máxima coloración en todas las muestras y patrones. Una vez verificada la reacción, se procedió a la extracción de los aductos con 2,5mL de una disolución de n-butanol-piridina (15:1 V/V) y 0,5mL de agua destilada, enfriando previamente los tubos en un baño de hielo. Tras mezclar y centrifugar a 4000 r.p.m. durante 10 minutos, el sobrenadante se leyó a una λ 532nm, frente a un blanco de reactivos. La lipoperoxidación lipídica se reportó en nmoles MDA/g de tejido.^[45]

2.8.3.4. Determinación de la catepsina D (3.4.4.23).^[46]

La actividad de la Catepsina D (3.4.4.23) se determinó por el método de Bowes W y colaboradores (1967),^[29] el cual usa una mezcla de reacciones cuya composición es la

siguiente: Hemoglobina ácida al 3,3%, buffer glicina CIH pH=3 (0,16M) y Triton X-100 al 0,1%. La reacción se inicio por adición de 0,4 mL de homogenizado a 0,6 mL de la mezcla del buffer, sustrato y triton anteriormente señalado y se incubo a 37°C durante 2 horas. El blanco enzima se preparó de idéntica forma pero solo se incubó 2 min.

La reacción se detuvo con la adición de 2 mL de ácido tricloro acético frio al 5%. La actividad enzimática se expresa como (U/g).

En cada ensayo de los parámetros bioquímicos los grampos de proteína presentes en la muestra se determinó según la técnica de Lowry D. y colaboradores (1951).^[47]

Para cada parámetro bioquímico se determinó el % de reducción en los de los grupos de tratamiento (prednisolona y *A. brittoniana*) con respecto al control sin tratamiento.

$$\% \text{ Reduccion} = \frac{\text{Respuesta CST} - \text{Respuesta GT}}{\text{Respuesta CST}} \times 100 \quad (2)$$

Siendo:

% Reducción: porcentaje de reducción de los parámetros bioquímicos.

Respuesta CST: respuesta del parámetro bioquímico del grupo sin tratamiento

Respuesta GT: respuesta del parámetro bioquímico del grupo tratado

2.9. Análisis estadístico:

Los datos fueron procesados por el paquete estadístico SPSS para Windows Versión 8.0. Se determinó la media y desviación standard de los parámetros evaluados para cada grupo experimental, las diferencias entre los diferentes parámetros obtenidos en cada grupo experimental se realizó aplicando ANOVA de una vía. Las comparaciones entre grupos serán realizadas utilizando los tests de Kruskal-Wallis y Mann-Witney con un intervalo de confianza del 95%, en las muestras no paramétricas.

2.10. Aspectos éticos y de bioseguridad.

Todos los experimentos fueron ejecutados cumpliendo los requisitos descritos en el Manual de Bioseguridad del CENTOX, que implican la correcta manipulación de las muestras y desechos biológicos, el uso de los implementos de seguridad para el investigador, así como la ejecución de las pruebas en lugares idóneos, que garanticen

no solo la calidad de la investigación, sino también la protección del personal y del medio ambiente. Se observó el cumplimiento de los principios éticos en la experimentación animal, referente a mantener el bienestar de los animales durante el ensayo y aplicar los métodos aceptados para la ejecución de las técnicas que implique abordaje invasivo del animal. Al concluir la experiencia se procedió al sacrificio por métodos aceptados que no causen dolor y sufrimiento al animal (sobredosis de anestésico, seguido de dislocación cervical).

Capítulo III: Resultados y discusión

3.1. Recolección del material vegetal.

La recolección de hojas de la planta se realizó en el Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, en horas tempranas de la mañana, y se ejecutó de forma manual, como técnica recomendada para plantas silvestres. Se procuró tomar las partes de interés, y dejar hojas suficientes que garantizaran el normal desarrollo de la planta y un uso sostenible de este recurso.

El material vegetal se colectó en buen estado vegetativo y exento de materias extrañas, identificándose a través de herramientas taxonómicas por el experto MsC. Idelfonso Castañeda Noa, profesor auxiliar del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, como *Agave brittoniana* T. Se comparó con la muestra correspondiente a la serie HPVC # 5445 del Herbario UCLV del citado Centro de Estudios, correspondiendo en su totalidad con las características botánicas para la citada especie *Agave brittoniana* T.



Figura 1: Planta de *Agave brittoniana* T en el Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.

De esta manera pudo comprobarse que sus hojas se encuentran dispuestas en forma de roseta, generalmente con espinas en los márgenes o “dientes” y una espina terminal. Son plantas perennes o monocárpicas. Su inflorescencia emerge del centro de la roseta y puede ser en forma de espiga o ramificada, con las flores creciendo en umbelas sobre los pedúnculos laterales, correspondiéndose con la imagen antes mencionada y con lo reportado en la literatura.^[15]

Las hojas recolectadas se lavaron cuidadosamente con agua potable garantizando la limpieza del material vegetal.

Las plantas tras la recolección mantuvieron su normal desarrollo y permitieron realizar varias colectas; lo cual resultó ventajoso desde el punto de vista medioambiental al reducir el impacto sobre la biodiversidad de la zona.

3.2. Caracterización físico-química del extracto.

A partir del polvo fino obtenido de las hojas de *Agave brittoniana* T., se obtiene el crudo de metabolitos del extracto hidroalcohólico, según se describe en el epígrafe 2.6.1.

Al analizar las características organolépticas del extracto se puede plantear que mantiene su olor característico, además se puede observar que presenta un color verde oscuro, con una transparencia definida. No se evidenció la presencia de precipitados, de partículas, ni hubo separación de capas.

Los valores de densidad relativa, índice de refracción y pH para el extracto hidroalcohólico procedente de las hojas de *Agave brittoniana* T. fueron 0,89, 1,39 y 6,5 respectivamente.

Aunque estos parámetros no están normados para este extracto podemos plantear que son adecuados tomando en consideración la correspondencia con otras drogas oficiales.

3.3. Evaluación fitoquímica de los extractos.

Se realizó la evaluación fitoquímica del extracto hidroalcohólico, obtenidos a partir de las hojas de la especie *Agave brittoniana* T. con el objetivo de profundizar en la composición química del extracto para lo cual se llevó a cabo el tamizaje fitoquímico.

3.3.1. Determinación cualitativa de los metabolitos presentes en la planta (Tamizaje fitoquímico).

El tamizaje fitoquímico es ampliamente usado para evaluar la composición de las drogas vegetales, pero es importante señalar que los resultados obtenidos mediante estas técnicas ofrecen solo una visión de la composición química de la planta a estudiar y que no puede tomarse en ningún caso como un resultado concluyente, ya que en la presencia o ausencia de un metabolito pueden influir la concentración de los mismos, la solubilidad en el disolvente empleado y las interferencias de otros componentes.

Los resultados obtenidos en la realización de los ensayos para la determinación de metabolitos presentes en el extracto analizado se muestran en la tabla 2. Se destaca la presencia de alcaloides, triterpenos y/o esteroides, azúcares reductores, saponinas, aminoácidos y/o aminos y glicósidos. Estos resultados demuestran la riqueza fitoquímica de la planta y revelan la presencia de saponinas, metabolito secundario que se conoce que producen acción antiinflamatoria, expectorante, diurética, depurativa, tónico-venosa y de disminución del colesterol. Las saponinas esteroideas sirven como materia prima en la hemisíntesis de hormonas sexuales y corticales.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Guerra y colaboradores, al demostrar la presencia mayoritaria de este tipo de metabolitos.^[22]

Tabla 2: Resultados de la determinación cualitativa de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de *Agave brittoniana* T.

Metabolito	Ensayo	Hojas
Alcaloides	Dragendorff	+
	Mayer	+
	Wagner	+
Triterpenos y esteroides	Liebermann-Burchard	+
Quinonas	Borntrager	-
Cumarinas	Baljat	-
Aceites esenciales y grasas	Sudan III	+
Azúcares reductores	Fehling	+++
Saponinas	Espuma	+++
Fenoles y taninos	Cloruro de hierro (III)	-
Aminoácidos y aminas	Nihidrina	+
Flavonoides	Shinoda	-
Glicósido	Molish	+
Glicósidos cardiotónicos	Kedde-Raymond	-

3.4. Evaluación farmacológica del extracto hidroalcohólico de *A. brittoniana* en colitis ulcerativa.

La suspensión acuosa obtenida a partir del crudo de metabolitos del extracto hidroalcohólico fue administrada al grupo de animales correspondiente, a una dosis de 600 mg/kg de peso. Los resultados fueron comparados con el grupo tratado con prednisolona (1 mg/kg) y con los grupos no tratados (con y sin inducción de la colitis ulcerativa por ácido acético).

3.4.1. Variación del Peso Corporal.

Para el análisis de la variación del peso corporal durante el estudio se aplicó el test de ANOVA de una vía. No se obtuvo diferencias estadísticamente significativa en ningún caso ($p=0,63$). Sin embargo se aprecia una tendencia a la disminución del peso corporal al finalizar la evaluación. Solo el grupo de la colitis sin tratamiento (CST) tuvo una pérdida neta de peso corporal. El grupo tratado con prednisolona, aunque no incrementó el peso al ritmo del grupo sano (SSF), el resultado neto de esta variable fue un incremento neto del peso corporal. En el caso del grupo tratado con el extracto

hidroalcohólico de *Agave brittoniana* T. observamos un incremento del peso corporal similar al grupo sano.

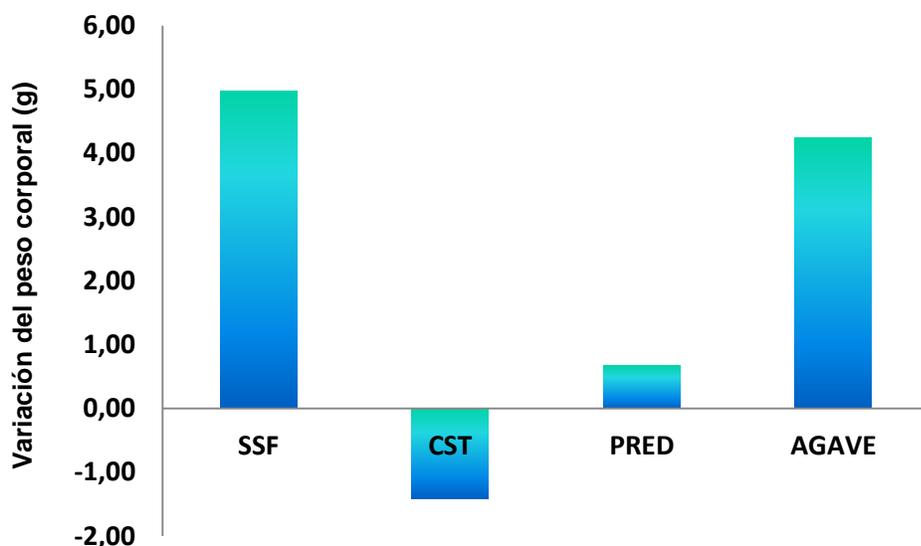


Figura 2: Variación del peso corporal en los grupos en estudio. Los resultados se expresan como la media \pm DE.

La pérdida de peso corporal es una consecuencia de la inflamación a nivel intestinal en el modelo de colitis ulcerativa por ácido acético.

Los resultados de nuestro estudio coinciden con los obtenidos por Espitia y colaboradores (2010).^[48] Este utilizó un modelo agudo consistente en aplicar el ácido acético durante 72 horas, tras lo cual suministró la sustancia de prueba, constatando una tendencia a la disminución del peso corporal. Al igual que en nuestra investigación, los animales con colitis y sin tratamiento tiene una tendencia a la disminución del peso corporal, manteniendo en ese caso un ayuno más prolongado que en nuestras condiciones (36h vs 18h) y una mayor duración del estudio por Espitia (72h vs 48h).

3.4.2. Análisis del Peso de los Fragmentos de Colon.

El peso de los fragmentos de colon obtenidos en cada uno de los animales, fue tabulado (tabla 3). Se observó un ligero incremento del peso del fragmento intestinal de los grupos sometidos al inductor de colitis con respecto al grupo sano (SSF), aunque insuficiente para obtener significado estadístico al aplicar ANOVA ($p > 0,05$)

Tabla 3: Peso de los fragmentos de colon obtenidos en cada grupo de experimentación. Los resultados se expresan como la media \pm DE.

Grupos	Peso del colon (g)
SSF	1,01 \pm 0,30
CST	1,33 \pm 0,43
PRED	1,23 \pm 0,40
AGAVE	1,26 \pm 0,32

3.4.3. Caracterización macroscópica:

Para la caracterización macroscópica del intestino de las ratas objeto de estudio se tuvo en cuenta la extensión y la severidad del daño colónico para cuantificar el Índice de Daño Colónico (IDC).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3, donde se aprecia en el grupo de colitis sin tratamiento (CST) una mayor graduación. En este grupo predominó la presencia de más de un área de ulceración o una úlcera de gran extensión que provocó graduaciones entre 5 y 6. Tanto en el grupo del Agave como en el de la prednisolona el grado de la lesión predominante fue 4, observándose un menor tamaño en las úlceras y la región dañada.

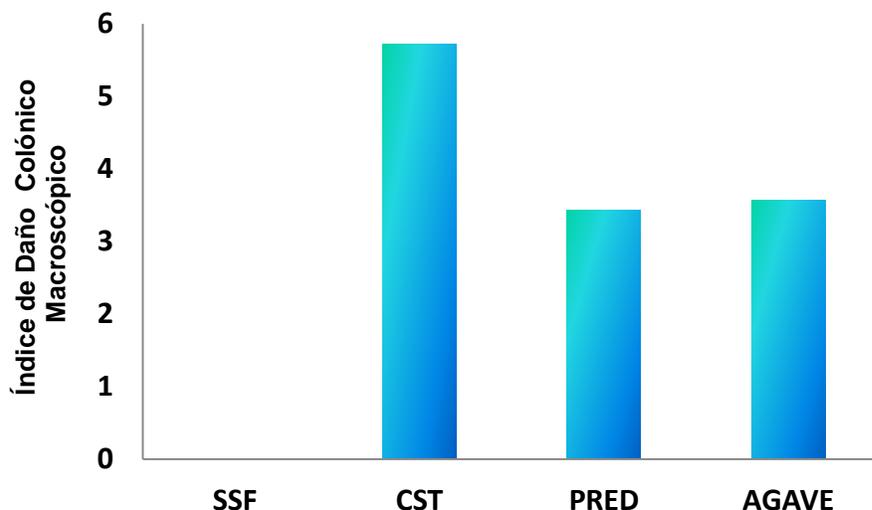


Figura 3: Índice de daño macroscópico en los grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media \pm DE.

Las imágenes que se muestran en la figura 4 son ejemplos de algunas de estas observaciones en los diferentes grupos experimentales.

Al determinar el índice de inhibición de la ulceración, con respecto al grupo CST, según los resultados de la observación macroscópica, el grupo tratado con la prednisolona logró una reducción del daño del 40%, en cuanto al grupo del agave la inhibición fue del 37,5%.

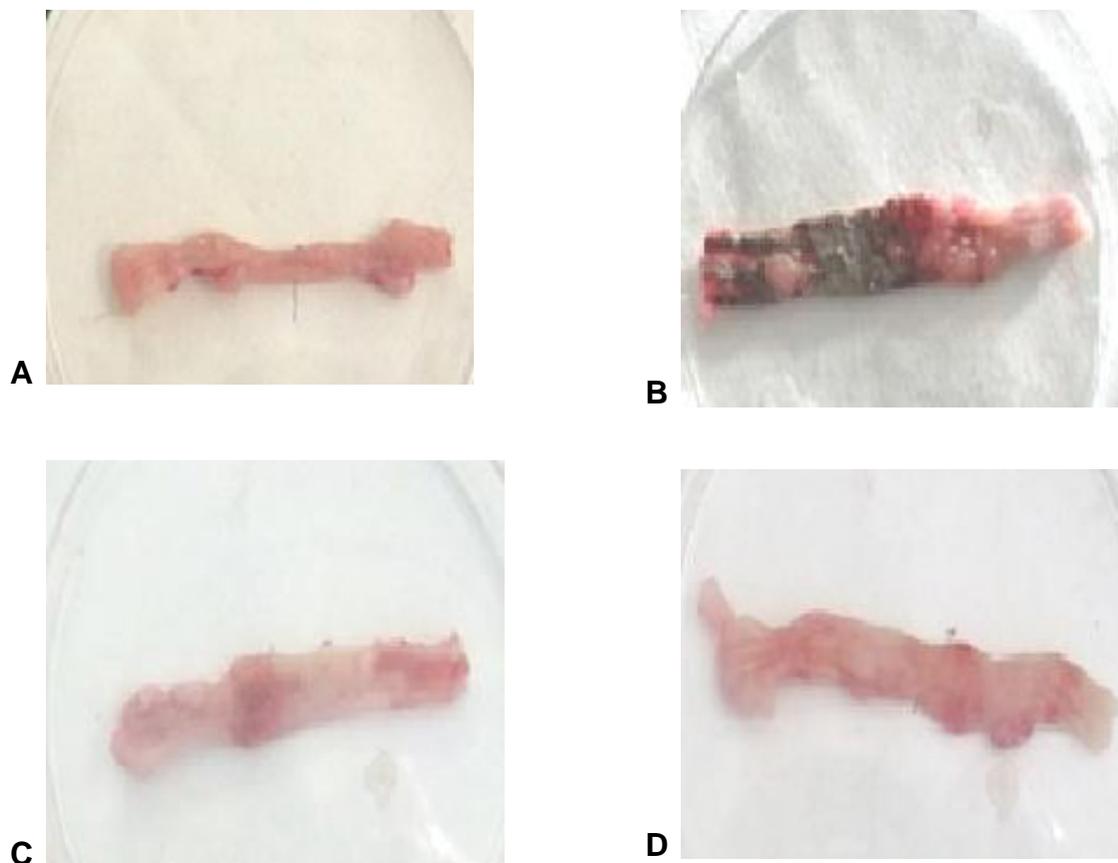


Figura 4: Fragmentos de colon. **A)** Grupo sin colitis: mucosa normal, sin presencia de eritema, ni ulceración. **B)** Grupo de CST: extensa zona de ulceración con necrosis de la mucosa, graduación de 9. **C)** Grupo de la prednisolona: se aprecian zonas de hemorragias, inflamación del tejido y una graduación de 4. **D)** Grupo del Agave: Fragmento de colon con graduación 2 donde se observa una zona de hemorragia sin ulceración.

La CU se presenta solamente en la mucosa del intestino grueso donde se desarrolla el proceso inflamatorio afectándose fundamentalmente el colon, limitándose a la región

distal (recto-ano) del tracto intestinal. La lesión se puede extender progresivamente de forma continua y la inflamación altera las capas superficiales de la pared intestinal esencialmente mucosa y submucosa que presenta un aspecto granuloso consecuencia de la inflamación, también hay necrosis del epitelio, edema e infiltración de células inflamatorias como neutrófilos y eosinófilos en la lámina propia.

Los resultados obtenidos en la reproducción del modelo CU experimental, coinciden con otros autores, que señalan que el ácido acético diluido actúa como un adecuado irritante químico local, provocando lesiones, ulceraciones y un incremento en el peso del tejido colónico de las ratas.^[48]

3.4.4. Caracterización microscópica del tejido colónico:

Posteriormente se realizó la valoración del daño histológico a través de la estimación de la infiltración leucocitaria, la fibrosis, la marginación de neutrófilos a la submucosa, el edema en la submucosa, la necrosis epitelial y la ulceración epitelial. Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la tabla 4.

Los resultados muestran el índice de daño microscópico (ID), determinado aplicando el criterio de Millar y colaboradores^[49] para cada animal y promediando en el grupo las observaciones. El ID que se registró en el grupo sano (SSF), puede estar condicionado por el daño mecánico inherente a la vía de administración que se emplea para obtener el modelo de colitis. En el caso del grupo del extracto hidroalcohólico del agave se observa un ID significativamente menor que en los grupos que recibieron el inductor. Este resultado demuestra el efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de *A. brittoniana*, en este modelo así como su uso potencial en esta afección.

La caracterización microscópica mostró que el grupo CST presentó todos los signos de daño tisular correspondiente a un proceso inflamatorio, con infiltración leucocitaria severa, fibrosis y casos con necrosis epitelial y ulceración epitelial. En otros modelos de CU, como el inducido por TNBS el daño que se aprecia en los estadios iniciales también se caracteriza por focos discretos de necrosis e inflamación.^[50] Los grupos que recibieron tratamiento disminuyeron estos indicadores, siendo más significativo en el grupo del extracto hidroalcohólico del agave (figura 5).

Tabla 4: Índice de daño microscópico para cada uno de los grupos experimentales

PARÁMETROS	SSF	CST	PRED	AGAVE
ILE	0,2	1,88	1,43	0
ILLP	0,2	1,88	1,43	0
ILMM	0,2	2,00	1,60	0
ILSM	0,2	1,88	1,43	0,25
ILM	0,2	1,88	1,43	0
ILS	0	1,50	1,29	0
FM	0	0,88	0,71	0,12
FSM	0,2	1,00	0,71	0,12
MNSM	0,2	1,75	1,00	0,12
ESM	0,2	0,88	1,00	0,12
NE	0,2	0,88	1,00	0,12
UE	0,2	0,88	0,86	0,12
ID	2	17,25	13,89	1

ILE: Infiltración Leucocitaria Epitelial, **ILLP:** Infiltración Leucocitaria Lámina Propia, **ILMM:** Infiltración, Leucocitaria Musculares Mucosa, **ILSM:** Infiltración Leucocitaria Submucosa, **ILM:** Infiltración Leucocitaria Musculares Propia, **ILS:** Infiltración Leucocitaria Serosa, **FM:** Fibrosis Mucosa, **FSM:** Fibrosis Submucosa, **MNSM:** Marginación Neutrófilos Submucosa, **ESM:** Edema Submucosa, **NE:** Necrosis Epitelial, **UE:** Ulceración Epitelial, **ID:** Índice de daño.

La caracterización microscópica mostró que el grupo CST presentó todos los signos de daño tisular correspondiente a un proceso inflamatorio, con infiltración leucocitaria severa, fibrosis y casos con necrosis epitelial y ulceración epitelial. En otros modelos de CU, como el inducido por TNBS el daño que se aprecia en los estadios iniciales también se caracteriza por focos discretos de necrosis e inflamación.^[50] Los grupos que recibieron tratamiento disminuyeron estos indicadores, siendo más significativo en el grupo del extracto hidroalcohólico del agave (figura 5).

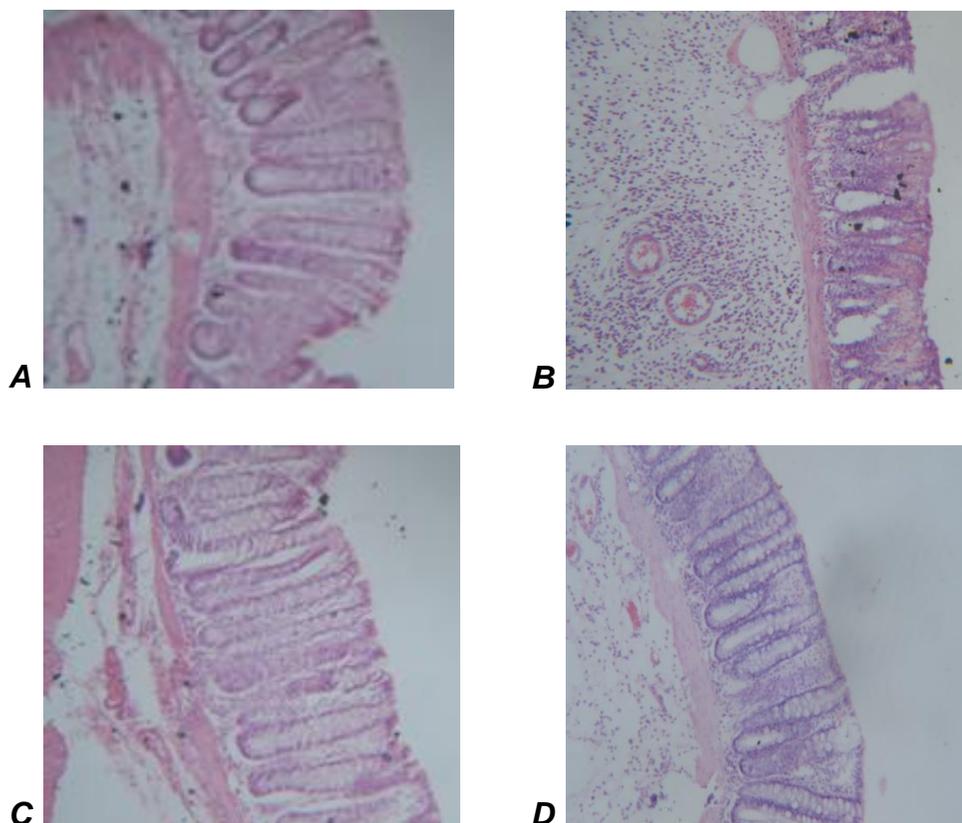


Figura 5: Imágenes de muestras de colon 10x. **A:** Grupo SSF, se observa tejido sin daño. **B:** Grupo CST, se observa criptitis, microabscesos y displasia. **C:** Grupo prednisolona, se observa fibrosis, ulceración y edema focal. **D:** Grupo del Agave donde no se observa daño hístico.

3.4.5. Determinaciones bioquímicas.

Los resultados obtenidos para la determinación de los parámetros bioquímicos mieloperoxidasa (MPO), malondialdehído (MDA) y la catepsina para cada uno de los cuatro grupos experimentales, aparecen reflejados en la tabla 5.

Para la determinación de la variación de los parámetros bioquímicos se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para muestras independientes. Se observaron diferencias significativas para la MPO ($p=0,001$) y la catepsina ($p=0,023$).

Tabla 5. Valores obtenidos para la mieloperoxidasa (MPO), malonilaldehído (MDA) y la catepsina. Los resultados se expresan como la media \pm DE.

Grupos	MPO (U/mg)	MDA(U/g)	CATEPSINA(U/g)
SSF	0	2,30 \pm 0,64	15,24 \pm 8,86
CST	680,04 \pm 461,47	2,36 \pm 2,02	19,83 \pm 8,36
PREDNISOLONA	242,10 \pm 167,81	2,20 \pm 1,53	21,69 \pm 5,81
AGAVE	215,46 \pm 92,81	1,44 \pm 0,94	10,59 \pm 4,30

El MDA, marcador de estrés oxidativo, se comportó de manera similar en todos los grupos evaluados ($p=0,489$). Este resultado permite inferir que no es el ambiente oxidativo el principal factor de generación de daño en este modelo y por tanto su seguimiento o evaluación de productos antioxidantes en este modelo no arrojarían resultados relevantes. Resultados similares obtuvo Korenaga y colaboradores, al evaluar este parámetro bioquímico, pero en un modelo de CU en ratones, por sulfato sódico de dextrano.^[51]

La MPO intestinal, indicador de infiltración leucocitaria, incrementó su valor en todos los grupos expuestos al agente inductor de la colitis. Estos resultados son consistentes con otros autores que han constatado en diferentes modelos de CU aguda la sensibilidad de este parámetro.^[52] A pesar de que se aprecia una tendencia a la disminución de este biomarcador en el grupo tratado con el extracto hidroalcohólico de Agave, no se obtuvo diferencias significativas al comparar con el grupo CST ($p=0,07$), lo cual puede estar condicionado para la desviación estándar alcanzada, así como el tamaño de la muestra, que para este parámetro en específico debe ser mayor que 10 para obtener resultados menos dispersos, con la respuesta del grupo tratado con la prednisolona.

La catepsina, indicador de necrosis tisular, disminuyó significativamente en el grupo tratado con el extracto hidroalcohólico de agave, en relación con el resto de los grupos sometidos al inductor de la colitis ulcerativa ($p<0,05$). De igual forma no se apreciaron diferencias significativas con el grupo sano (SSF). Este resultado es consecuente con

los hallazgos histopatológicos, donde se observó un bajo índice de necrosis y daño hístico en los grupos señalados.

En la tabla 6 se muestran los porcentos de inhibición de la actividad de la MPO, catepsina y lipoperoxidación lipídica (MDA), de los grupos bajo tratamiento farmacológico en comparación con el grupo con colitis que no recibió ningún tratamiento.

Tabla 6: Porcentaje de inhibición de cada uno de los parámetros bioquímicos determinados para cada grupo con tratamiento farmacológico en comparación al grupo con colitis y sin tratamiento.

Grupos	MPO	MDA	CATEPSINA
Prednisolona	62,12	37,35	15,40
Agave	68,32	38,85	46,62

Un estudio de correlaciones de Pearson demostró la relación inversamente proporcional entre la catepsina y la variación de peso corporal ($r = -0,38$). Los parámetros MPO y catepsina mostraron una relación directa ($r = 0,6$). En el resto de las variables no se constató relación.

Tanto para la MPO como el parámetro de lipoperoxidación lipídica, el comportamiento de ambos grupos fue similar, coincidiendo con los resultados mostrados previamente, que refuerzan la utilidad de la MPO como biomarcador para la colitis ulcerativa y para evaluar la recuperación o inhibición del daño tisular. En el caso del MDA en ninguno de los grupos se alcanza más del 40% de inhibición lo cual justifica que este parámetro no resultara de mucho interés para la evaluación de nuestros productos en este modelo. Sin embargo solo la catepsina mostró un % de inhibición de daño tisular cercano al 50% en este modelo para el grupo bajo tratamiento con el *A. brittoniana*, coincidente con los hallazgos microscópicos reportados de menor severidad para este grupo y lo cual es promisorio para el empleo de este producto natural en esta afección.

El empleo del extracto hidroalcohólico de *A. brittoniana* permitió disminuir el daño en mucosa provocado por el agente inductor de la colitis, registrándose menor severidad del proceso ulceroso, incluso con mayor efectividad que la prednisolona.

La MPO intestinal, indicador de infiltración leucocitaria, fue estadísticamente superior al grupo control negativo (SSF), observándose mayores niveles en el grupo de la colitis que no recibió tratamiento farmacológico (CST). Por otra parte la catepsina demostró su sensibilidad en este modelo, el grupo del extracto hidroalcohólico de *A. brittoniana* mostró valores similares al control SSF, lo cual se correlaciona con el diagnóstico histopatológico, donde se observó en la mayoría de los animales del grupo tratado con el producto natural, condiciones similares al tejido del grupo sano, contrario a los grupos de prednisolona y aún más al CST. En el caso del MDA, indicador de estrés oxidativo, no se constataron diferencias significativas entre los grupos experimentales, por lo que este parámetro no resulta ser lo suficientemente sensible para ser tomado en consideración en este modelo.

Las saponinas esteroideas presentes en el extracto hidroalcohólico de *A. brittoniana*, identificación realizada por otros autores,^[53] pudiera contribuir al efecto protector en la mucosa intestinal, conociéndose que estos metabolitos pudieran activar la vía de las prostaglandinas que tienen un efecto citoprotector en la mucosa intestinal previniendo la ulceración y el daño celular.^[53]

Como se puede observar, el extracto hidroalcohólico de *Agave brittoniana* T. muestra cualidades adecuadas para ser tenido en cuenta y continuar desarrollando las investigaciones pertinentes con vistas al desarrollo de medicamentos contra la colitis ulcerativa.

Conclusiones

1. El incremento del peso corporal de los animales en estudio se afectó negativamente en los grupos a los que se les indujo la colitis ulcerativa con ácido acético. No obstante, se observa que el incremento del peso corporal de los animales tratados con extracto hidroalcohólico de *Agave brittoniana* T. fue estadísticamente similar al grupo sano.
2. El índice de daño colónico en el grupo de animales tratados con el extracto hidroalcohólico del *Agave brittoniana* T. fue significativamente menor que el de los restantes grupos que recibieron el inductor.
3. El grupo de animales tratados con extracto hidroalcohólico de *Agave brittoniana* T. mostró que los valores de malondialdehído (MDA) fueron similares a los grupos restantes y la mieloperoxidasa (MPO) disminuyó discretamente. Solo la catepsina disminuyó significativamente, resultado consecuente con un bajo índice de necrosis y daño hístico en el colon.
4. El extracto hidroalcohólico de *Agave brittoniana* T. mostró cualidades adecuadas como tratamiento potencial para la colitis ulcerativa.

Recomendaciones

- Evaluar la actividad farmacológica en otros modelos agudos y crónicos de colitis ulcerativa, así como el potencial hemolítico del extracto hidroalcohólico de *Agave brittoniana* T.

Referencias bibliográficas

1. Bernic, S. and S. Kane, *Inflammatory Bowel Disease. In Diarrhea.* . Humana Press., 2011: p. 61-79.
2. Khor, B., A. Gardet, and R.J. Xavier, *Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease.* Nature., 2011. **474**(7351): p. 307-17.
3. Ueno, Y., et al., *Differential diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease.* Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine. , 2012. **70**: p. 169-175.
4. Dignass, A., et al., *Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis* Zeitschrift für Gastroenterologie. 2011. **49**(9): p. 1276.
5. Masoodi, I., et al., *Biomarkers in the management of ulcerative colitis: a brief review.* German medical science: GMS e-journal. , 2010. **9**(Doc03-Doc03).
6. Vergara, F.O., T.M. Takahashi, and C.Q. Gonzalez, *Conceptos actuales en colitis ulcerativa crónica inespecífica.* Cir Gen. , 2006. **28**: p. 42-49.
7. Gillen, C.D., et al., *Ulcerative colitis and Crohn's disease; a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis.* Gut., 1994. **35**: p. 1590-2000.
8. Kallesøe, J., et al., *Development of colorectal cancer in ulcerative colitis.* Ugeskrift for laeger., 2010. **172**(43): p. 2960-62.
9. Naidoo, K., et al., *Probiotics for maintenance of remission in ulcerative colitis.* Cochrane Database Syst Rev., 2011: p. 12.
10. Standley, J. and L. Williams, *Flora of Guatemala.* . Fieldiana: Botany., 1975. **24**(11): p. 93 - 354.
11. Singh, Y., *Traditional medicine in Fiji: Some herbal folk cures used by Fiji Indians.* J Ethnopharmacol., 1986. **15**: p. 57 - 88.
12. Lyle, E. and J. Simón, *Species and medicinal plants: Recent Advances in Botany.* Horticulture & Pharmacology. 1989. **4**: p. 267:58-9.
13. Girón, L., et al., *Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala.* J Ethnopharmacol., 1991. **34**:173.
14. Cruz Velásquez, S.M., *Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo Evaluación biológica y fisicoquímica de extractos de hojas del complejo laurel (Litsea glaucescens Kunth y L. guatemalensis Mez).* 2012.
15. Rodríguez-Garay, B., *La materia prima Agave tequilana weber var. Azul.*, C.R.d. Tequila, Editor. 2004: México.
16. Roig, T., *"Plantas medicinales, aromáticas o venenosas en Cuba"*. Ed.Ciencia y Técnica, ed. a. ed. 1974, La Habana.
17. Alvarez de Zayas, A., *"Los agaves de las Antillas"*. Vol. 57. 1995, México. 37-48.
18. León, H., *"Flora de Cuba"*, ed. Cultural. 1946, La Habana.

19. Ruvalcaba-Ruiz, D. and B. Rodríguez-Garay, *Aberrant meiotic behavior in Agave tequilana weber var. azul*. BMC Plant Bioloy 2002. **2**(10): p. 1-14.
20. Mrad Ortega, A., *Algunos aspectos de los géneros Agave y fourcrea como causante de enfermedades ocupacionales. pp 77-78*, in *Química Farmacéutica de la Universidad Nacional de Colombia*, Universidad Nacional de Colombia: Colombia.
21. Gonzáles-Elizondo, M., et al., *Plantas Medicinales del Estado de Durango y zonas aledañas*. Dirección de publicaciones del Instituto Politécnico Nacional, 2004.
22. Agrawal, P.K., et al., "*Carbon -13spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins*". Phytochem, 1985. **2424**: p. 2479-2496.
23. Mañe, J., *Modelos experimentales in vivo de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal. Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad*. Nutrición Hospitalaria. 2007. **22**(2): p. 178-189.
24. Porras, M., *Inflamación intestinal y dismotilidad en un modelo experimental de Enfermedad Inflamatoria Intestinal en la rata: mecanismos de acción implicados en la ciclicidad y cronicidad*. . 2006, Universidad Autónoma de Barcelona.
25. Perán Montero, L., *Efecto antiinflamatorio intestinal de probióticos en el modelo de Colitis Ulcerativa experimental inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico en ratas.*, in *Departamento de Farmacología*. 2007, Univercidad de Granada, Facultad de Farmacia.: Granada.
26. Bailon, E., et al., *DNFB-DNS hapten-induced colitis in mice should not be considered a model of inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**:2087–101.
27. Malle, E., et al., *Myeloperoxidase-mediated oxidation of highdensity lipoproteins: Fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins*. Archive of Biochemistry and Biophysics., 2006: p. 445 : 245-255.
28. Vargas, M.P.S., et al., *Incremento de la actividad de mieloperoxidasa plasmática en pacientes con asma asociada a diabetes mellitus tipo 2. Indicador de mayor desequilibrio homeostático*. . REV INST NAL ENF RESP MEX 2006. **19**(3:201-5).
29. Bowes, W.y.c., *Lysosomes in lymphoid tisswe. The measurement of hydrolitic in whole homogenate cell*. Biol. , 1967(32): p. 325-337.
30. Jayanthi, V., et al., *Proctitis and Proctosigmoiditis- A need to identify the extend of disease in epidemiological surveys*. Digestion, 1993(54): p. 61-64.
31. Ahmad, T., et al., *Review article: the genetics of inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol, 2001. **15**: p. 731-748.
32. Fiocchi, C., *Inflammatory bowel disease: aetiology and pathogenesis*. Gastroenterology, 1998(115): p. 182-205.
33. Belluzzi, A., et al., *Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(Suppl 1): p. S339-342.
34. Sandler, R.S., et al., *Childhood exposure to environmental tobacco smoke and the risk of ulcerative colitis*. . Am J Epidemiol, 1992. **135**: p. 603-608.
35. Maté Jiménez, J., J.M. Pajares García, and E. Ruiz Aladros, *Epidemiología de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal: sexo, edad, raza, herencia y genética*. Rev Esp Enferm Dig, 1994. **86**: p. 606-611.
36. Saro Gismera, C., et al., *Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal crónica en cinco areas de Asturias. España*. . An Med Interna, 2003. **20**: p. 232-238.
37. Roussomoustakaki, M., et al., *Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1997(112): p. 1845-1853.
38. Dayal, Y., et al., *Colitis ulcerosa idiopática*. 4ª ed. Patología estructural y funcional. 1990, Madrid: McGraw-Hill - Interamericana.

39. Lémann, M., et al., *European evidence Travis SP, Sta. 62-Consensus on the management of ulcerative colitis: Current management.* . J Crohns Colitis., 2008. **2**(1): p. 24
40. Aceituno, M. and J. Pánes, *Patogenia e inmunoterapia de la enfermedad inflamatoria intestinal: lecciones de los modelos animales.* Gastroenterol Hepatol., 2005. **28**(9): p. 576-590.
41. Yamada, T., et al., *A comparative study of two models of experimental colitis in rats.* . Gastroenterology., 1992(102): p. 1524-1534.
42. Ochamendi, E., *Durand. Norma Ramal de Salud Pública. "Extractos, fluidos y tinturas. Métodos de ensayo"*, E.P.y. Educación., Editor. 1992: La Habana.
43. Miranda Martínez, M. and A.L.H. Cuéllar, eds. *Farmacognosia y productos naturales.* . ed. E.F. Varela. 2012.
44. Payá, M., et al., *Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice.* Phytother., 1993,(7): p. 159-162.
45. Asakawa, T. and S. Matsushita, *Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides.* . Lipids., 1979. **14**(4): p. 401-406.
46. Boffil Cardenas, M.p., *Efecto de la Desnutrición Proteica o Proteica Calórica sobre la maduración de la función intestinal.* . 1984. p. 29.
47. Lowry, D.F.y.c., *Protein measurement with the folin phenol reagent* J. Biol. Chem., 1951(193): p. 265-275.
48. Espitia, Y.L., *Evaluación de la actividad antiinflamatoria de las plantas medicinales crtoniella acuminata y salvia rubescens en un modelo de colitis ulcerativa experimental.*, in *Departamento de farmacia.* 2010, Universidad Nacional de Colombia.: Bogotá, Colombia.
49. Millar, A.D., et al., *valuating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of Colitis.* Gut., 1996(39:407-15).
50. Mizoguchi, A., *Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Vol. 105. 2012. 294.
51. Korenaga, D., et al., *Impaired antioxidant defense system of colonic tissue and cancer development in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice.* . Journal of Surgical Research., 2002. **102**(2): p. 144-149.
52. Sánchez, A.M. and M. Isabel Torres, *Influencia de los ácidos grasos poliinsaturados en el modelode colitis ulcerosa experimental inducida por ácido-2,4,6-trinitrobencenosulfónico: estudio histoquímico y estructural Ini Inv.* 2006. **1**: a2.
53. Wallace, J.I., *Prostaglandian biology in inflammatory bowel disease.* Gastroenterology clinics of north america., 2001. **30**(4): p. 971-980971-980.