



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**

**TESIS
ESTUDIO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO DE *Lepidium
virginicum* EN UN MODELO DE COLITIS AGUDA**

PRESENTA

José Raymundo Cruz Muñoz

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE
TOXICOLOGÍA**

TUTORES

**Dra. Raquel Guerrero Alba
Dra. Eva María Salinas Miralles**

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Eduardo Emmanuel Valdez Morales

Aguascalientes, Ags 20 de noviembre del 2020

CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como TUTOR designado del estudiante JOSÉ RAYMUNDO CRUZ MUÑOZ con ID 125847 quien realizó la tesis titulado: ESTUDIO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO DE *Lepidium virginicum* EN UN MODELO DE COLITIS AGUDA, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que él pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 30 de noviembre de 2020.



Dra. Raquel Guerrero Alba
Tutor de tesis

El nombre completo que aparece en el Voto Aprobatorio debe coincidir con el que aparece en el documento empastado. No se puede abreviar, ni omitir nombres

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

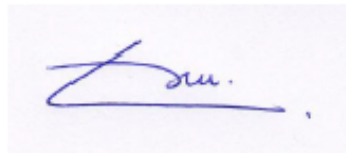
Por medio del presente como **TUTOR** designado del estudiante JOSÉ RAYMUNDO CRUZ MUÑOZ con ID 125847 quien realizó la tesis titulado: ESTUDIO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO DE *Lepidium virginicum* EN UN MODELO DE COLITIS AGUDA, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que él pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 28 de noviembre de 2020.



Dra. Eva María Salinas Miralles
Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **JOSÉ RAYMUNDO CRUZ MUÑOZ** con ID 125847 quien realizó la tesis titulado: **ESTUDIO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO DE *Lepidium virginicum* EN UN MODELO DE COLITIS AGUDA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 30 de ~~noviembre~~ de 2020.

Dr. Eduardo Emmanuel Valdez Morales
Tutor de tesis

El nombre completo que aparece en el Voto Aprobatorio debe coincidir con el que aparece en el documento empastado. No se puede abreviar, ni omitir nombres

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado



DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 01/12/2020

NOMBRE: José Raymundo Cruz Muñoz ID 125847

PROGRAMA: Maestría en Ciencias área Biotecnología Vegetal o Toxicología LGAC (del posgrado): Toxicología

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico

TITULO: ESTUDIO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO DE *Lepidium virginicum* EN UN MODELO DE COLITIS AGUDA

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Se confirmó desde el punto de vista científico el efecto real de una planta ampliamente usada en la medicina tradicional. Esta información puede ser valiosa para integrar esta planta, ya con el conocimiento validado, al tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>				
SI				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
N.A.				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>				
SI				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estanda, predoctoral, etc)
SI				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
N.A.				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI				Coincide con el título y objetivo registrado
SI				Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
N.A.				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</i>				
				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
				El estudiante es el primer autor
				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados.
				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado: Sí No

FIRMAS

Elaboró:
 * NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCION: Dra. Elsa Marcela Ramírez López
 NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch
 * En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano
 Revisó:
 NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO: Dra. Haydee Martínez Ruyalcaba
 Autorizó:
 NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO: M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado
 En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F la funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.
 Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
 Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
 Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.
 Código: DO-SEE-FD-15
 Actualización: 01
 Fecha: 28/04/20

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a las doctoras Raquel Guerrero Alba, Eva María Salinas Miralles y al doctor Eduardo Emmanuel Valdez Morales, quienes con sus conocimientos, paciencia y apoyo me guiaron a través de cada etapa de este proyecto.

Al Dr. Tonatiuh Barrios por su paciencia, dedicación y entusiasmo, gracias por apoyarme a lo largo de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, gracias por su amistad y cada momento de alegría que me han brindado.

A mi familia, por apoyarme cuando mas los necesitaba. En especial, quiero mencionar mi madre y mis hermanas, que siempre han estado ahí para darme palabras de aliento aun cuando mis ánimos decaían.

Por último, quiero agradecer al sistema nacional de becas CONACyT por brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

ÍNDICE 1

ÍNDICE DE FIGURAS 3

ÍNDICE DE TABLAS 4

ACRÓNIMOS 5

RESUMEN..... 7

ABSTRACT 8

1. INTRODUCCIÓN..... 9

2. MARCO TEÓRICO..... 10

 2.1 Anatomía del Colon..... 10

 2.1.1 *Capas del colon*..... 11

 a) Mucosa 11

 b) Submucosa 12

 c) Muscular externa..... 12

 d) Serosa..... 12

 2.2 Colitis ulcerosa 13

 2.2.1 Epidemiología de la colitis ulcerosa 14

 2.2.2 Sintomatología de la colitis ulcerosa 15

 2.2.3 Diagnóstico de la CU 15

 2.2.4 Fisiopatología de la CU 17

 2.2.5 *Tratamientos actuales para Colitis Ulcerosa (CU)* 25

 2.2.6 Modelos experimentales de colitis ulcerosa 26

 2.3 Plantas medicinales para el tratamiento de CU 27

 2.3.1 *Lepidium virginicum* 28

 a) Taxonomía y Distribución 28

 b) Características fitoquímicas de *L. virginicum* 29

3. JUSTIFICACIÓN 32

4. HIPÓTESIS..... 33

5. OBJETIVOS 33

 5.1 General 33

 5.2 Específicos..... 33

6. METODOLOGÍA..... 34

 6.1 Preparación del extracto *L. virginicum* (ELv) 34

6.2 Inducción de colitis ulcerosa aguda con el compuesto DNBS en ratas Wistar (Rattus norvegicus)	34
6.3 Evaluación de la severidad de la colitis	35
6.4 Ensayos de Mieloperoxidasas (MPO) en muestras de tejido colónico de ratas	36
6.5 Evaluación histopatológica de la inflamación mediante la técnica histológica de hematoxilina y eosina (H & E)	37
6.6 Análisis de la expresión del ARNm de algunos mediadores inflamatorios	37
6.7 Análisis de datos	38
7. RESULTADOS	39
7.1 Obtención del extracto de <i>L. virginicum</i>	39
7.2 Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de <i>L. virginicum</i> sobre la pérdida de peso inducida por la administración intrarrectal DNBS en ratas Wistar.	39
7.3 Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de <i>L. virginicum</i> sobre la diarrea inducida por la administración intrarrectal de DNBS en ratas Wistar.	41
7.4 Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de <i>L. virginicum</i> sobre el sangrado rectal inducido por la administración intrarrectal de DNBS en ratas Wistar.	41
7.5 Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de <i>L. virginicum</i> sobre el daño macroscópico del colon inducido por la administración intrarrectal de DNBS.....	43
7.6 Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de <i>L. virginicum</i> sobre la relación longitud y peso del colon inducido por la administración intrarrectal de DNBS.....	47
7.7 Curva dosis-respuesta para el extracto etanólico de <i>Lepidium virginicum</i> (3-300 mg/kg) en ratas Wistar administradas con DNBS.....	48
7.8 Análisis histomorfológico del colon, en un modelo de colitis en ratas Wistar tratadas con extracto etanólico de <i>L. virginicum</i>	49
7.9 Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de <i>L. virginicum</i> sobre la actividad de la enzima MPO en tejido intestinal de ratas Wistar.....	50
7.10 Efecto del extracto etanólico de <i>L. virginicum</i> sobre la expresión de genes proinflamatorios en ratas Wistar administradas con DNBS.	51
8. DISCUSIÓN	53
9. CONCLUSIÓN	57
10. BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del colon y recto (Saladin, 2013). 10

Figura 2. Histología del intestino grueso (Askari, 2016)..... 13

Figura 3. Variantes colitis ulcerosa (CU) (Ungaro, *et al.* 2017). 14

Figura 4. Imágenes endoscópicas de colitis ulcerosa en humano (Lange, *et al.* 2004)..... 17

Figura 5. Fisiopatología de la EII (Silva, Gatica, & Pavez, 2019)..... 18

Figura 6. Inflorescencia de *L. virginicum* L. 28

Figura 7. Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre la pérdida de peso corporal (%) de los animales con colitis inducida por DNBS..... 40

Figura 8. Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre la diarrea inducida por DNBS en ratas Wistar. 42

Figura 9. Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre el sangrado rectal inducido por DNBS en ratas Wistar. 43

Figura 10. Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre el daño macroscópico del colon inducido por la administración intrarrectal de DNBS en ratas Wistar. 45

Figura 11. Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre el puntaje de daño macroscópico del colon inducido por la administración intrarrectal de DNBS en ratas Wistar. 46

Figura 12. Relación peso/longitud del colon en ratas control y ratas con colitis inducida por la administración intrarrectal de DNBS con o sin tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum*. 47

Figura 13. Curva dosis-respuesta para el ELv en ratas Wistar que se les administró DNBS. 48

Figura 14. Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre el daño histológico del colon inducido por el DNBS en ratas Wistar. 49

Figura 15. Efecto del tratamiento I.P con extracto etanólico de *L. virginicum* sobre la actividad enzimática de MPO en tejido colónico de ratas Wistar. 50

Figura 16. Efecto del tratamiento I.P. con el extracto etanólico de *L. virginicum* (100 mg/kg) sobre la expresión de genes inflamatorios en tejido colónico inflamado inducido por la administración intrarrectal de DNBS en ratas Wistar. 52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Índice de gravedad Trulove-Witts 16

Tabla 2. Índice de gravedad de la Clínica Mayo 16

Tabla 3. Compuestos químicos identificados en el género *Lepidium*..... 31

Tabla 4. Puntaje de diarrea y sangrado rectal (Melgar *et al.*, 2005)..... 36

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la evaluar la expresión de genes
proinflamatorios 38



ACRÓNIMOS

- 5-ASA:** 5 – Aminosalicílicos
- CD:** Clúster de diferenciación
- CU:** Colitis ulcerosa
- DC:** Célula dendrítica
- DNBS:** Ácido dinitrobencenosulfónico
- DSS:** Dextrano Sulfato de Sodio
- E:** Extensión
- E1:** Proctitis/Proctosigmoiditis
- E2:** Colitis Izquierda
- E3:** Colitis extensa o Pancolitis
- EC:** Enfermedad de Crohn
- EII:** Enfermedad Inflamatoria Intestinal
- ELv:** Extracto etanólico de *Lepidium virginicum*
- GWAS:** Asociación de genoma completo
- HLA:** Antígeno leucocitario humano
- HTAB:** Hexadeciltrimetilamonio
- Ig:** Inmunoglobulina
- IL:** Interleucina
- INF:** Interferón
- I.P:** Intraperitoneal
- LPS:** Lipopolisacáridos
- MALT:** Tejido linfático asociado a mucosa
- msnm:** metros sobre el nivel del mar
- MPO:** Mieloperoxidasa
- NF-κB:** Factor nuclear κB
- NK:** Células Natural Killer
- NK-T:** Células T Natural Killer
- NLR:** Receptores tipo NOD
- PRRs:** Receptores de reconocimiento de patrones
- SNE:** Sistema nervioso entérico
- TGF:** Factor de crecimiento transformante
- Th:** Linfocitos T colaboradores

TLR: Receptores tipo Toll

TNBS: Ácido trinitrobencenosulfónico

TNF: Factor de necrosis tumoral

Treg: Linfocitos T reguladores



RESUMEN

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad intestinal inflamatoria caracterizada por una activación anormal del sistema inmune contra el propio tejido intestinal provocando lesiones en la mucosa y submucosa del colon. Los principales síntomas de la CU incluyen diarrea, dolor abdominal, hemorragia gastrointestinal y pérdida de peso, con períodos variables de actividad y recurrencia. La administración de medicamentos antiinflamatorios, como son los 5-aminosalicilatos y corticoesteroides, suelen ser la primera medida para el tratamiento de la CU. Sin embargo, la presencia de efectos secundarios adversos y/o la falta de efectividad de estos fármacos es frecuente, por lo que se requiere buscar nuevas alternativas de tratamiento. *Lepidium virginicum* L. ha sido usada tradicionalmente como remedio para enfermedades gastrointestinales y sus extractos contienen compuestos bioactivos como ácido fenólico, flavonoides, terpenos, esteroides, cumarinas, que están directamente relacionados con propiedades antiinflamatorias. Estas propiedades sugieren que *L. virginicum* puede tener un potencial terapéutico para las condiciones de CU.

El objetivo de este estudio fue investigar los efectos del extracto etanólico de *L. virginicum* en un modelo animal de colitis. Se usaron ratas Wistar hembras, a las cuales se les indujo la colitis con una aplicación intrarrectal de 200 mg/Kg de ácido dinitrobenceno sulfónico (DNBS) en etanol al 50% v/v. Veinticuatro horas después de inducir la colitis, se administró el extracto de *L. virginicum* durante 4 días por vía oral o intraperitoneal (I.P). El curso de la inflamación fue monitoreado mediante la evaluación de la pérdida de peso, consistencia de las heces y sangre fecal visible. Las ratas se sacrificaron al cuarto día después de la inducción y se extrajo el tejido colónico para analizar las lesiones histopatológicas, la actividad de mieloperoxidasas y la expresión de algunas citocinas proinflamatorias. El tratamiento con 100 mg/Kg del extracto de *L. virginicum* por vía I.P redujo significativamente la pérdida de peso, la diarrea y sangrado rectal inducido por DNBS. Así como las lesiones intestinales, la actividad de mieloperoxidasas y la expresión del transcrito de IL-1 β . En conclusión, el tratamiento con el extracto de *L. virginicum* atenúa la inflamación colónica causada por el DNBS en ratas Wistar.

ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) is an inflammatory bowel disease characterized by abnormal activation of the immune system against the own intestinal tissue, causing lesions in the mucosa and submucosa of the colon. The main symptoms of UC include diarrhea, abdominal pain, gastrointestinal bleeding, weight loss, and variable periods of activity and recurrence. The administration of anti-inflammatory drugs, such as 5-aminosalicylates and corticosteroids, are usually the mainstay for the treatment of UC. However, the presence of adverse effects and/or the lack of effectiveness of these drugs is frequent, so it is necessary to search for new alternative treatments. *Lepidium virginicum* L. has been traditionally used as a remedy for gastrointestinal diseases, and its extracts contain bioactive compounds such as phenolic acid, flavonoids, terpenes, sterols, coumarins, which are directly related to anti-inflammatory properties. These properties suggest that *L. virginicum* may have therapeutic potential for UC conditions.

The aim of this study was to investigate the effects of the ethanolic extract of *L. virginicum* in an animal model of colitis. Female Wistar rats were used, and colitis was induced with an intrarectal application of 200 mg/Kg of dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS) in 50% v/v ethanol. Twenty-four hours after inducing colitis, the *L. virginicum* extract was orally or intraperitoneally administered during 4 days. The course of inflammation was monitored by evaluating the consistency of stool, weight loss, and visible fecal blood. The rats were sacrificed on the fourth day after colitis induction and the colonic tissue was removed to analyze histopathological lesions, myeloperoxidase activity, and the expression of some pro-inflammatory cytokines. Intraperitoneal treatment with 100 mg/Kg of the *L. virginicum* extract significantly reduced weight loss, diarrhea, and rectal bleeding induced by DNBS, as well as decreasing intestinal lesions, myeloperoxidase activity and the IL-1 β gene expression. In conclusion, treatment with the *L. virginicum* extract attenuates the colonic inflammation caused by DNBS in Wistar rats.

1. INTRODUCCIÓN

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad intestinal inflamatoria de naturaleza multifactorial, de etiología desconocida y caracterizada por una activación anormal del sistema inmune contra el propio tejido intestinal provocando lesiones en la mucosa y submucosa del colon (Lee, Kwon, & Cho, 2018). La mayor frecuencia de CU se ha reportado en regiones como el norte de Europa, Reino Unido y Estados Unidos de América. En México, la frecuencia de nuevos casos ha aumentado considerablemente en los últimos 10 años (Bosques-Padilla, *et al.* 2011).

Por lo general, los pacientes con CU son tratados con antiinflamatorios, inmunosupresores y antibióticos. Sin embargo, es muy común que estos tratamientos sean poco efectivos y presenten efectos secundarios adversos, tales como irritabilidad del tracto gastrointestinal, mareos, náuseas, cefaleas, entre otros (Docherty *Et al.*, 2011). Por tal motivo, es necesario la búsqueda de nuevas alternativas de tratamientos más efectivos, y que causen los menos efectos secundarios posibles. Las plantas medicinales pueden ser una alternativa efectiva en el tratamiento de la CU. En México, la planta *Lepidium virginicum* L. se ha utilizado de manera tradicional como un remedio para el alivio de afecciones gastrointestinales, incluyendo dolor abdominal y dispepsia (Villaseñor y Espinosa, 1998). Además, se ha demostrado que el extracto etanólico de *L. virginicum* contiene compuestos activos como son flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, terpenos y esteroides (Martínez-Castro, 2016), que exhiben una amplia gama de efectos biológicos, entre los que se incluyen: efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antiespasmódicos y antitrombóticos (Kuklinski, 2003), lo que sugiere que *L. virginicum* podría ser una alternativa potencial para el tratamiento de la CU.

Actualmente, existen varios modelos experimentales de colitis que muestran diversas respuestas clínicas, histológicas e inmunológicas características de la CU en humanos. La colitis inducida por el químico ácido dinitrobenzeno sulfónico (DNBS), es un modelo de bajo costo, rápido de producir e imita muchos aspectos clínicos, inmunológicos e histopatológicos de la CU (Nidhi, *et al.* 2014). En el presente estudio, se investigó si el extracto etanólico de *L. virginicum* tiene efectos antiinflamatorios sobre la colitis inducida por DNBS en ratas Wistar.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Anatomía del Colon

El intestino grueso o colon es la porción terminal del tracto gastrointestinal. En el humano tiene una longitud promedio de aproximadamente 1.5 m, su diámetro varía en tamaño, de una parte del intestino grueso a otra, alcanzando un diámetro promedio de 6 a 8 cm y se inicia en la válvula ileocecal finalizando en el recto (Askari, 2016).

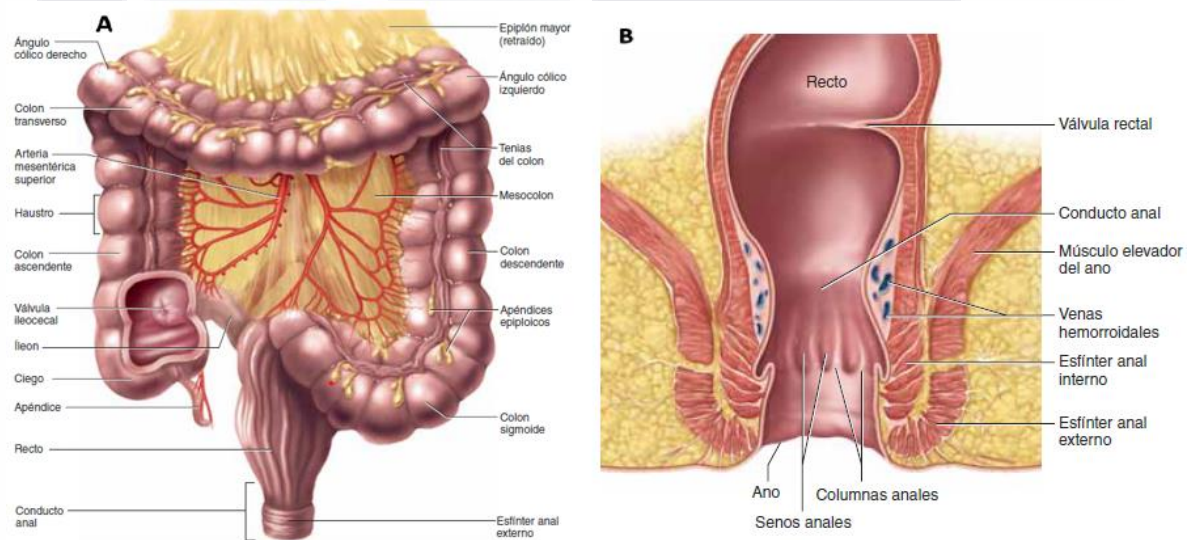


Figura 1. Anatomía del colon y recto. A) Anatomía macroscópica del colon. B) Anatomía del recto (Saladin, 2013).

El colon se compone por 6 secciones: la primera es el ciego, en el cual se adjunta el apéndice; la segunda sección sube formando el colon ascendente, ocupando el lado derecho del abdomen; la tercer sección toma un giro hacia la línea media, llamándose ahora colon transverso, hasta que alcanza el bazo en el lado izquierdo, donde toma un giro hacia abajo, donde es denominado flexura izquierda o esplénica (Rafferty, 2005). Éste continua hacia abajo, ocupando la sección izquierda del abdomen, a partir de aquí, la cuarta sección se conoce como el colon descendente y continua con el colon sigmoide. Después de lo cual, el colon se une con el recto para formar la unión rectosigmoide (Figura 1A) (Ellis & Mahadevan, 2011).

El recto es un órgano muscular de 12 a 15 cm, que continua al colon y cuyo diámetro es similar al del colon sigmoide (Figura 1B) (Askari, 2016). A diferencia del colon, el recto carece de haustras y presenta pliegues transversales denominados válvulas de Houston, que sobresalen en la luz del recto y que cumplen una función de soporte del peso fecal antes de la defecación, finalmente el recto termina en los músculos del esfínter anal interno (control involuntario) y externo (control voluntario) (Dyck & Thomas, 2005).

2.1.1 Capas del colon

La pared del colon consta de cuatro capas (mismas que pueden ser encontradas en todo el tracto gastrointestinal) desde la luz hacia afuera son: mucosa, submucosa, muscular y serosa (Tortora & Derrickson, 2011). Cada una de estas capas se encuentra adaptada para llevar a cabo una función única (Figura 2).

a) Mucosa

La mucosa es la capa que está en contacto con el contenido luminal y está formada por una capa de epitelio cilíndrico simple sobre tejido conectivo llamado *lámina propia* y una capa fina de músculo liso denominada *muscularis mucosae*.

- Epitelio intestinal: principalmente de estructura cilíndrica simple, con excepción de la mitad inferior del conducto anal, donde su estructura es pavimentosa estratificada no queratinizada, lo que proporciona mayor resistencia a la abrasión a causa del paso de las heces (Saladin, 2013). El epitelio contiene en su mayoría células absortivas que participan principalmente en la absorción de agua, y células calciformes que secretan moco para lubricar el paso del contenido colónico. Ambos grupos de células se localizan en glándulas intestinales largas, tubulares y rectas, que se extienden por todo el espesor de la mucosa (Tortora & Derrickson, 2011).
- Lámina propia: compuesto de tejido conectivo areolar, con un gran contenido de vasos linfáticos y capilares sanguíneos. Esta capa sostiene al epitelio y lo fija a la capa muscular de la mucosa (*Muscularis Mucosae*) (Tortora & Derrickson, 2011). Además, contiene la mayor parte de las células del tejido linfático asociado con la mucosa (MALT). Estos nódulos linfáticos contienen células del sistema inmunitario que protegen contra patógenos o toxinas.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- *Muscularis Mucosae*: compuesta de una fina capa de fibras musculares lisas, que forman en la mucosa pliegues, ranuras o crestas, que amplían la superficie de contacto con el contenido del tubo digestivo (Tortora & Derrickson, 2011; Saladin, 2013).

b) *Submucosa*

Compuesta por una gruesa capa de tejido conectivo laxo que contiene vasos sanguíneos y linfáticos, una extensa red neuronal denominada plexo submucoso y, en algunos lugares, contiene glándulas que secretan moco lubricante hacia el lumen (Tortora & Derrickson, 2011; Saladin, 2013).

El plexo submucoso o plexo Meissner, forma parte del sistema nervioso entérico (SNE), el cual está compuesto por motoneuronas, interneuronas y neuronas sensitivas (Tortora & Derrickson, 2011). Las motoneuronas del plexo submucoso inervan a las células secretoras de la mucosa epitelial y controlan las secreciones de éstas. Dado que el MALT puede extenderse hasta la submucosa, aloja las células inmunes del cuerpo para evitar que las bacterias de la microflora se extiendan más allá del intestino (Askari, 2016).

c) *Muscular Externa*

Consiste en músculo liso que generalmente está compuesto por dos capas de músculo: una capa interna de fibras circulares, en donde las células que lo componen rodean al tubo y una capa externa de fibras longitudinales (Tortora & Derrickson, 2011; Saladin, 2013). Entre las capas de la muscular externa se encuentra el segundo plexo neuronal del SNE, el plexo mientérico o de Auerbach, que al inervar a las capas circular y longitudinal de músculo liso, controla la motilidad del tracto gastrointestinal (Tortora & Derrickson, 2011). Esta capa es la responsable de los movimientos peristálticos que propulsan el bolo alimenticio a lo largo del tubo (Saladin, 2013).

d) *Serosa*

Es una membrana serosa compuesta por una capa delgada de tejido conectivo areolar, que en la parte superior presenta un epitelio pavimentoso simple (mesotelio), da soporte estructural al intestino. Esta capa empieza desde los 3 y 4 cm inferiores del esófago y termina justo antes del recto, por lo cual la mayor parte del esófago y el recto carecen de

esta capa, sin embargo, en su lugar, se encuentran recubiertas por una capa de tejido conjuntivo denominada adventicia (Tortora & Derrickson, 2011; Saladin, 2013; Askari, 2016).

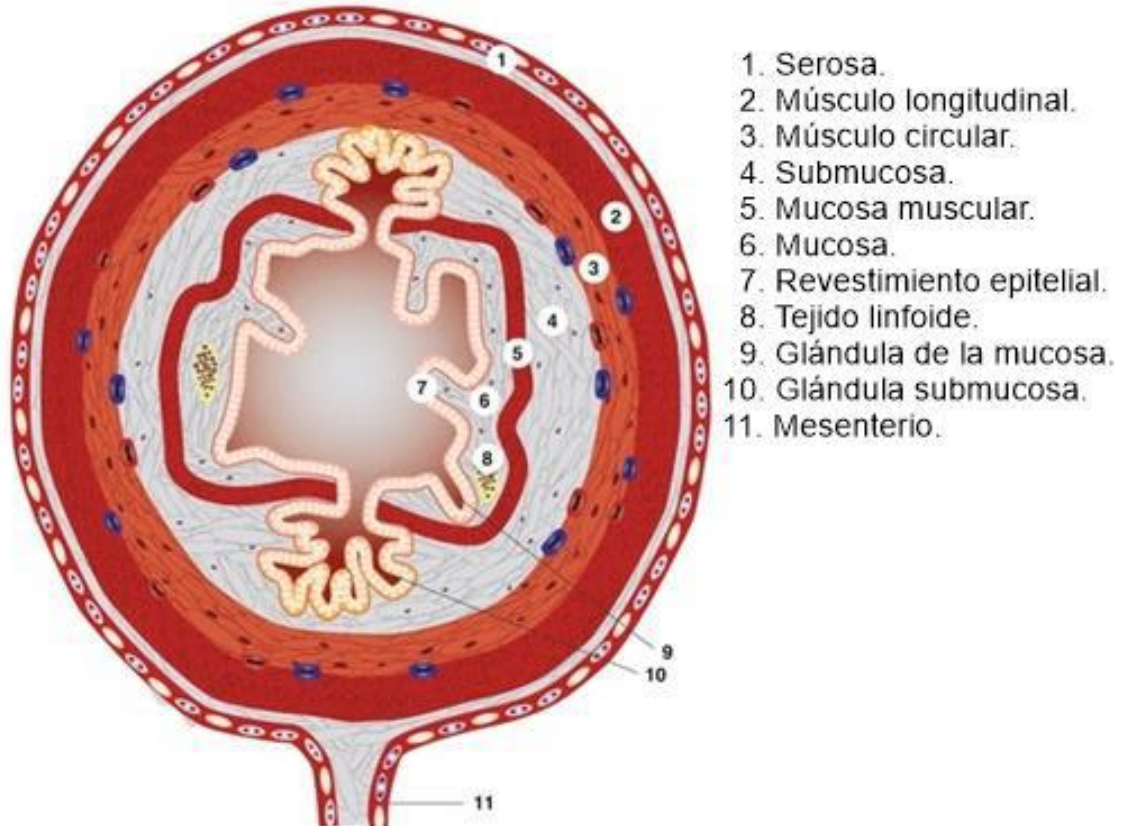


Figura 2. Histología del intestino grueso. Vista tridimensional de las capas del intestino grueso (Askari, 2016).

2.2 Colitis ulcerosa

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria crónica del colon, que cursa en forma de brotes (fase activa) y periodos de remisión (fase inactiva), y que junto con la enfermedad de Crohn (EC) son los principales tipos de enfermedades inflamatorias intestinales (EII). Ambas enfermedades se pueden diferenciar debido a la ubicación y extensión de la inflamación dentro del tracto gastrointestinal. La zona más frecuentemente implicada en pacientes con CU es el recto y la parte final del colon (sigma) (Dignass *et al.*, 2012). Por el contrario, en los casos de EC suele llegar a afectar cualquier parte del tracto gastrointestinal, afectando predominantemente las secciones del íleon y el ciego (Docherty, Jones, & Wallace, 2011).

De acuerdo con la extensión del colon afectada, la CU se clasifica en tres patrones diferentes denominados con la letra E (extensión): E1, proctitis o proctosigmoiditis, cuando la enfermedad se limita al recto (zona de afección en la unión rectosigmoide); E2, colitis izquierda, la lesión se extiende hasta el ángulo esplénico; y E3, colitis extensa o pancolitis, la lesión puede afectar hasta el ángulo hepático o todo el colon (Figura 3). Al momento del diagnóstico, un tercio de todos los pacientes presentan proctosigmoiditis, otro tercio presenta colitis del lado izquierdo y, el ultimo, proximal o pancolitis. Así mismo, entre el 15% al 30% de todos los pacientes que muestran afección en el lado izquierdo, pueden sufrir extensión a segmentos colónicos más proximales (Hoie, *et al.* 2007; Solberg, *Et al.* 2009).

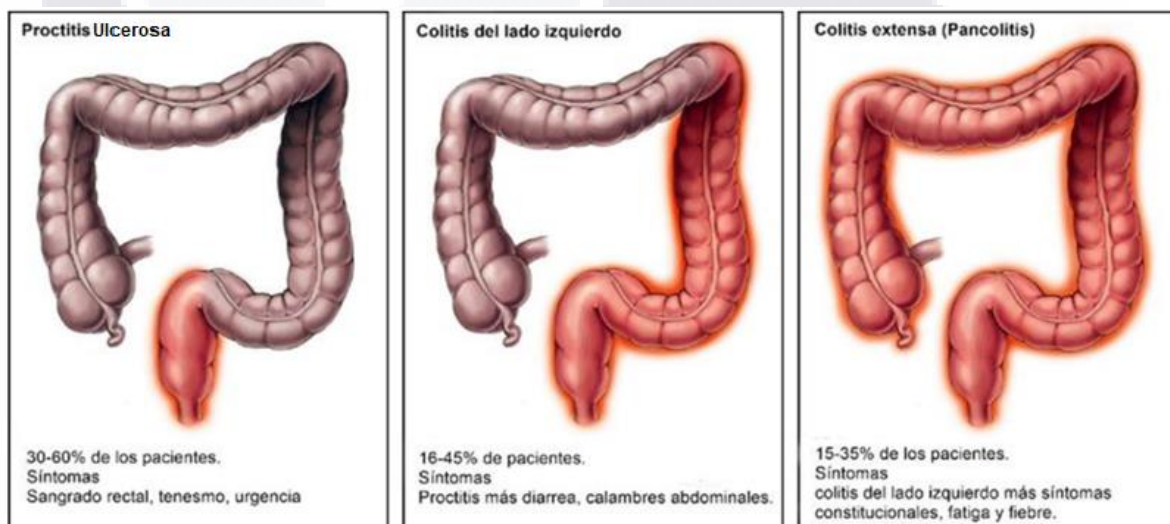


Figura 3. Variantes de la CU. Obtenida de Ungaro, *et al.* (2017).

2.2.1 Epidemiología de la CU

La incidencia de la CU varía desde el punto de vista geográfico, va desde 0.5 a 31.5 por cada 100,000 individuos por año (Lukas, *et al.* 2006; Burisch & Munkholm, 2013), siendo mayor en el norte y el oeste de Europa, así como en el norte de América; las zonas geográficas de menor incidencia son África, América del Sur, este de Europa y Asia (Ochsenkühn & D'Haens, 2011). En las últimas décadas, se ha reportado un aumento en la incidencia de CU en los países del este de Europa y en las naciones asiáticas. Lo anterior se atribuye a la occidentalización de los estilos de vida, los cambios en la dieta y los cambios ambientales debidos a la industrialización y la urbanización de las poblaciones (Lakatos, 2006; da Silva, *et al.* 2014). También se ha reportado un aumento en la incidencia en los países en desarrollo de América del Sur (Appleyard, *et al.* 2004; da Silva, *et al.* 2014).

En México, la frecuencia de casos de CU ha aumentado significativamente en la última década. El promedio anual de nuevos casos de CU incrementó de un 28.8% entre los años 1987-1996 y un 76.1% para el periodo 1997-2006. De este modo, la incidencia de nuevos casos ha incrementado 2.6 veces comparado con ambos periodos de tiempo. Los patrones clínicos más comunes en los pacientes mexicanos diagnosticados con CU son pancolitis (59.1%), proctitis ulcerosa (29%) y colitis izquierda o distal (21%). La edad de mayor incidencia en México es entre los 20 y 40 años de edad, afectando por igual a hombres y mujeres (Bosques, *et al.* 2011).

2.2.2 Sintomatología de la CU

Los síntomas predominantes dependen de la extensión anatómica y la severidad de la inflamación. Muchos de los pacientes experimentan episodios recurrentes de sangrado rectal, diarrea con moco, cólicos y dolor abdominal, así como desnutrición, agotamiento y periodos variables de actividad y recurrencia. En los casos severos, se puede presentar fiebre y anorexia (Ochsenkühn & D'Haens, 2011).

Aproximadamente en el 10% de los pacientes con CU aparecen manifestaciones extraintestinales, como son en las articulaciones, la piel, ojos e hígado. Cuando aparece en las articulaciones se puede manifestar como artritis periférica oligoarticular o poliarticular (Dignass, *et al.* 2012). Las manifestaciones cutáneas se catalogan en lesiones granulomatosas o dermatosis reactivas, como son: el eritema nodoso, estomatitis aftosa y pioderma gangrenoso (Chávez-Álvarez, *et al.* 2016). Las manifestaciones oculares más comunes son la episcleritis, la escleritis y la uveítis (Vavricka, *et al.* 2015).

Se ha destacado que algunos de los factores ambientales, como son los patrones dietéticos, pueden repercutir en un aumento de los síntomas en pacientes con CU (Kyung & Young, 2013).

2.2.3 Diagnóstico de la CU

El diagnóstico de la CU se establece mediante la correlación de los aspectos clínicos, bioquímicos, endoscópicos e histopatológicos.

Los aspectos clínicos se obtienen a partir de una historia clínica detallada, que debe incluir información sobre los síntomas: inicio de los síntomas, patrones de recaída y remisión, presencia de dolor abdominal, patrón de diarrea, síntomas extraintestinales, sangrado rectal, presencia de moco y sangre en las evacuaciones, tenesmo y pérdida de

peso. La localización del dolor depende de la extensión de la enfermedad, por lo general se presenta en el cuadrante inferior izquierdo distal y se extiende a todo el colon. La distensión abdominal y datos de irritación peritoneal a la palpación, acompañados con disminución de los ruidos intestinales, requieren supervisión continua debido al alto riesgo de presentar megacolon tóxico (Yamamoto-Furusho, *et al.* 2017).

La sospecha clínica se apoya con datos bioquímicos y hallazgos macroscópicos endoscópicos e histológicos. Los datos bioquímicos incluyen marcadores séricos de inflamación elevados (proteína C reactiva y velocidad de sedimentación globular), anemia, y marcadores fecales elevados (calprotectina y lactoferrina fecal) (Dignass, *et al.* 2012).

Los índices clínicos más utilizados para evaluar el grado de actividad de la CU son el índice de Truelove y Witts (ver tabla 1) y la puntuación de la Clínica Mayo (ver tabla 2) (Hernández-Rocha, *et al.* 2017).

Tabla 1. Índice de gravedad de Truelove-Witts

	1 punto	2 puntos	3 puntos
n deposiciones/día	< 4	4 a 6	> 6
Sangre en deposiciones	-	+	++/+++
Temperatura axilar (°C)	< 37	37-38	> 38
Frecuencia cardiaca	< 80	80 a 100	> 100
Hemoglobina (g/dl)			
- Hombres	> 14	14 a 10	< 10
- Mujeres	> 12	12 a 10	< 10
Leucocitos/ul	< 10.000	10.000 a 13.000	> 13.000
VHS (mm/h)	< 15	15 a 30	> 30
Albuminemia (g/dl)	> 3,2	3,2 a 3,0	< 3,0
Potasio (meq/l)	> 3,8	3,8 a 3	< 3

Inactivo: Menos de 11 puntos; Leve: 11 a 15 puntos; Moderado: 16 a 21 puntos; Grave: 22 a 27 puntos. VHS: velocidad de eritrosedimentación.

Tabla 2. Índice de gravedad de la Clínica Mayo

	0 punto	1 punto	2 puntos	3 puntos
Frecuencia de deposiciones	Normal (lo habitual para el paciente)	1 a 2 deposiciones > a lo normal	3 a 4 deposiciones > a lo normal	> a 4 deposiciones sobre lo normal
Sangrado	Sin sangrado	Sangrado visible en menos de 50% de las deposiciones	Sangrado visible en 50% o más de las deposiciones	Sólo sangre
Apariencia endoscópica de la mucosa	Normal o enfermedad inactiva	Eritema, disminución patrón vascular y friabilidad leve	Eritema marcado, ausencia de patrón vascular, friabilidad y erosiones	Sangrado espontáneo o úlceras
Evaluación global	Normal	Leve	Moderado	Grave

Remisión: ≤ 2 puntos sin ningún subscore > 1; Leve: 3 a 4 puntos; Moderada: 5 a 8 puntos; Grave: 9 a 12 puntos.

Por otra parte, la íleo-colonoscopia con toma de biopsia es la prueba diagnóstica más importante en la sospecha de CU. Los hallazgos endoscópicos característicos en fase aguda son: eritema, pérdida del patrón vascular, granularidad, friabilidad, erosiones y ulceraciones de la mucosa (Figura 4). En fase crónica son la presencia de pseudopólipos y estenosis (Vergara-Fernández, *et al.* 2006).

El diagnóstico microscópico de la CU se basa en la distorsión de la arquitectura de las criptas, infiltrado de neutrófilos, datos de criptitis, con ramificación de las criptas y abscesos crípticos, así como depleción de mucina por disminución de las células caliciformes (Yamamoto-Furusho, *et al.* 2017).

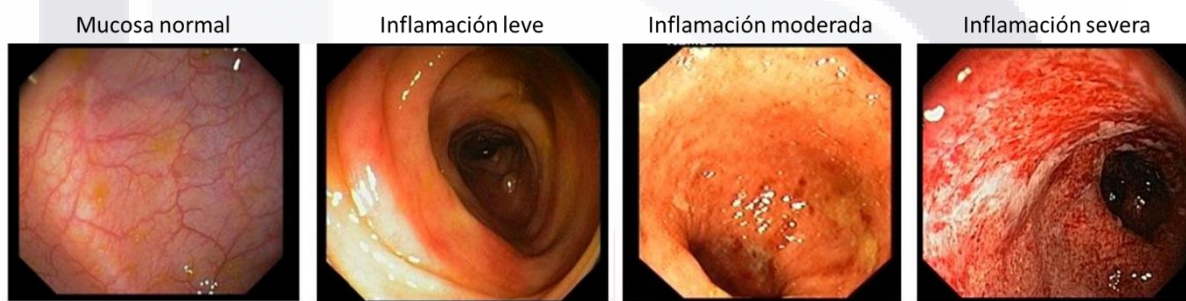


Figura 4. Imágenes endoscópicas de colitis ulcerosa en humano. Las imágenes muestran diferentes niveles de inflamación en la mucosa del colon (Lange, *et al.* 2004).

El riesgo de cáncer colorrectal en pacientes con CU está incrementado en comparación con la población general. El riesgo se asocia con la duración y con el grado de actividad de la enfermedad (Eaden, *et al.* 2001)

2.2.4 Fisiopatología de la CU

La etiología de la CU se desconoce, generalmente se acepta que se desarrolla a través de una respuesta inmune inadecuada a los antígenos presentes en el lumen del intestino probablemente derivados de la microbiota intestinal en individuos genéticamente susceptibles (Bueno, *et al.* 2015; Torres & Rios , 2008).

En la CU, factores genéticos, ambientales y del microbioma interactúan con el sistema inmune, resultando en respuestas alteradas responsables de la inflamación intestinal crónica (Figura 5).

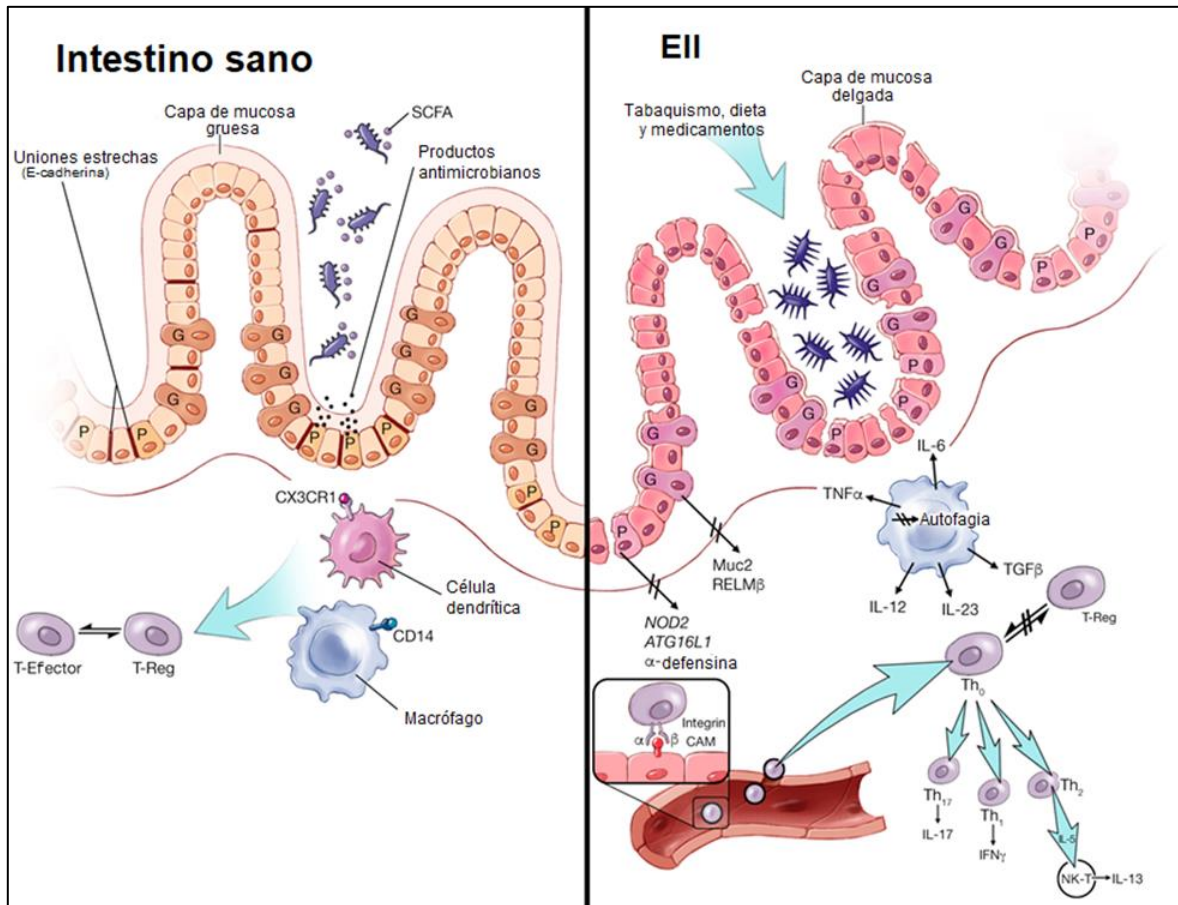


Figura 5. Fisiopatología de la EII. La homeostasis en el intestino se ve alterada en pacientes con EII por el desarrollo de una disbiosis con una disminución en la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés) producidos por la bacterias y un aumento de las proteobacterias (*Escherichia coli*). Los mecanismos que mantienen la barrera intestinal también están alterados en los pacientes con EII, incluida una disminución de la proteína cadherina en las uniones estrechas; disminución en la densidad de la mucosa, alteraciones en la función de las células calciformes (disminución en la producción de moco) y mecanismos disfuncionales asociados a las células Paneth (disminución de la producción de agentes antibacterianos). Además, los pacientes con EII exhiben una disminución en el número de macrófagos expresando CD14, una presentación defectuosa del antígeno por las células dendríticas y una autofagia alterada. Esta respuesta inadecuada resultan en una reducción de la producción de agentes antibacterianos y una invasión microbiana patógena. Por último, en la EII se observa una ruptura en el equilibrio entre las células T-efectora y T-reguladora (T-reg), resultando en la activación descontrolada de varias líneas de células T en el intestino inflamado. Células calciformes (G); Interferón γ (IFN γ); Interleucina (IL); Célula T asesina natural (NK-T); Células de Paneth (P); Linfocitos T helper (Th); Factor transformante del crecimiento β (TGF β); Factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Ramos & Papadakis, 2019).

Factores genéticos

Los factores genéticos han sido considerados ampliamente como factores de riesgo importantes para la aparición de la EII. Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) realizados en los últimos años han tenido un gran éxito en la identificación de genes que contribuyen a la susceptibilidad de EII. En la actualidad

se han identificado más de 200 loci de genes de riesgo asociados con la EII, la mayoría de estos genes están involucrados en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa, así como en el mantenimiento de la función de la barrera epitelial intestinal (Wawrzyniak & Scharl, 2018). Algunos de estos genes han incluido el dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contienen la proteína 2 (NOD2), el antígeno leucocitario humano (HLA) y el receptor para la interleucina (IL)-23 (IL23R), que juegan un papel central en la respuesta inmunológica (Yamamoto-Furusho, *et al.* 2018). En un estudio realizado en pacientes mexicanos se observó una frecuencia incrementada de polimorfismos de HLA-DR1 en el grupo de pacientes con CU comparado con controles sanos (Yamamoto-Furusho *et al.* 2004).

Por otro lado, se ha hecho una importante asociación entre la EII y el gen IL23R, involucrado en la generación de células T cooperadoras (Th)17. La vía Th17 e IL-23 han sido bien establecidas en la patogenia de la EII, con susceptibilidad en los loci de genes IL23R, IL-12B, JAK2 y STAT3 que se han identificado tanto en la CU como en la EC (Anderson, *et al.* 2011; Brand, 2009). Las variantes de IL-12B, que codifica la subunidad p40 de la IL-12 e IL-23, se han asociado con EII y otros trastornos inmunitarios. Las mutaciones en genes del sistema inmunitario adaptativo, como en la vía de señalización del receptor de interleucina (IL)-10 / IL-10, también se han asociado con la EC y la CU (Yamamoto-Furusho *et al.* 2018). Así mismo, se ha observado que el compartir genes de susceptibilidad, entre miembros de la misma familia parece resultar en incremento en el riesgo de agregación familiar para la EII (Cabré, *et al.* 2014). Esto se ha observado en estudios en donde gemelos monocigóticos presentaban altas tasas de incidencia para alguna EII en comparación a gemelos dicigóticos; sin embargo, el riesgo es más elevado en pacientes con EC, en comparación con CU (Gabbani, *et al.* 2016). Por otro lado, en México, se ha mostrado una frecuencia baja de agregación familiar de CU para la población mexicana del 6.78%, comparada con 13.4 al 15% mostrado en países del norte de Europa y Estados Unidos (Yamamoto-Furusho J. K., 2009).

Factores ambientales

Los factores ambientales también juegan un papel importante en la patogenia de la CU. Un gran número de factores ambientales se consideran factores de riesgo para la CU, incluidos el tabaquismo, la dieta, las drogas, la geografía y el estrés psicosocial. Entre ellos, el tabaquismo sigue siendo el promotor ambiental más estudiado y replicado de la CU

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(Loftus E.V., 2004). Por otro lado, algunos estudios han sugerido que la deficiencia de vitamina D contribuye al aumento de riesgo de EII (Leslie, *et al.* 2008). El uso de antibióticos es un factor ambiental importante que influye en el riesgo de padecer EII a través de su efecto sobre el microbioma. Al respecto, se ha establecido que el uso de antibióticos durante el primer año de vida es más común entre los casos de EII pediátrica en comparación con los controles sanos (Shaw, *et al.* 2010).

Se ha propuesto desde hace mucho tiempo que el estrés desempeña un papel en la patogenia de la CU (Mauder R.G., 2005; Mawdsley & Rampton, 2005, 2006). Bitton, *et al.* (2008) sugirieron que las personas con niveles más bajos de estrés tenían un riesgo reducido de aparición de la enfermedad. Los componentes del estado de ánimo del estrés percibido, incluidas la depresión y la ansiedad, pueden desempeñar un papel importante en la mediación del deterioro de la CU (Cámara, *et al.* 2011).

La evidencia ecológica y epidemiológica reciente sugiere que la contaminación del aire puede contribuir al riesgo de EC y CU. La creciente incidencia de EC y CU en los países en desarrollo es paralela al desarrollo de la industrialización (Thia, *et al.* 2008). La contaminación atmosférica elevada se asocia con un aumento de los leucocitos polimorfonucleares circulantes y de las citocinas plasmáticas (Tan, *et al.* 2000; Van Eeden, *et al.* 2001). Kaplan, *et al.* (2010), utilizando la base de datos Health Improvement Network Database en el Reino Unido, encontraron que los niveles altos de NO₂ y SO₂ se correlacionan con un mayor riesgo de EC y CU. En otro estudio, la emisión total de contaminantes se ha relacionado con un aumento de las tasas de hospitalizaciones tanto por EC como por CU, lo que sugiere que la contaminación del aire ambiental también puede influir en estas enfermedades establecidas (Ananthakrishnan, *et al.* 2011).

Factores microbianos

El microbioma intestinal humano completo consta de aproximadamente 1150 especies bacterianas, y cada huésped individual tiene aproximadamente 160 especies (Qin, *et al.* 2010). El microbioma intestinal se establece dentro de las 2 primeras semanas de vida y luego generalmente permanece estable a partir de entonces. Aunque sólo es posible cultivar entre el 20% y el 30% del microbioma intestinal, se ha establecido la asociación entre los cambios en el microbioma y la EII (Eckburg, *et al.* 2005). Muchos estudios han examinado la flora intestinal en la EC y la CU en segmentos inflamados y no inflamados, y

han encontrado que hay una biodiversidad significativamente reducida en el microbioma fecal en pacientes con EII en comparación con los controles sanos (Joossens, *et al.* 2011).

En estudios realizados específicamente para identificar el papel de la microbiota en la CU crónica idiopática se ha observado que la disbiosis incrementa las bacterias patógenas y proinflamatorias, y que esta disbiosis ocurre generalmente a partir de un evento desencadenante como una gastroenteritis infecciosa, en el cual existe un desequilibrio entre bacterias comensales y patógenas, perpetuando una alteración en la barrera intestinal epitelial causando la translocación de bacterias y sus productos en individuos genéticamente susceptibles (Yamamoto-Furusho, *et al.* 2018).

Otra investigación también ha encontrado que la microbiota en pacientes con EII es inestable comparada con los individuos sanos (Andoh, *et al.* 2011). En intestino sano, predominan los phyla Firmicutes y Bacteroidetes, que contribuyen a la producción de sustratos metabólicos epiteliales. Por el contrario, en intestinos con EC se caracteriza por una relativa falta de Firmicutes y Bacteroidetes, y una sobre representación de enterobacterias; mientras que, en CU se observó una reducción de *Clostridium* spp. y un aumento de *Escherichia coli* (*E. coli*) (Martínez *et al.* 2008).

En la CU se ha reportado la existencia de una respuesta inmune incrementada a los antígenos microbianos, que aunada a la alteración de la permeabilidad intestinal y al consecuente exposición de dichos antígenos, resulta en la activación de múltiples vías para inducción de citocinas proinflamatorias (Chassaing & Darfeuille-Michaud, 2011; Yamamoto-Furusho, *et al.* 2018).

Factores inmunológicos

La investigación de la patogénesis de la EII ha estado dominada durante mucho tiempo por los estudios de la inmunidad de la mucosa, especialmente la respuesta de las células T. La evidencia disponible sugiere que las disfunciones de las vías inmunes innatas y adaptativas contribuyen a la respuesta inflamatoria intestinal aberrante en pacientes con EII.

La respuesta inmune innata representa la primera línea de defensa contra los patógenos y es no específica, lo que permite que el cuerpo responda rápidamente a los estímulos a menudo en minutos u horas. La respuesta inmune innata está mediada por una gran variedad de tipos de células diferentes, incluidas las células epiteliales, neutrófilos, células dendríticas, monocitos, macrófagos y células asesinas naturales (NK) (Medzhitov &

Janeway, 2005). Esta forma de inmunidad se inicia mediante el reconocimiento de antígenos microbianos, que está mediado por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), incluidos los receptores tipo toll (TLR) en la superficie celular y los receptores tipo NOD (NLR) en el citoplasma (Abreu, *et al.* 2005).

La primera barrera física que encuentran las bacterias intestinales y los antígenos alimentarios está representada por la capa mucosa que recubre el epitelio intestinal. Numerosos estudios han demostrado la importancia del moco en la prevención de la penetración bacteriana y la inflamación intestinal (Van der Sluis, *et al.* 2006). La segunda línea de defensa contra la invasión bacteriana está formada por el epitelio intestinal que consta de enterocitos y células epiteliales especializadas, como las células caliciformes y las células de Paneth. Además de formar una barrera física contra las bacterias, las células epiteliales pueden secretar varios péptidos antimicrobianos. Durante mucho tiempo se ha observado una barrera epitelial defectuosa y un aumento de la permeabilidad intestinal en pacientes con EII (Salim & Söderholm, 2011). Así como, una expresión defectuosa de péptidos antimicrobianos en pacientes con CU (Wenkamp, *et al.* 2003).

Estudios recientes han encontrado que el comportamiento de las células que median la inmunidad innata y la expresión y función de las proteínas TLR y NOD se alteran significativamente en individuos con EII. Por ejemplo, se ha demostrado que la acumulación de neutrófilos en la mucosa y la producción de IL-1 β e IL-8 en respuesta a un traumatismo se reducen selectivamente en los pacientes con EC, pero no en los pacientes con CU (Marks, *et al.* 2006). Las mutaciones de NOD2 más comúnmente asociadas con la EC inducen una capacidad defectuosa del intestino para responder al LPS, y este defecto puede contribuir a la susceptibilidad a la enfermedad (Bonen, *et al.* 2003). Aunque el papel funcional de las mutaciones NOD2 todavía es controvertido, la evidencia disponible sugiere que representan mutaciones con pérdida de función que conducen a una activación reducida del factor nuclear relacionado con la cadena kappa de los linfocitos B (NF-K β) (Wenkamp *et al.* 2003). Esta respuesta inadecuada podría resultar en una reducción de la producción de agentes antibacterianos y una invasión microbiana patógena (Abraham & Cho, 2006). Otros estudios sugieren que la pérdida de función de NOD2 puede resultar en la falta de inhibición de la estimulación de TLR2, lo que lleva a la activación de vías inflamatorias y respuestas Th1 excesivas (Watanabe, *et al.* 2004).

Por otro lado, los neutrófilos, las células de "primera respuesta" de vida corta, se reclutan en abundancia generando la histología característica de los "abscesos de cripta"

en la CU, donde los neutrófilos transmigran a través del epitelio colónico y mueren dentro de las criptas colónicas. El entorno inflamatorio de la CU activa promueve la supervivencia de los neutrófilos. Esta mayor supervivencia aumenta su acción inflamatoria y el daño tisular (a través de muchos medios, incluida la liberación de serin proteasas y metaloproteasas de matriz, especies reactivas de oxígeno y citocinas proinflamatorias). El elevado número de neutrófilos sufre una muerte celular proinflamatoria incontrolada (necrosis), que potencia y amplifica el entorno proinflamatorio. Esto está respaldado por altos niveles de proteínas S100A8 / 9 (o calprotectina), que generalmente se encuentran en los neutrófilos, que se liberan en la sangre y las heces y una respuesta serológica prominente a los autoanticuerpos perinucleares anti-citoplasma de neutrófilos (pANCA) en la CU, ambos probablemente indicadores indirectos de muerte incontrolada de neutrófilos. Las trampas extracelulares de neutrófilos (NET) pueden actuar como sumidero de moléculas inmunogénicas que sostienen la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, existe un paradigma racional de que, después del inicio de la enfermedad, la ola precedente de neutrófilos y macrófagos (con su repertorio de citocinas proinflamatorias, por ejemplo, la familia IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF)- α) crea un medio inflamatorio que promueve una respuesta inmunitaria patológica adaptativa (probablemente de células T), lo cual está apoyado por los altos niveles de varias citocinas proinflamatorias como IL-1 α e IL-1 β y el TNF- α en tejidos afectados por la CU (Rugtveit, *et al.* 1997; Smith, *et al.* 2005; Tran, *et al.* 2012).

Las células dendríticas (DC), son células presentadoras de antígenos que participan en el inicio y la regulación de la respuesta inmune innata local y que también juega un papel en la inmunidad adaptativa (Rescigno & Di Sabatino, 2009). Al igual que los macrófagos, la función de las DC depende del microambiente de la mucosa intestinal. En controles sanos, las DC intestinales tienen una expresión baja de los receptores TLR2 y TLR4. La expresión de ambos receptores aumenta significativamente en pacientes con EC y CU. En este mismo estudio también se ve una sobre producción de las citocinas proinflamatorias IL-12 e IL-6, concluyendo que las DC tienen una sobreexpresión de receptores de reconocimiento microbiano lo que causa una activación exagerada en los pacientes con EII (Hart, *et al.* 2005).

A diferencia de la respuesta inmune innata, la inmunidad adaptativa es muy específica, a menudo tarda varios días en responder y depende del tipo y número de células T. Las células Th1, inducidas por IL-12, producen una gran cantidad de IFN- γ , mientras que

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

las células Th2 liberan IL-4, IL-5 e IL-13 (Korn, *et al.* 2009). Se cree que una respuesta inmune Th1 anormal causa inflamación intestinal en la EC y se ha observado que las células T de la mucosa de pacientes con EC producen cantidades más altas de IL-2 e IFN- γ que las células T de pacientes con CU o controles (Breese, *et al.* 1993). También se ha demostrado que en la CU, las células NKT atípicas liberan mayores cantidades de la citocina IL-13 e IL-5 que las células T de los controles o los pacientes con EC (Heller, *et al.* 2005; Fuss, *et al.* 2004). Por tanto, se ha pensado que la EC se caracteriza por una respuesta inmunitaria Th1, mientras que la CU se ha considerado una enfermedad mediada por Th2 (Di Sabatino, *et al.* 2012). Sin embargo, algunos estudios contradictorios han llevado a reconsiderar esta concepción. Al respecto, en un estudio utilizando las biopsias de pacientes con CU y EC cultivadas *in vitro*, se observó que ambos tipos de biopsias liberaron cantidades elevadas y comparables de IFN- γ (Rovedatti, *et al.* 2009). Mientras que en otros estudios han encontrado niveles más bajos de IL-13 en la mucosa colónica de los pacientes con CU en comparación con los de los pacientes con EC y los sujetos del grupo de control (Vainer, *et al.* 2000). También se ha observado que los niveles de IL-13 en los sobrenadantes de biopsias intestinales cultivadas *in vitro* son más bajos que la concentración de IFN- γ y las concentraciones son comparables entre los grupos de EC, CU y control (Wilson, *et al.* 2001). Bernardo, *et al.* (2012) han informado observaciones similares, que han descrito la presencia de un perfil mixto de citocinas con predominio de IL-6 y la ausencia de IL-13 en los sobrenadantes de biopsias de CU cultivadas *in vitro*. Por lo anterior, la concepción de que la CU es una enfermedad mediada por Th2 sigue siendo controversial.

Las células Th17 son un subconjunto de células T caracterizado por la producción de grandes cantidades de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. Son inducidos por una combinación de IL-6 y factor de crecimiento transformante (TGF) $-\beta$, y su expansión es promovida por la IL-23 (Zhou, *et al.* 2007). Se ha estudiado ampliamente la participación de las células Th17 y, en particular, su citocina IL-17A característica en la inflamación intestinal. Se han detectado niveles elevados de transcritos de IL-17A tanto en la mucosa de la EC como en la de la CU en comparación con el intestino normal (Kobayashi, *et al.* 2008; Sugihara, *et al.* 2010). Así mismo, la mucosa inflamada de la EII cultivada *in vitro* produce niveles más altos de IL-17A que el control (Breese, *et al.* 1993). Además, las células Th17 son una fuente importante de IL-21, una citocina relacionada con IL-2 que se regula positivamente en la mucosa inflamada de la EII (Monteleone, *et al.* 2005; Sarra, *et al.* 2010).

Pese a que la relevancia clínica de las células B es desconocida, se ha observado un aumento en la activación de células B, así como de autoanticuerpos en la EII. Se ha observado en la EC un aumento en la secreción de IgG1, IgG2 e IgG3 en comparación a controles sanos; mientras que en la CU solo se ha observado un aumento en la secreción de IgG1 (Tran, *et al.* 2012; Silva, *et al.* 2019).

2.2.5 Tratamientos actuales para la CU

A la fecha, no hay una cura para la CU, por lo que, el tratamiento implica únicamente el control de los síntomas mediante la supresión de la respuesta inflamatoria para inducir un estado de remisión (Martín, *et al.* 2014). En general, el tratamiento de la CU depende de la gravedad de la CU. Las terapias farmacológicas como son los compuestos de ácido-5-aminosalicílico (5-ASA) orales o rectales, tiopurinas (azatioprina, mercaptopurina) y los corticosteroides orales o rectales, incluida la budesónida o la prednisona, se recomiendan para la inducción de remisión en una CU activa leve y moderada, así como en el mantenimiento de la remisión en pacientes con CU. Aunque se ha demostrado que todas las formulaciones de 5-ASA son eficaces para la inducción y el mantenimiento de la remisión en la CU, un subgrupo significativo de pacientes no responde. Alrededor del 35% de los pacientes con CU no logran alcanzar la remisión después de 8 semanas de terapia con 5-ASA y el 52% no logran mantener la remisión completa después de 12 meses de terapia. Sin embargo, actualmente no está claro si estos pacientes podrían beneficiarse de una dosis más alta de 5-ASA. Se ha sugerido que las diferentes respuestas al 5-ASA pueden ser debidas a polimorfismos genéticos o a interacciones con el microbioma del paciente (Van de Meeberg, *et al.* 2020).

Las opciones terapéuticas actualmente disponibles para los pacientes que no responden a 5-ASA, incluyen corticosteroides, inmunomoduladores y productos biológicos, que tienen más efectos secundarios potencialmente graves. Por ejemplo, los corticosteroides orales o sistémicos no se pueden administrar a largo plazo debido a sus efectos adversos, como son, glaucoma, retención de líquidos, problemas cognitivos y síndrome de Cushing (Sholter & Armstrong 2000). Por otro lado, el uso de fármacos inmunomoduladores, como son, las tiopurinas (azatioprina, mercaptopurina) y el tofacitinib, suelen ser muy efectivos, sin embargo, el 30-40% de los pacientes con CU no responden y un 10-20% no tolera el tratamiento por sus efectos adversos, los cuales incluyen intolerancia digestiva, pancreatitis, fiebre, artromialgias, exantema y hepatotoxicidad.

Además, los tumores de piel distintos al melanoma, los linfomas y los tumores del tracto urinario se han relacionado con la administración de tiopurinas (Bermejo, *et al.* 2018).

El tratamiento con terapias biológicas incluye medicamentos contra el TNF- α y se indica en pacientes con CU moderada a severa que han sido refractarios o intolerantes al tratamiento químico farmacológico. Varios estudios han demostrado que esta terapia biológica es efectiva en la inducción de la remisión de CU y que además mantiene la remisión a largo plazo y reduce la cantidad de hospitalizaciones en pacientes con CU moderada a severa. Sin embargo, algunos ensayos clínicos controlados aleatorios de anticuerpos anti-TNF- α en pacientes con EII han informado altas tasas de falta de respuesta que van desde 10% a 75% (Ben-Horin, *et al.* 2014). Algunos efectos secundarios que se han descrito para esta terapia biológica son infecciones respiratorias leves (rinitis, sinusitis), sequedad cutánea, hipersensibilidad (prurito, erupciones, artralgias, fiebre), insuficiencia cardíaca y exacerba o empeora los síntomas de esclerosis múltiple (Cohn, *et al.* 2017). Además, estos tratamientos son muy costosos (Van der Valk, *et al.* 2014).

2.2.6 Modelos experimentales de CU

Para comprender la etiología de la enfermedad y los mecanismos fisiopatológicos, se han desarrollado varios modelos experimentales (Nidhi, *et al.* 2014). Los más utilizados son los ratones genéticamente modificados, entre los que destacan los del tipo knockout IL-2 -/-, IL-10 -/- y TGF- β -/-; modelos inducidos por infección, destacando el modelo por infección con *Citrobacter rodentium* y el modelo *Salmonella typhimurium*; modelos de transferencia adoptiva, como son el modelo CD45 + RB High y transferencia de células CD62L + a ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID); y modelos inducidos por agentes químicos, como son el dextrano sulfato de sodio (**DSS**), el ácido tri-nitrobenzenosulfónico (**TNBS**) o el ácido di-nitrobenzenosulfónico (**DNBS**) (Nidhi, *et al.* 2014). Los modelos inducidos por la administración de agentes químicos han adquirido gran relevancia para el estudio de varios aspectos de la CU, al ser más baratos, fácilmente manipulables, generan rápida aparición de la enfermedad y reproducibles (Almero, 2007). Cada uno de los modelos químicos de colitis mencionados tienen ventajas y limitaciones en algunos aspectos de su relevancia clínica, inmunológica e histopatológica para la CU (Morampudi, *et al.* 2014).

La inducción de colitis a partir del agente químico DNBS, es un modelo de bajo costo y fácilmente reproducible que puede ser utilizado ampliamente en el estudio de las características de la CU (Goyal, *et al.*, 2014). Este modelo consta de una aplicación

intrarectal de DNBS, diluido en etanol al 50% (v/v). El etanol permite que el DNBS penetre a través de la mucosa, donde se cree que el DNBS desarrolla su actividad de hapteno, lo cual significa que actúa sobre las proteínas autólogas o microbióticas del colon, lo que las hace inmunogénicas para el sistema inmunitario del huésped, induciendo un importante grado de inflamación y lesión tisular en el colon, que se asemeja a la CU humana (Morampudi, *et al.* 2014). Este modelo permite estudiar la patogénesis de la enfermedad asociada a los desencadenantes ambientales como son la dieta y el estrés (Ghia, *et al.* 2009; Morampudi, *et al.* 2014; Reber, 2012), los mecanismos que subyacen a la inflamación intestinal y la lesión de la mucosa (Cuzzocrea, *et al.* 2001), los efectos de la inflamación sobre el sistema nervioso periférico y las vías neuronales del dolor (Boyer, *et al.* 2005; Momin & McNaughton, 2009; Saunders, *et al.* 2006), y permite estudiar los efectos de posibles terapias potenciales para combatir los síntomas de la CU (Kawada, *et al.* 2007).

2.3 Plantas medicinales para el tratamiento de CU

El término medicina alternativa se utiliza para describir aquellos métodos de atención a la salud desarrollados fuera de la medicina occidental tradicional para ser aplicados a ciertas enfermedades. Existen muchas formas de medicina alternativa, incluidas la acupuntura, homeopatía, quiropráctica, masaje terapéutico y las plantas medicinales.

De acuerdo con la Organización Mundial de la salud (OMS, s.f.), una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal en la que el todo, o una parte de ésta, contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Se han descrito el empleo de múltiples preparados herbales y botánicos para el tratamiento alternativo de la CU (Manceñido-Marcos, 2015), aunque se tienen muy poca evidencia de la eficacia de este tipo de terapia. Al respecto, solo se tiene evidencia científica para los extractos de *Boswellia serrata* (Gupta, *et al.* 1997; 2001), *Curcuma longa* (Ali, *et al.* 2007; Holt *et al.* 2005; Hanai *et al.* 2006), *Andrographis paniculata* (Tang, *et al.* 2011; Sandborn *et al.* 2013), *Potentilla erecta* (Wan, *et al.* 2014), zumo de *Citrus junos* (Abe, *et al.* 2018), aceite esencial de *Rosmarinus oficinales* (Minaiyan, *et al.* 2011) y Aloe Vera (Langhorst, *et al.* 2015; Wan, *et al.* 2014). Muchas de estas plantas son de origen asiático lo que dificulta el acceso de estos extractos a la población mexicana y su importación suele ser costosa.

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas y que forman parte de la herbolaria tradicional mexicana desde épocas

prehispánicas (Martínez, 1996). Entre las plantas medicinales mexicanas, la especie *Lepidium virginicum* L., ha sido usada por los indígenas Maya como “pich ‘tuluk”, empleando la decocción de sus raíces como tratamiento para la diarrea y disentería, y como un remedio para el dolor abdominal (Berlin, *et al.* 1996). Sin embargo, a la fecha no hay evidencias científicas que corroboren sus aplicaciones terapéuticas.

2.3.1 *Lepidium virginicum*

a) Taxonomía y Distribución

Lepidium virginicum L. es una planta herbácea perteneciente a la familia Brassicaceae originaria de Estados Unidos de América y México (Aguilar *et al.*, 1994; Arguèeta *et al.*, 1994). Dependiendo de la región donde crece, se le conoce como Lentejilla, Panalillo o chile de pájaro. Se encuentra en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados, entre el nivel del mar y los 3100 msnm. Esta planta llega a medir entre 15 a 70 cm de altura; su tallo es comúnmente ramificado y con vellosidades. Las hojas cercanas a las raíces presentan formaciones adentadas en sus bordes; mientras que las hojas en la parte superior de la planta son más pequeñas con ramificaciones más delgadas (Martínez-Castro, 2016). Sus flores, de color blanco, son pequeñas y en espigas. Mientras que, sus frutos son casi esféricos y comprimidos, con dos semillas; de una coloración verdosa, que conforme maduran se tornan anaranjadas y café (Figura 6).



Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Brassicales</i>
Familia	<i>Brassicaceae</i>
Género	<i>Lepidium</i>
Especie	<i>Lepidium virginicum</i> L.

Figura 6. Inflorescencia de *L. virginicum* L.

Suele crecer en terrenos de cultivo abandonados, a la orilla de caminos con vegetación perturbada o en regiones urbanas, observada en bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y subperennifolio, matorral xerófilo, pastizal, bosques mesófilos de montaña,

de encino, de pino, mixto de pino-encino y bosque de junípero. De este modo, se ha reportado su presencia en los estados de Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán (Villaseñor & Espinosa, 1998).

b) Características fitoquímicas de L. virginicum

La mayoría de los compuestos bioactivos que se obtienen de las plantas medicinales proceden del metabolismo secundario, los cuales pueden proceder de una ruta biosintética o de diferentes rutas (Kuklinski, 2003). Existen dos rutas básicas implicadas: la ruta del ácido shikímico, la cual es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los fenoles en las plantas, y la vía del ácido malónico que, aunque es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, es poco empleada en plantas superiores (Ávalos & Pérez-Urria, 2009). Calzada, *et al.* (2003), mediante el excrutinio del extracto crudo de las raíces de *L. virginicum*, encontró la presencia de glucosinolato de bencilo, el cual tiene actividad antiprotozoaria contra los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* con un IC50 de 100.1 µg/mL. Por otro lado, Martínez-Castro (2016) a partir de un extenso análisis fitoquímico de la especie *L. virginicum*, determinó que la composición y contenido de compuesto fenólicos y flavonoides se encuentra directamente relacionado a la actividad antioxidante de los extractos de estas planta. Además, reveló que el tallo posee un mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, y por ende una mayor actividad antioxidante.

Los compuestos fenólicos son compuesto orgánicos cuya estructura molecular se encuentra formada por al menos un grupo fenol, así como una anillo aromático unido por lo menos a un grupo funcional hidroxilo. Los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso, comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina, así como los pigmentos flavonoides (Decker, 1997). Estos compuestos tienen la capacidad de formar complejos, poseen poder reductor y resultan poco tóxicos. Estas propiedades hacen que los compuestos fenólicos tengan actividad antioxidante, que juegan un papel importante en la absorción y neutralización de los radicales libres y en la descomposición de peróxidos. Además, los compuestos fenólicos tienen efectos antiinflamatorios debido a que inhiben el proceso de adhesión de la citocinas

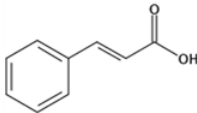
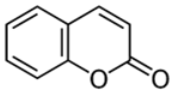
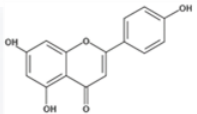
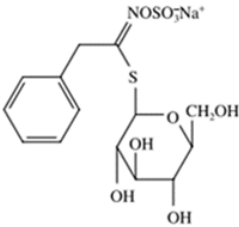
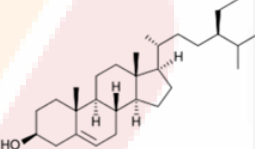
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y quimiocinas. Sin embargo, la evidencia terapéutica de los beneficios de estos compuestos aún no está clara (Jian & Dusting, 2003).

Los flavonoides pueden provenir de la ruta del ácido shikimico o la ruta de los policétidos, estos poseen al menos dos subunidades fenólicas, es decir, tienen una estructura del tipo C₆-C₃-C₆ con sus dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena de tres carbonos ciclada a través de un oxígeno (Robbins, 2003; Kuklinski, 2003). Estos metabolitos están ampliamente distribuidos entre los vegetales superiores y se encuentran en las partes aéreas como son hojas, frutos, y flores. Algunos flavonoides son los responsables del color amarillo de ciertas flores (Kuklinski, 2003). En particular, exhiben una amplia gama de efectos biológicos, desde antiinflamatoria, antioxidante, antitrombótica, antialérgica, vasodilatadora, actividad antibacteriana y antiviral (Yen, Duh, & Tsai, 1993; Siddhuraju & Becker, 2003).

Martínez-Castro (2016), también encontró la presencia de cumarinas en los extractos de *L. virginicum* (ELV) por medio de cromatografía en capa fina. Éstas son derivadas de benzo- α -pironas, cuyas propiedades farmacológicas, terapéuticas y bioquímicas dependen de su patrón de sustitución. Las cumarinas exhiben una amplia gama de actividades farmacológicas, que incluyen antidiabéticos, antivirales, antimicrobianos, anticancerígenos, antioxidantes, antiparasitarios, antiproliferativos, anticonvulsivos, antiinflamatorios y antihipertensivos (Kuklinski, 2003; Venkata Sairam, *et al.* 2016). En la tabla 3., se muestran los diversos compuestos químicos que se han encontrado en varias especies del género *Lepidium* incluida *L. virginicum* L. entre los cuales se destacan los compuestos fenólicos como son flavonoides y cumarinas, glucósidos como glucosinolatos, terpenos y esteroides.

Tabla 3. Compuestos químicos identificados en el género *Lepidium*.

Compuesto	Extracto	Estructura	Bibliografía
Compuestos fenólicos	Extracto Metanólico de tallos		(Martínez-Castro, 2016)
Cumarinas	Extracto Metanólico de tallos		(Martínez-Castro, 2016)
Flavonoides	Extracto Metanólico de hojas y tallos		(Martínez-Castro, 2016)
Glucosinolato de bencilo	Extracto metanólico de raíz		(Calzada et al., 2003).
β -Sitosterol	Extracto metanólico de raíz.		(Calzada et al., 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

La CU es una enfermedad intestinal inflamatoria de causa desconocida, caracterizada por inflamación en el colon, diarrea y dolor abdominal. En México, el número de pacientes con colitis ha ido en aumento. Actualmente, existen en el mercado fármacos que pueden ser efectivos en el tratamiento de la inflamación y dolor por colitis. Sin embargo, alrededor del 20% de los pacientes con CU no responden a estos fármacos y/o tienen efectos secundarios adversos como son irritabilidad del tracto gastrointestinal, estreñimiento, dolor de cabeza, diarrea, riesgos de padecer infecciones, entre otros. Por tal motivo, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento. El uso de plantas medicinales pueden ser una alternativa importante. Al respecto, la gran diversidad vegetal y la amplia riqueza cultural de México han favorecido el aprovechamiento de las plantas con fines medicinales. La planta *L. virginicum* conocida comúnmente como lentejilla ha sido usada de manera tradicional desde los mayas como remedio para el alivio de diarrea y disentería, por lo que dicha planta puede ser una alternativa potencial para el tratamiento de la CU. Sin embargo, a la fecha no hay estudios científicos que demuestren su potencial terapéutico. Por lo que, es necesario determinar si los extractos de esta planta tienen propiedades antiinflamatorias en un modelo experimental de colitis. Los datos obtenidos en este estudio van a contribuir a la generación de conocimiento nuevo que puede potencialmente dar una alternativa de tratamiento para la CU, así como a la conservación y recuperación del conocimiento de las plantas medicinales que forman parte de la herbolaria tradicional mexicana desde épocas prehispánicas.

4. HIPOTESIS

El extracto de *L. virginicum* tiene efectos antiinflamatorios sobre la colitis aguda inducida con DNBS.

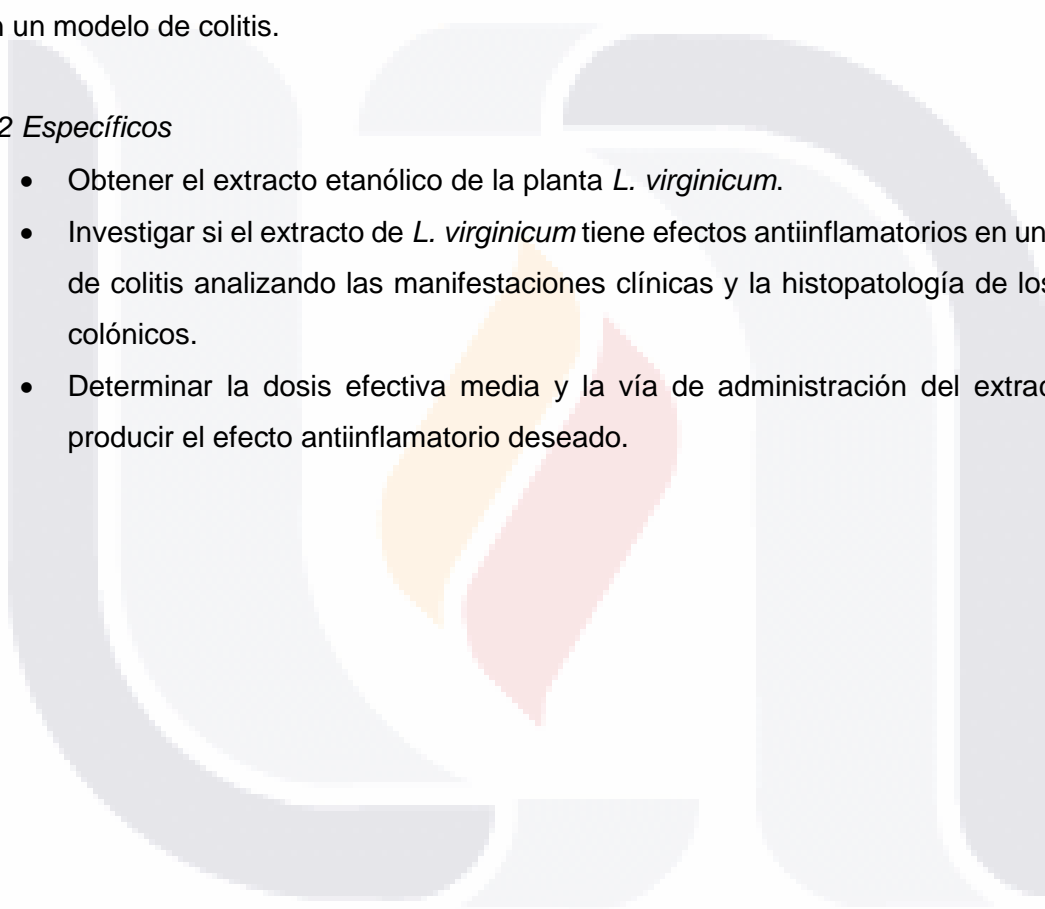
5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar los posibles efectos antiinflamatorios del extracto obtenido de *L. virginicum* en un modelo de colitis.

5.2 Específicos

- Obtener el extracto etanólico de la planta *L. virginicum*.
- Investigar si el extracto de *L. virginicum* tiene efectos antiinflamatorios en un modelo de colitis analizando las manifestaciones clínicas y la histopatología de los tejidos colónicos.
- Determinar la dosis efectiva media y la vía de administración del extracto para producir el efecto antiinflamatorio deseado.



6. METODOLOGÍA

6.1 Preparación del extracto de *L. virginicum* (ELv)

L. virginicum se colectó en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), en Aguascalientes, México, en época de primavera del mes de marzo del 2019 y se depositó una muestra de comprobante en el herbario de la UAA con el número de acceso 30775. Para la colecta se seleccionaron plantas de aproximadamente 25 cm de altura. Las plantas colectadas se secaron a temperatura ambiente (~27°C) durante 15 días, posteriormente se les seccionó el tallo y se molieron en una licuadora. El polvo obtenido se colocó en matraces Erlenmeyer de 500 ml a temperatura ambiente con etanol acuoso 95% v/v con agitación ocasional por 24 horas. El extracto se separó por filtración y los residuos se re-percolaron hasta una ausencia de color verdoso en el etanol. El filtrado colectado se trató en un rotavapor digital al vacío para la eliminación del solvente. El extracto se almacenó en un lugar fresco y en oscuridad. Para realizar el experimento biológico, se resuspendió el concentrado en una solución salina fisiológica 9% y etanol al 20%.

6.2 Inducción de la colitis aguda con el compuesto DNBS en ratas Wistar (*Rattus norvegicus*)

Las ratas Wistar hembras de entre 200-250 g de peso se mantuvieron en el bioterio en condiciones controladas de temperatura (22-24 °C) y ciclos de luz-obscuridad de 12-12 horas con alimento y agua potable *ad libitum*. Todos los animales se trataron conforme a la normativa institucional a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, referente a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

La colitis inducida por la administración rectal del compuesto DNBS es un modelo ideal para este estudio, debido a que se encuentra bien caracterizado, es muy simple, barato, genera una respuesta inmune, y tiene similitudes con la CU en humanos (Morampudi, *et al.* 2014; Nidhi, *et al.* 2014). La colitis se indujo por administración intrarrectal de una dosis única de 200 mg/Kg de DNBS en 250 µL de etanol al 50%. Las ratas control (sin colitis) recibieron solamente etanol al 50%, todo bajo anestesia (1.5% de isoflurano), para evitar el sufrimiento del animal.

Grupos de animales:

Los animales se asignaron al azar en 2 grupos respecto a la vía de administración del extracto (oral o intraperitoneal [I.P.]) divididos en 5 subgrupos, con al menos 5 ratas en cada uno de estos, quedando de la siguiente manera:

1. **Grupo control:** sin colitis y tratados únicamente con solución salina (2 ml/Kg).
2. **Grupo ELv:** sin colitis y tratados con el extracto de *L. virginicum* (ELv) a dosis de (3, 30, 100 y 300 mg/kg)
3. **Grupo DNBS:** con colitis tratados únicamente con solución salina (2 ml/Kg)
4. **Grupo DNBS + ELv:** con colitis tratados con el extracto de *L. virginicum* a diferentes dosis (3, 30, 100 y 300 mg/kg).
5. **Grupo DNBS+5-ASA:** es el grupo de referencia con colitis tratado con 100 mg/kg de ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) vía intrarrectal.

Todos los tratamientos se llevaron a cabo 24 horas después de la inducción de colitis (día 0) y se continuó las dosis cada 24 horas, diariamente durante 4 días.

6.3 Evaluación de la severidad de la colitis

Para determinar la severidad de la colitis, se registró diariamente el peso corporal, la consistencia de las heces, y la presencia de sangrado fecal. Éste último se determinó utilizando tiras reactivas Hema-screen (immunostics, inc, USA) para determinación de sangre oculta. La consistencia de las heces y la sangre fecal o anal se calificó según lo descrito por Melgar *et al.* (2005) (Ver tabla 4). Los cambios en el peso corporal se calcularon normalizando el peso corporal de los días posteriores a la administración del DNBS respecto al peso corporal inicial de la rata tomado como día 0 (100%), y se expresaron como % de peso corporal.

Para evaluar el daño macroscópico del colon se utilizó la escala de Morris *et al.* (1989), con modificaciones leves, donde 0 = sin sangrado, ni úlceras y/o edemas; 1 = sangrado leve, edema leve o erosión de la mucosa leve; 2 = edema moderado, úlceras o erosiones sangrantes; 3 = severa ulceración, erosiones, edema, necrosis tisular y perforación. La determinación de estos puntajes se hizo mediante el método de doble ciego para evitar sesgos en la puntuación.

Tabla 4. Puntaje de diarrea y sangrado rectal (Melgar *et al.*, 2005)

Score	Consistencia de las heces fecales	Sangre fecal o rectal
0	Heces duras	Normal (sin sangre)
1	Heces pastosas	Un poco sangrientas
2	Heces aguadas	Sangre moderada
3	Diarrea líquida	Sangrado a través del ano

6.4 Actividad de mieloperoxidasas (MPO) en muestras de tejido colónico de ratas

Para los ensayos de MPO, se recolectaron muestras completas del colon distal de los 5 grupos de ratas y se colocaron en tubos de 2.0 ml con 0.5% de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) en buffer de fosfato de potasio (50 mM, pH 6). Después, el tejido se homogenizó por 10 segundos con un homogeneizador Benchmark Scientific D1000 manual en frío. Enseguida, las muestras homogenizadas se centrifugaron a 13,400 x g a 4°C durante 10 minutos en una centrifuga Hermle Z216 MK, para posteriormente recuperar el sobrenadante para cuantificar la actividad enzimática de la MPO a través del ensayo colorimétrico descrito por Kim *et al.*, 2012.

Para ello, se agregaron 7 µL del sobrenadante a una solución de buffer de fosfato de potasio (50 mM, pH 6) conteniendo 0.167 mg/ml de o-dianisidina-diclorhidrato y 0.0005% de peróxido de hidrogeno (H₂O₂). Los cambios en absorbancia se midieron a 450 nm con un lector de microplacas para absorbancia iMark (Bio-rad). Para cuantificar la actividad de la enzima MPO, se consideró que una unidad (U) de MPO = 1 µmoL de H₂O₂ separado y que 1 µmoL de H₂O₂ da un cambio en la absorbancia de 1.13 x 10⁻² nm /min. Las unidades de MPO en cada muestra se determinaron como cambios en absorbancia [ΔA (t2-t1)] / Δmin x (1.13 x 10⁻²). Para obtener unidades por mg de tejido, se usó la relación de tejido: buffer (Kim *et al.*, 2012).

6.5 Evaluación histopatológica de la inflamación mediante la técnica histológica de hematoxilina y eosina (H & E)

La evaluación histopatológica se llevó a cabo de la siguiente manera. Los grupos de ratas Wistar se sacrificaron utilizando pentobarbital sódico (37.8 mg/kg) al cuarto día después de la inducción de la colitis. Se recolectaron muestras de colon de aproximadamente 1 cm de longitud de cada uno de los grupos de ratas, fijándolas individualmente en formalina al 10%, enseguida se deshidrataron e incluyeron en parafina por medio del Sistema automático de infiltración de tejidos Leica TP1020, en donde el proceso tomó 12 horas, una hora por cuba, aquí el tejido fue deshidratado con alcoholes de manera gradual y de menor a mayor. Se aclaró y fijó el tejido con xilol. Finalmente, el tejido fue incluido en parafina y colocado en el centro de inclusión Leica EG1150H para hacer los cubos. Posteriormente, se realizaron cortes de 7 μm de grosor con la ayuda de un micrótopo manual Leica RM2235. Los cortes fueron extendidos en un baño maría (aprox. 40°C) y recuperados en los portaobjetos. Las laminillas se colocaron en un horno a 60°C durante 16 horas para eliminar el exceso de parafina y entonces fueron sometidas a una tinción con hematoxilina-eosina (H & E) en una estación de tinción automatizada Leica ST4040 Linear Stainer. Una vez teñidas, las laminillas se analizaron bajo un microscopio de luz blanca a una magnitud de 4x, para determinar la infiltración de células del sistema inmune en las capas del intestino, así como la integridad de las criptas intestinales.

6.6 Análisis de la expresión del ARNm de algunos mediadores inflamatorios

Se analizó la expresión del ARNm de los mediadores inflamatorios NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-6, y CXCL-1 en los tejidos de colon de los 5 grupos de ratas. Para ello, se obtuvo de 50-100 mg de tejido colónico y se resuspendió en 1 ml de Trizol®. Después, se procedió a la extracción de ARN total por el método Trizol de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN total se evaluó usando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y su pureza se estableció mediante la relación de absorbancia a longitudes de onda 260/280. La síntesis de cDNA se realizó con el kit iScript cDNA synthesis kit (Bio-rad) utilizando una transcriptasa reversa MMuLV en un termociclador T100 (Bio-rad). Para la reacción en cadena de la polimerasa de punto final se empleó 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP, 0.2 mM de oligonucleótidos, 0.5 U de Taq DNA polimerasa (Life Technologies, Texas, USA), y 1X de buffer de PCR ajustado con agua libre de nucleasas (DEPC; del inglés Diethyl pyrocarbonate) a un volumen final de 25 μl . Todas las PCR fueron

realizadas en un termociclador T100 (Bio-rad). En todos los casos, se usaron condiciones estándar; una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C, seguidos por 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento 30 segundos y una extensión a 72 °C, seguido de una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Únicamente se modificó la temperatura de alineamiento y el tiempo de extensión en cada una de las reacciones. En la tabla 5, se muestran las secuencias y temperaturas de alineamiento utilizados en los ensayos de PCR punto final para cada uno de los genes. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % y teñido con bromuro de etidio (0.0005 mg/ml). El análisis densitométrico de la expresión de los amplicones de cada gen se realizó utilizando el software de libre acceso Image J. El análisis de expresión se realizó utilizando la expresión de un gen constitutivo como el GAPDH.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la evaluar la expresión de genes proinflamatorios

Gen	Secuencia		Tm	Tamaño del producto
GAPDH NM_017008.4	Forward (Fw)	5' - CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG - 3'	55 °C	576 pb
	Reverse (Rv)	5' - CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG - 3'		
IL-1β NM_031512.2	Forward (Fw)	5' - GCA CAG TTC CCC AAC TGG TA - 3'	55 °C	191 pb
	Reverse (Rv)	5' - GGA GAC TGC CCA TTC TCG AC - 3'		
IL-6 NM_012589.2	Forward (Fw)	5' - TAG TCC TTC CTA CCC CAA TTT CC - 3'	55 °C	76 pb
	Reverse (Rv)	5' - TTG GTC CTT AGC ACT CCT TC - 3'		
CXCL-1 NM_030845.1	Forward (Fw)	5' - GAA GAT AGA TTG CAC CGA - 3'	55 °C	365 pb
	Reverse (Rv)	5' - CAT AGC CTC TCA CAC ATT TC - 3'		
TNF-α NM_012675.3	Forward (Fw)	5' - ATG GGC TCC CTC TCA TCA GT - 3'	55 °C	340 pb
	Reverse (Rv)	5' - CAA GGG CTC TTG ATG GCA GA - 3'		
NF-κB NM_001276711.1	Forward (Fw)	5' - CAC CTA CGA TGG GAC GAC AC - 3'	55 °C	528 pb
	Reverse (Rv)	5' - GCT GCC TGG ATC ACT TCA ATG - 3'		

6.7 Análisis de datos

Los datos numéricos que se obtuvieron fueron analizados estadísticamente utilizando el software Graphpad Prism 7 (San Diego, CA, USA). Para probar diferencias entre dos grupos se utilizó la prueba t-student no pareada. Para datos obtenidos de más de dos grupos diferentes se utilizó un Análisis de Varianza, ANOVA con una prueba *post-hoc* de Bonferroni. Los datos fueron considerados estadísticamente significativos cuando los valores de P fueron menores a 0.05.

7. RESULTADOS

7.1 Obtención del extractos de *L. virginicum*

Se colectaron 632 g de materia fresca de *L. virginicum*, se les quitaron las hojas quedando únicamente los tallos, los cuales se secaron a temperatura ambiente protegidas del sol y se pulverizaron hasta obtener un polvo, correspondiente a 442.8 g, lo que representó un rendimiento de 5.8% (0.058 g de extracto por cada g de biomasa seca de tallo). Con el polvo obtenido se preparó el extracto etanólico de *L. virginicum*.

7.2 Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre la pérdida de peso inducida por la administración intrarrectal de DNBS en ratas Wistar.

Todas las ratas a las que se les indujo colitis mediante la aplicación intrarrectal de 200 mg/kg de DNBS mostraron una pérdida de peso significativa a partir del primer día después de la inducción, para el cuarto día perdieron alrededor del 10% de su peso corporal inicial (Figura 7 A y B). Esta pérdida de peso corporal inducida por el DNBS fue estadísticamente significativa comparada con las ratas control, las cuales mantuvieron su peso corporal desde el inicio del experimento. Veinticuatro horas después de inducir colitis, las ratas fueron tratadas vía oral o I.P con 3, 30, 100 o 300 mg/kg/día del extracto de *L. virginicum* (ELv) durante 4 días. La pérdida de peso inducida por el DNBS no se recuperó con la administración oral del ELv a las diferentes dosis administradas (Figura 7A), pues el porcentaje de pérdida de peso fue muy similar entre los grupo DNBS y con tratamiento (DNBS $7.8 \pm 0.5\%$ vs DNBS + 3 mg/Kg ELv $6.8 \pm 2.2\%$; DNBS + 30 mg/Kg ELv $7.17 \pm 0.9\%$; DNBS + 100 mg/Kg ELv $5.3 \pm 1.3\%$ y DNBS + 300 mg/Kg ELv $9.5 \pm 2.2\%$). En la figura 7A, se puede observar que la administración oral de 100 mg/Kg del ELv a ratas DNBS mejoró un poco la pérdida de peso, pero esta recuperación no fue estadísticamente significativa. Mientras que los tratados con inyecciones I.P con 30 mg/Kg mostraron una reducción de la pérdida de peso inducida por DNBS estadísticamente significativa ($P < 0.05$) a partir del segundo día después de la inducción de colitis (DNBS + 30 mg/Kg ELv $2.15 \pm 2.97\%$ vs DNBS $11.95 \pm 1.7\%$). Mientras que con inyecciones I.P de 100 mg/Kg de ELv mostraron una reducción significativa de la cantidad de pérdida de peso inducida por el DNBS a partir del primer día de tratamiento. Sin embargo, las ratas tratadas con 300 mg/kg de ELv no mostraron una reducción significativa en la pérdida de peso (Figura 7B). Ni el extracto por sí solo, ni las dosis de 3 mg/kg afectaron los pesos corporales, puesto que son muy similares a los pesos del grupo control.

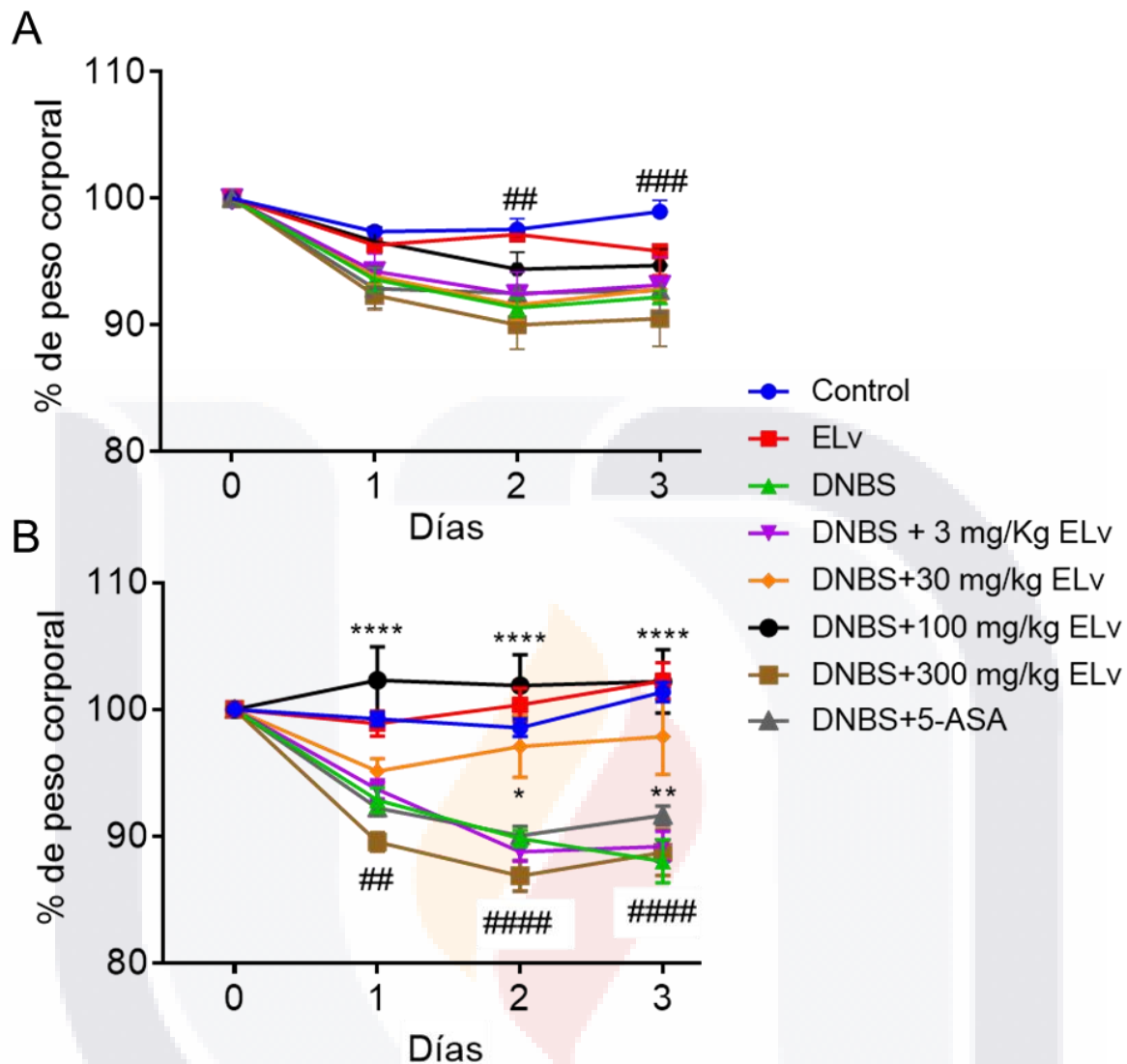


Figura 7. Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre la pérdida de peso corporal (%) de los animales con colitis inducida por DNBS. Los cambios en el peso corporal se calcularon normalizando el peso corporal de los días posteriores a la administración del DNBS respecto al peso corporal inicial de la rata tomado como día 0. **A)** Administración vía oral del extracto de *L. virginicum*, los símbolos representan el valor promedio y las líneas verticales los errores estándar del promedio (S.E.M) obtenidos de control N = 5; ELv N = 5; DNBS N = 5; DNBS + 3 mg/Kg ELv N = 4; DNBS + 30 mg/Kg ELv N = 5; DNBS + 100 mg/Kg ELv N = 5; DNBS + 300 mg/kg ELv N = 5; DNBS + 5-ASA N = 4. **B)** Administración vía I.P. del extracto de *L. virginicum*, los símbolos representan el valor promedio y las líneas verticales los errores estándar del promedio (S.E.M) obtenido de control N = 24; ELv N = 24; DNBS N = 25; DNBS + 3 mg/Kg ELv N = 5; DNBS + 30 mg/Kg ELv N = 5; DNBS + 100 mg/Kg ELv N = 9; DNBS + 300 mg/kg ELv N = 5; DNBS + 5-ASA N = 14. ## $P < 0.005$, ### $P < 0.0005$ y #### $P < 0.0001$ denota estadísticamente significativo cuando se compara control vs DNBS; * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, y **** $P < 0.0001$ denota estadísticamente significativo cuando se compara DNBS vs tratamiento, por una ANOVA de dos vías con una prueba *post-hoc* de Bonferroni.

7.3 Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre la diarrea inducida por la administración intrarrectal de DNBS en ratas Wistar.

Se examinó si el ELv atenuaba las manifestaciones clínicas de la colitis en un modelo experimental inducido por una dosis única de DNBS (200 mg/Kg) administrada intrarrectalmente en ratas Wistar, evaluando la consistencia de las heces según la escala de Melgar, *et al.* (2005).

Las ratas tratadas con DNBS mostraron puntajes de diarrea más altos que las ratas control. Las ratas control mostraron un puntaje de diarrea menor a 1, mientras que las ratas DNBS presentaron puntajes de diarrea mayores a 2 (vía oral: Control 0.2 ± 0.1 vs DNBS 2.2 ± 0.04 y vía I.P: control 0.9 ± 0.1 vs DNBS 2.2 ± 0.1). El tratamiento oral con el ELv disminuyó significativamente el puntaje de diarrea en ratas DNBS tan solo en la dosis de 100 mg/kg (DNBS + 100 mg/Kg ELv = 1.48 ± 0.18) (Fig. 8A). Entretanto, la inyección I.P con el ELv disminuyó significativamente el puntaje de diarrea en las ratas DNBS en las cuatro dosis administradas (DNBS + 3 mg/Kg ELv = 1.8 ± 0.04 ; DNBS + 30 mg/Kg ELv = 1.5 ± 0.2 ; DNBS + 100 mg/Kg ELv = 1.5 ± 0.05 ; DNBS + 300 mg/kg ELv = 1.4 ± 0.1). Cabe destacar que el puntaje de diarrea en los grupos DNBS tratados con inyecciones I.P de 30, 100 y 300 mg/kg de ELv fue similar al grupo de referencia tratado con 5-ASA (1.5 ± 0.08), el cual es un fármaco antiinflamatorio utilizado para tratar CU (Fig. 8B).

7.4 Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre el sangrado rectal inducido por la administración intrarrectal de DNBS en ratas Wistar.

El puntaje de sangrado rectal se determinó según lo descrito por Melgar, *et al.* (2005) y se utilizaron tiras reactiva Hema screen para analizar la sangre fecal oculta. Los resultados mostraron que las ratas que recibieron intrarrectalmente la dosis única de 200 mg/Kg de DNBS tuvieron puntajes de sangrado fecal más altos que las ratas control (vía oral: Control 0 vs DNBS 1.8 ± 0.2 y vía I.P: control 0.1 ± 0.1 vs DNBS 1.6 ± 0.1), estos valores fueron estadísticamente significativos ($P < 0.0001$; Figura 9 A y B). El tratamiento oral con 3 o 300 mg/Kg de extracto no mejoró el sangrado inducido por DNBS (DNBS 1.8 ± 0.2 vs DNBS + 3 mg/Kg ELv 1.5 ± 0.25 y DNBS + 300 mg/Kg ELv 1.4 ± 0.14). Sin embargo, los tratamientos orales con 30 y 100 mg/Kg de extracto atenuaron significativamente la presencia de sangre en las heces (DNBS + 30 mg/Kg = 1.04 ± 0.08 ; DNBS + 100 mg/Kg = 1.2 ± 0.1) (Figura 9 A). La inyección I.P con 3 mg/Kg de extracto no mejoró el sangrado inducido por DNBS pues el puntaje de sangre en heces fue muy similar al grupo DNBS sin tratamiento (DNBS + 3 mg/Kg ELv 2.1 ± 0.06 vs DNBS 1.6 ± 0.2), pero los tratamientos con inyecciones I.P de

30, 100 y 300 mg/Kg de ELv atenuaron significativamente la presencia de sangre en las heces, con valores muy similares a los controles (DNBS + 30 mg/Kg = 0.6 ± 0.0 ; DNBS + 100 mg/Kg = 0.6 ± 0.2 ; DNBS + 300 mg/kg = 0.4 ± 0.07) (Figura 9 B). Sorpresivamente, el antiinflamatorio 5-ASA no disminuyó el sangrado en las ratas DNBS, mostrando un puntaje similar al del grupo DNBS sin tratamiento (Vía oral: DNBS + 5-ASA = 1.8 ± 0.1 ; DNBS = 1.8 ± 0.2 y vía I.P: DNBS + 5-ASA = 1.5 ± 0.1 ; DNBS = 1.6 ± 0.2) (Fig. 9 A y B).

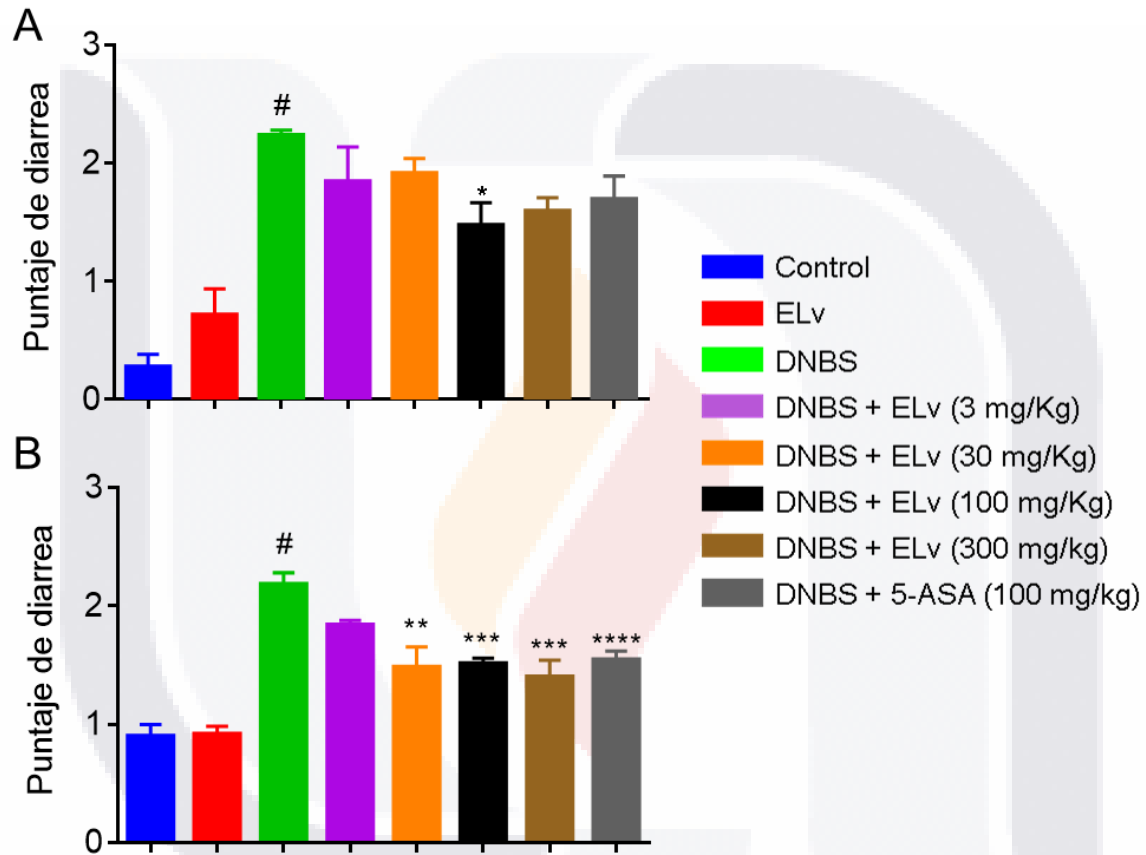


Figura 8. Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre la diarrea inducida por DNBS en ratas Wistar. El puntaje de la consistencia de las heces se determinó según lo descrito por Melgar *et al.* (2005), donde 0 = heces duras; 1 = heces pastosas; 2 = heces aguadas y 3 = diarrea líquida **A)** Administración vía oral del extracto de *L. virginicum*, los símbolos representan el valor promedio y las líneas verticales los errores estándar del promedio (S.E.M) obtenidos de control N = 5; ELv N = 5; DNBS N = 5; DNBS + 3 mg/Kg ELv N = 4; DNBS + 30 mg/Kg ELv N = 5; DNBS + 100 mg/Kg ELv N = 5; DNBS + 300 mg/kg ELv N = 5; DNBS + 5-ASA N = 4. **B)** Administración vía I.P. del extracto de *L. virginicum*, las barras representan el valor promedio y las líneas verticales S.E.M obtenidos de control N = 24; ELv N = 24; DNBS N = 25; DNBS + 3 mg/Kg ELv N = 5; DNBS + 30 mg/Kg ELv N = 5; DNBS + 100 mg/Kg ELv N = 9; DNBS + 300 mg/kg ELv N = 5; DNBS + 5-ASA N = 14. ; # P < 0.0001 denota diferencias estadísticamente significativas cuando se compara control vs DNBS, y *P < 0.05, **P < 0.005 y ***P < 0.0005 denota diferencias estadísticamente significativas cuando se compara DNBS vs tratamiento; por una ANOVA de una vía con una prueba *post-hoc* de Bonferroni.

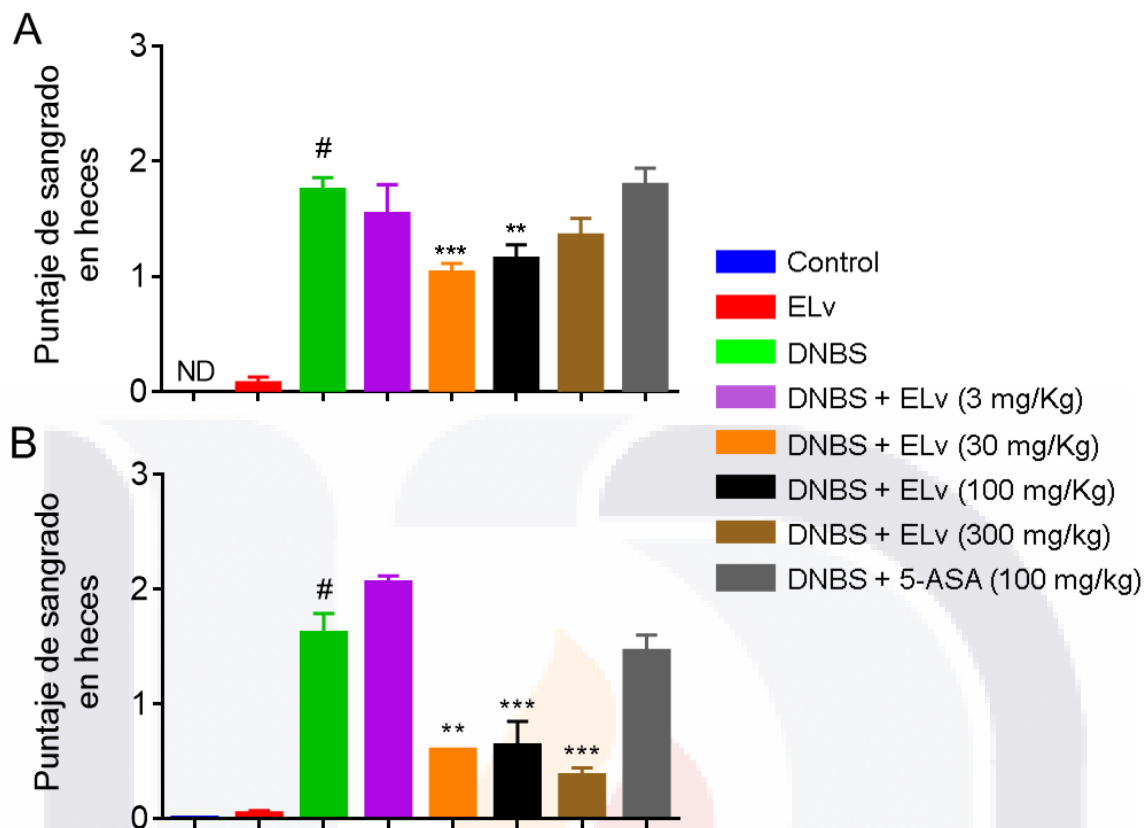


Figura 9. Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre el sangrado rectal inducido por DNBS en ratas Wistar. El puntaje de sangrado se determinó según lo descrito por Melgar *et al.* (2005), donde 0 = sin sangre 1= sangrado leve; 2 = sangrado moderado y 3 = sangrado a través del ano. La presencia de sangre oculta en heces se determinó con tiras reactivas Hema-screen. **A)** Administración vía oral del extracto de *L. virginicum*, los símbolos representan el valor promedio y las líneas verticales los errores estándar del promedio (S.E.M) obtenidos de control N = 5; ELv N = 5; DNBS N= 5; DNBS + 3 mg/Kg ELv N= 4; DNBS + 30 mg/Kg ELv N= 5; DNBS + 100 mg/Kg ELv N= 5; DNBS + 300 mg/kg ELv N= 5; DNBS + 5-ASA N= 4. **B)** Administración vía I.P. del extracto de *L. virginicum*, las barras representan el valor promedio y las líneas verticales S.E.M obtenidos de control N = 24; ELv N = 24; DNBS N= 25; DNBS + 3 mg/Kg ELv N= 5; DNBS + 30 mg/Kg ELv N= 5; DNBS + 100 mg/Kg ELv N= 9; DNBS + 300 mg/kg ELv N= 5; DNBS + 5-ASA N= 14. # P < 0.0001 denota diferencias estadísticamente significativas cuando se compara control vs DNBS. **P < 0.005 y ***P < 0.0005 denota diferencias estadísticamente significativas cuando se compara DNBS vs tratamiento; por una ANOVA de una vía con una prueba *post-hoc* de Bonferroni.

7.5 Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre el daño macroscópico del colon inducido por la administración intrarrectal de DNBS.

También se evaluó el daño macroscópico del colon ocasionado por la administración intrarrectal de 200 mg/kg de DNBS, así como el efecto de las diferentes dosis del ELv administrado a través de la vía I.P o la vía oral. La evaluación cualitativa del daño macroscópico del colon reveló que los intestinos gruesos provenientes de las ratas de los grupos control mostraron un aspecto normal, sin ningún tipo de anomalía, edema o

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

necrosis. Mientras que, los intestinos gruesos de las ratas de los grupos DNBS presentaron engrosamiento de las pared intestinal, altamente vascularizado, edemas, áreas necróticas y adherencias difusas del colon (Figura 10A y B). El tratamiento oral con el ELv no atenuó el daño macroscópico del colon inducido por la administración intrarrectal de 200 mg/Kg de DNBS en ratas Wistar, en ninguna de las dosis probadas del extracto (Figura 10A). Los grupos de ratas tratadas por vía I.P con el extracto de *L. virginicum* mostraron menor daño que el grupo DNBS, de modo que el tejido intestinal de las ratas que pertenecían al grupo DNBS + 100 mg/Kg de ELv se asemejó en gran medida al grupo control, pues no se vieron adherencias, edema y necrosis (Figura 10B).

Para evaluar cuantitativamente el daño macroscópico generado por la administración de DNBS, se utilizó la escala de Morris *et al.* (1989). El grupo control que únicamente recibió el vehículo (etanol al 50%) tuvo puntajes menores de 1, mientras que el grupo DNBS, tuvo puntajes de daño macroscópico más altos (Vía oral: DNBS 1.9 ± 0.5 y vía I.P DNBS 2.3 ± 0.2), siendo estadísticamente significativo comparado con los controles (Figura 11B). El extracto por si solo tiene puntajes de daño macroscópico muy similar a los controles (Figura 11A y B). El tratamiento oral con el ELv no atenuó el daño macroscópico del colon inducido por la administración intrarrectal de 200 mg/Kg de DNBS en ratas Wistar, en ninguna de las dosis probadas del extracto (Figura 11A). Los grupos de ratas DNBS tratadas vía I.P con 3 y 30 mg/kg de extracto mostraron puntajes de daño macroscópico muy similares al grupo DNBS (DNBS 2.3 ± 0.2 vs DNBS + 3 mg/Kg ELv 2.8 ± 0.2 y DNBS + 30 mg/Kg ELv 1.6 ± 0.3). Sin embargo, el tratamiento I.P con 100 mg/Kg de extracto en ratas DNBS redujo significativamente la presencia de hemorragias, necrosis y engrosamiento inducidas por el DNBS (DNBS + 100 mg/Kg ELv 0.8 ± 0.3 vs DNBS 2.3 ± 0.2) (Figura 11B). Cabe destacar que esta atenuación fue mucho mayor que la del fármaco 5-ASA.

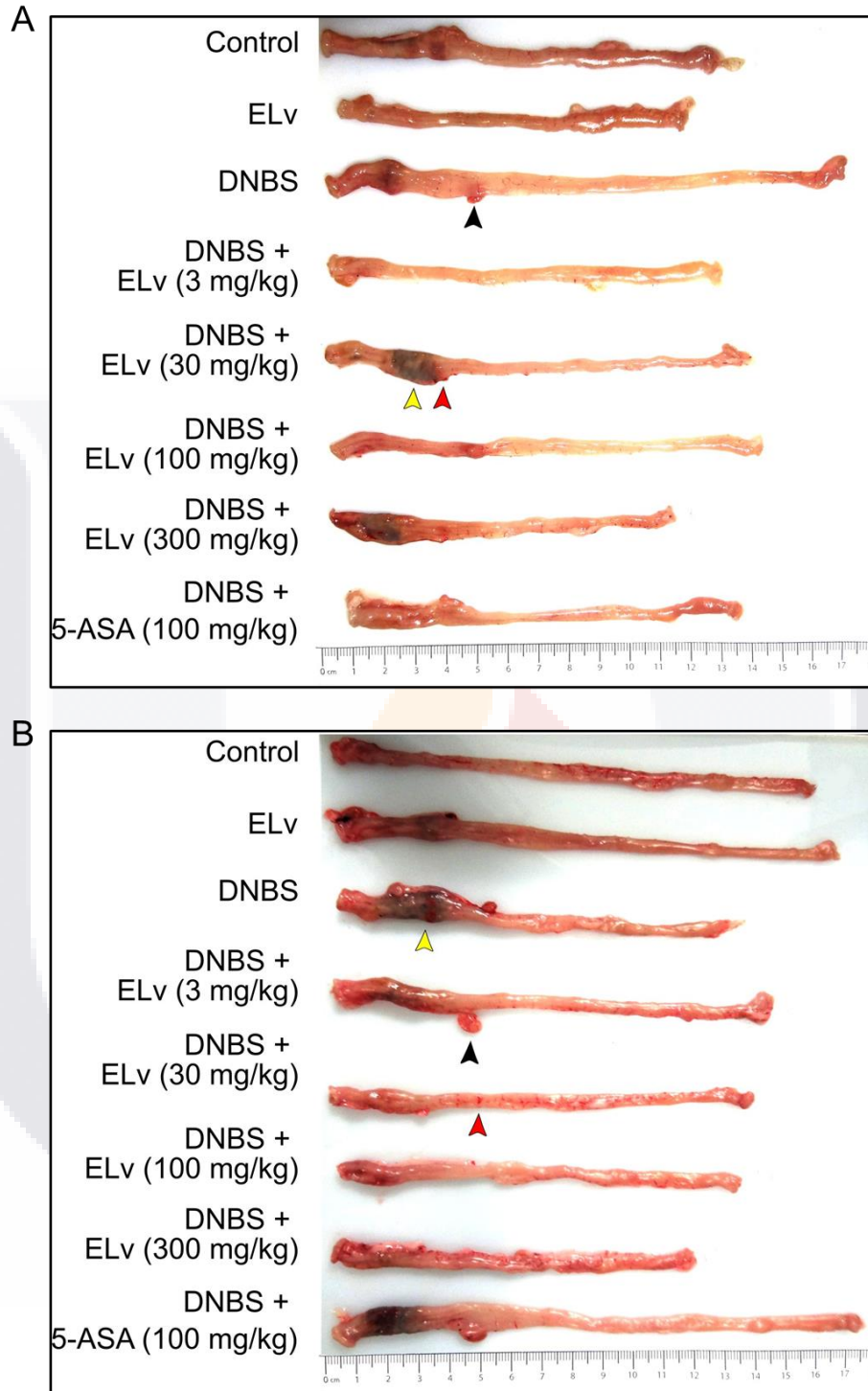


Figura 10. Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre el daño macroscópico del colon inducido por la administración intrarrectal de DNBS en ratas Wistar. Después del sacrificio de los animales, se diseccionaron los intestinos gruesos de los grupos de ratas desde la válvula ileocecal hasta el recto y se evaluó el daño macroscópico. Las imágenes son fotografías representativas de cada uno de los grupos de rata. **A)** Vía oral, **B)** Vía I.P. La cabeza de flecha amarilla indica presencia de necrosis, la cabeza de flecha negra señala la formación de adherencias en el colon y la cabeza de flecha roja apunta la presencia de sangrado. altamente vascularizado (▼), áreas necróticas (▼) y adherencias difusas del colon (▼).

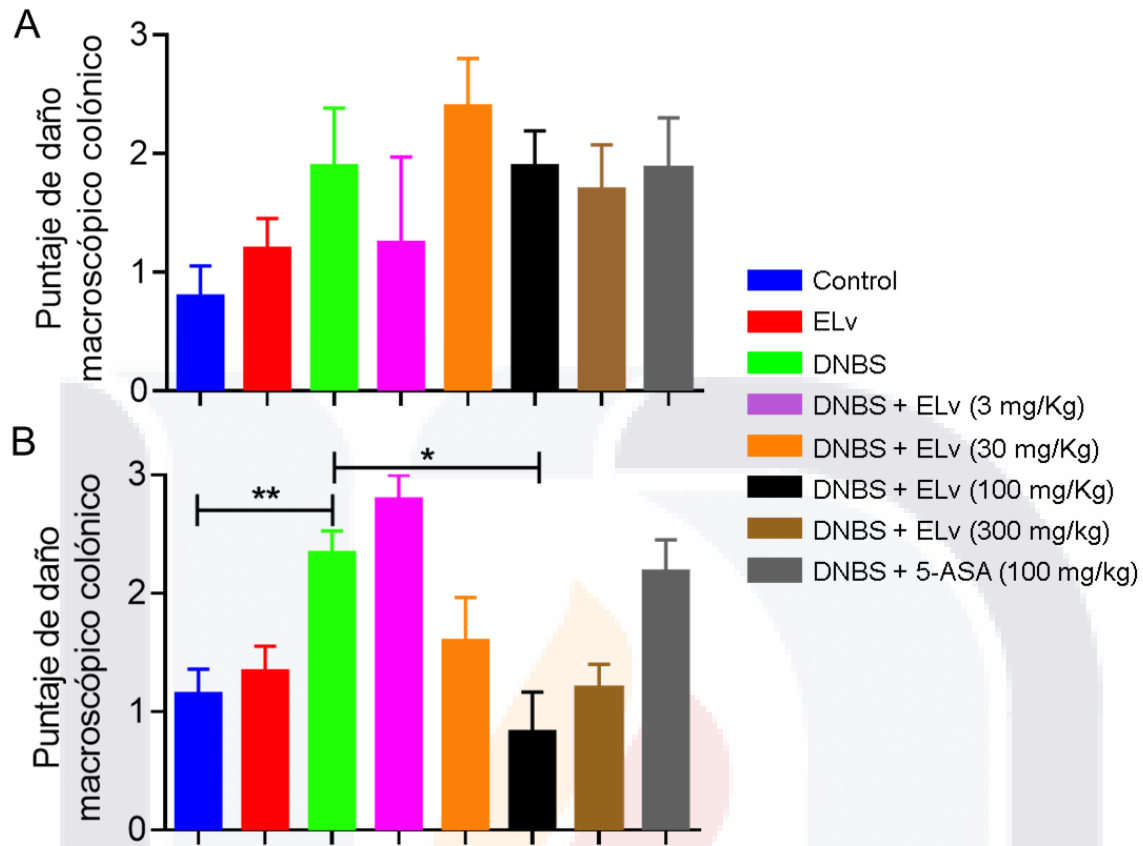


Figura 11. Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre el puntaje de daño macroscópico del colon inducido por la administración intrarrectal de DNBS en ratas Wistar. Después del sacrificio, se diseccionó el colon de los animales desde la válvula ileocecal hasta el recto y se evaluó el daño macroscópico de acuerdo con la escala de Morris et al. (1989) con modificaciones leves, donde: 0 = sin sangrado, ni úlceras y/o edemas; 1 = sangrado, edema o erosión leve; 2 = edema moderado, úlceras o erosiones sangrantes; 3 = severa ulceración, erosiones, edema y necrosis tisular. **A)** Administración vía oral del extracto de *L. virginicum*, los símbolos representan el valor promedio y las líneas verticales los errores estándar del promedio (S.E.M) obtenidos de control N = 5; ELv N = 5; DNBS N = 5; DNBS + 3 mg/Kg ELv N = 4; DNBS + 30 mg/Kg ELv N = 5; DNBS + 100 mg/Kg ELv N = 5; DNBS + 300 mg/kg ELv N = 5; DNBS + 5-ASA N = 4. **B)** Administración vía I.P. del extracto de *L. virginicum*, las barras representan el valor promedio y las líneas verticales los S.E.M obtenidos de control N = 5; ELv N = 5; DNBS N = 5; DNBS + 3 mg/Kg ELv N = 5; DNBS + 30 mg/Kg ELv N = 5; DNBS + 100 mg/Kg ELv N = 5; DNBS + 5-ASA N = 5. **P < 0.005; ***P < 0.0005 denotan estadísticamente significativo por una ANOVA de una vía con una prueba *post-hoc* de Bonferroni.

7.6 Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre la relación longitud y peso del colon inducido por la administración intrarrectal de DNBS

Una característica de la inflamación intestinal es el engrosamiento y el acortamiento concomitante del intestino grueso que se puede medir en las ratas como un aumento en la relación peso/longitud del colon. De acuerdo con su pérdida de peso, las ratas que recibieron el DNBS demostraron una relación peso/longitud del colon aumentada significativamente en comparación con las ratas del grupo control (Figura 12 A y B). El tratamiento oral con el ELV no disminuyó la relación peso/longitud aumentada de las ratas DNBS, en ninguna de las dosis probadas (Figura 12A). Aunque el valor de la relación peso/longitud del colon fue significativamente menor ($P = 0.05$) en ratas DNBS inyectadas I.P con 100 mg/kg de ELV y fue similar al medido en ratas control (Figura 12B), lo que indica que la inyección I.P del ELV a esa dosis atenuó la inflamación intestinal en las ratas que recibieron el DNBS.

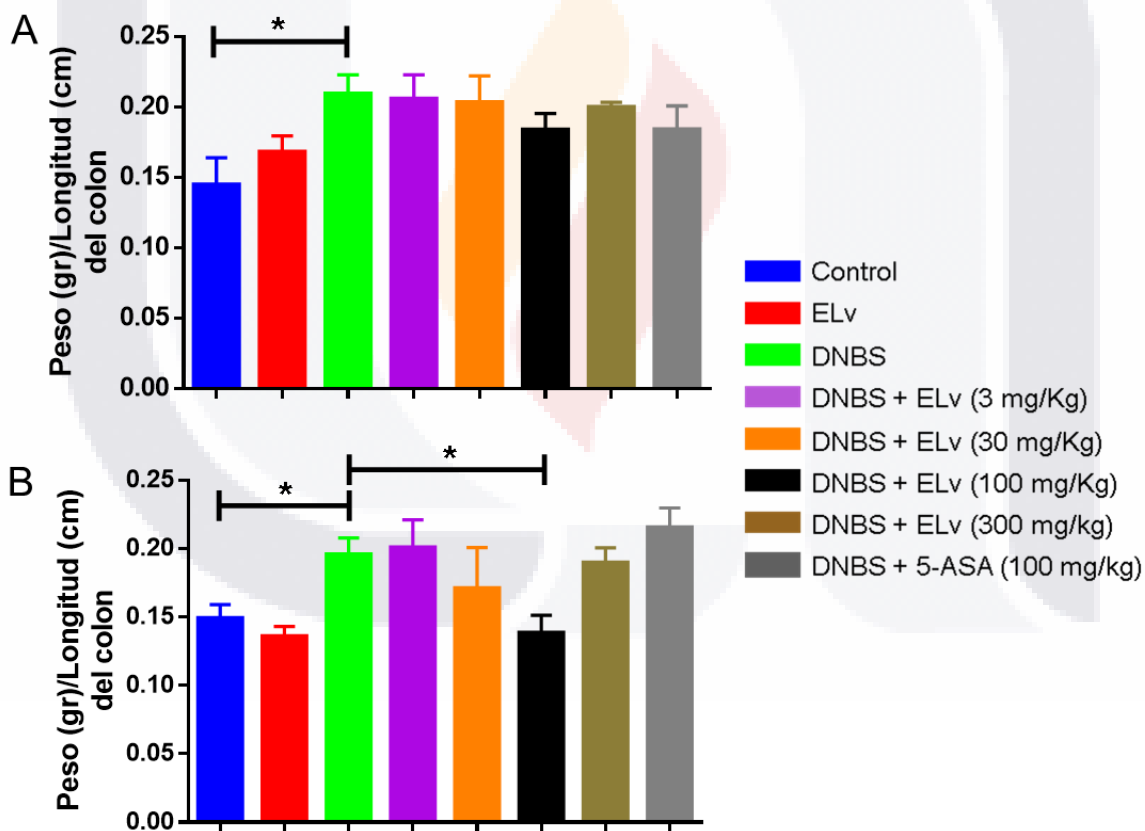


Figura 12. Relación peso/longitud del colon en ratas control y ratas con colitis inducida por la administración intrarrectal de DNBS con o sin tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum*. A) Administración vía oral del extracto de *L. virginicum*, los símbolos representan el valor promedio y las líneas verticales los errores estándar del promedio (S.E.M) obtenidos de control N = 5; ELv N = 5; DNBS N= 5; DNBS + 3 mg/Kg ELv N= 4; DNBS + 30 mg/Kg ELv N= 5; DNBS + 100 mg/Kg ELv N= 5; DNBS + 300 mg/kg ELv N=

5; DNBS + 5-ASA N= 4. **B)** Administración vía I.P. del extracto de *L. virginicum*, las barras representan el valor promedio y las líneas verticales los S.E.M obtenidos de control N = 18; ELv N = 18; DNBS N= 18; DNBS + 3 mg/Kg ELv N= 5; DNBS + 30 mg/Kg ELv N= 5; DNBS + 100 mg/Kg ELv N= 5; DNBS + 300 mg/Kg ELv N= 5 y DNBS + 5-ASA N=17. **P < 0.005; ***P < 0.0005 denotan estadísticamente significativo por una ANOVA de una vía con una prueba *post-hoc* de Bonferroni.

En conjunto, todos los resultados anteriores indican que el tratamiento con el ELv administrado por vía I.P tiene mejor efecto que al administrarse por vía oral, sobre la atenuación de la inflamación del colon inducida por la administración intrarrectal de DNBS en ratas Wistar, siendo la dosis de 100 mg/kg la más efectiva para disminuir las manifestaciones clínicas de la colitis, como son la pérdida de peso, la diarrea, el sangrado rectal y el daño macroscópico del colon. En base a estos datos, el resto de las variables solo se analizaron en los grupos de animales que recibieron el extracto vía I.P.

7.7 Curva dosis-respuesta para el extracto etanólico de Lepidium virginicum (3-300 mg/kg) en ratas Wistar administradas con DNBS.

Para calcular la dosis efectiva media (DE50) se realizó una curva dosis-respuesta analizando la ganancia de peso corporal absoluto al tercer día con las diferentes dosis del ELv en ratas Wistar con colitis. El valor DE50 fue 62.5 ± 4.62 mg/Kg de ELv (Figura 13).

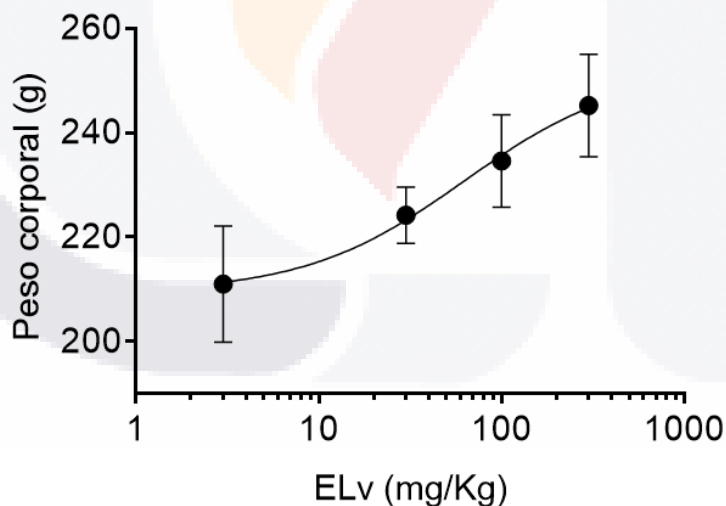


Figura 13. Curva dosis-respuesta para el ELv en ratas Wistar que se les administró DNBS. Los símbolos representan el valor promedio y las líneas verticales muestran los S.E.M. de datos obtenidos de 5 ratas. La línea sigmoidea representa el mejor ajuste a una función logística de tres parámetros.

7.8 Análisis histomorfológico del colon, en un modelo de colitis en ratas Wistar tratadas con extracto etanólico de *L. virginicum*

Después del sacrificio de los animales y la disección del colon de los diferentes grupos de ratas, se tomó aproximadamente 1 cm del colon distal de cada una de las ratas para su análisis histológico. Se cortó transversalmente el tejido colónico fijado con formalina. Posteriormente, las secciones fueron procesadas para tinción con hematoxilina/eosina. Las muestras de tejido colónico de las ratas control exhibieron una arquitectura tisular de la mucosa normal con criptas regulares y bien definidas. Así como el grosor de la capa submucosa y muscular externa normal. Por el contrario, las muestras de tejido colónico de las ratas DNBS presentaron alteraciones en el epitelio y arquitectura de la mucosa con pérdida completa de las criptas intestinales y ulceraciones, y una marcada infiltración de células inmunes en la lámina propia y submucosa (Figura 14). En comparación con el grupo de DNBS, el tratamiento I.P con el ELv (3, 30 y 100 mg/kg) atenúo de manera dependiente de la dosis las lesiones colónicas inducidas por DNBS, dando como resultado una reducción significativa de las alteraciones de la mucosa y del infiltrado celular. Las ratas tratadas con 100 mg/ Kg de extracto mostraron una recuperación histomorfológica más pronunciada que los tratamientos con 3 y 30 mg/kg de extracto (Figura 14).

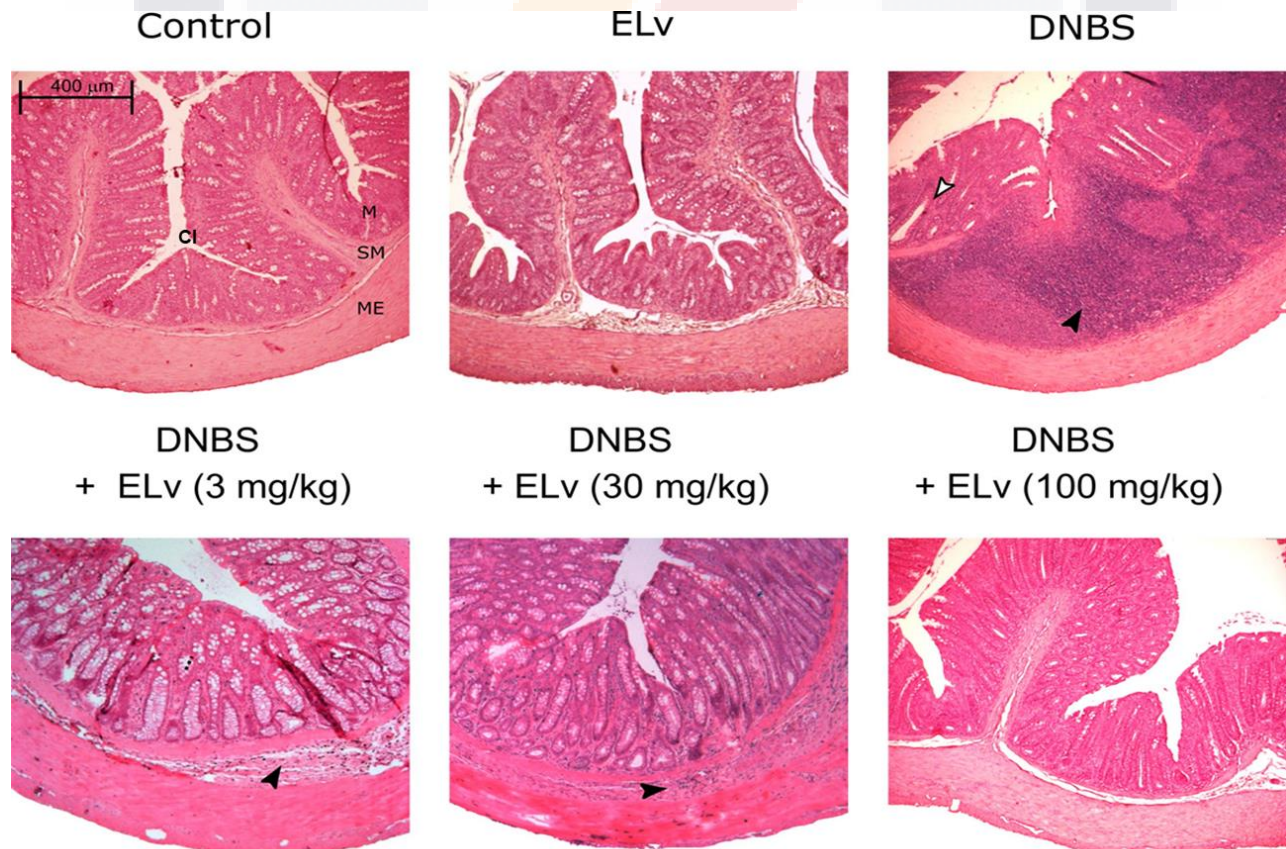


Figura 14. Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre el daño histológico del colon inducido por el DNBS en ratas Wistar. Imágenes representativas de los cortes histológicos transversales del colon distal de cada una de las ratas de los grupos Control, Extracto, DNBS, DNBS+ELv (3 mg/kg), DNBS+ELv (30 mg/kg) y DNBS+ELv (100 mg/kg) teñidos con hematoxilina y eosina a un aumento de baja potencia (2.5X). En el DNBS, la cabeza de flecha blanca y negra indican la presencia de úlceras y el infiltrado de célula inmunes, respectivamente. CI; Cripta intestinal; M, mucosa; SM, submucosa; ME, muscular externa.

7.9 Efecto del tratamiento con el extracto etanólico de *L. virginicum* sobre la actividad de la enzima MPO en tejido intestinal de ratas Wistar

La severidad de la colitis puede ser correlacionada con un aumento en la actividad de la enzima MPO, que es un indicador de la infiltración de neutrófilos que refleja la respuesta inmune local (Kim, *et al.* 2012). La actividad de MPO fue aproximadamente 4 veces más alta en las ratas tratadas con DNBS que las ratas control (Figura 15). El tratamiento I.P con 3 y 30 mg/kg de ELv no redujo la actividad de MPO inducida por el DNBS. Mientras que, el tratamiento con la dosis de 100 mg/kg y 300 mg/kg de ELv redujo la actividad de MPO inducida por el DNBS en un 77.9% comparada con el grupo DNBS, aunque estadísticamente no fue significativo. Cabe destacar que el tratamiento intrarrectal con 100 mg/kg de 5-ASA no fue efectivo en disminuir la actividad enzimática de MPO (figura 15)

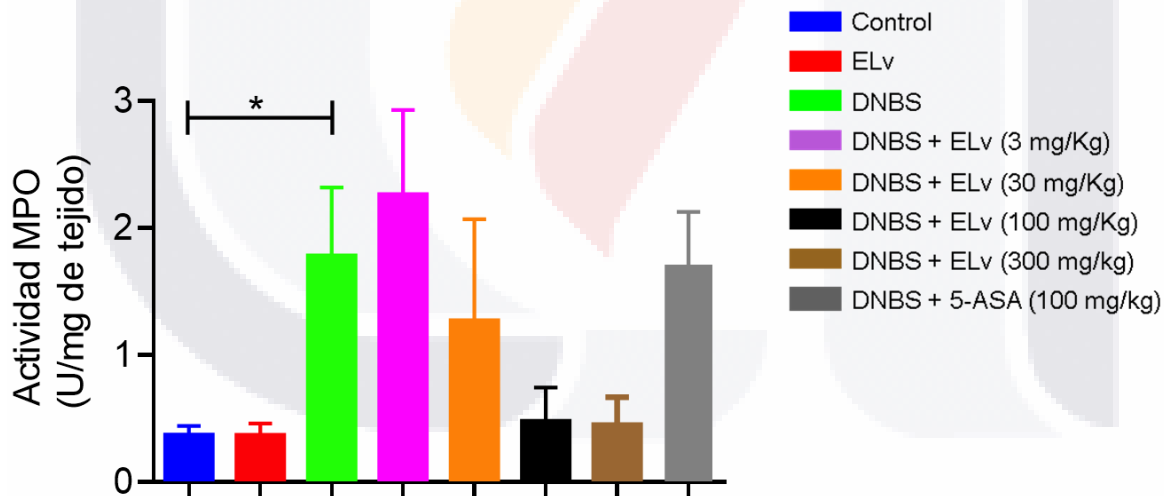


Figura 15. Efecto del tratamiento I.P con extracto etanólico de *L. virginicum* sobre la actividad enzimática de MPO en tejido colónico de ratas Wistar. Se evaluó la actividad de la enzima MPO en un grupo de animales que recibieron un tratamiento con 3 mg/kg (A), 30 mg/kg (B), 100 mg/kg (C) y 300 mg/kg (D) de ELv (CTRL n=22; DNBS n=23; ELV n=25; DNBS + 3 mg/Kg ELv N= 5; DNBS + 30 mg/Kg ELv N= 5; DNBS + 100 mg/Kg ELv N= 5; DNBS + 300 mg/Kg ELv N= 5 DNBS + 5-ASA N=15). El * denota estadísticamente significativo por ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Bonferroni (P < 0.05).

7.10 Efecto del extracto etanólico de *L. virginicum* sobre la expresión de genes proinflamatorios en ratas Wistar administradas con DNBS

Para evaluar el grado de inflamación que ocasiona el DNBS y si el tratamiento con el extracto pueden atenuar la respuesta inflamatoria, se analizó la expresión génica de CXCL-1 (quimioattractante de neutrófilos), el cual es un gen homólogo de la IL-8 de humanos (Modi & Yoshimura, 1999; Valdivia-Silva, *et al.* 2007; Sawant, *et al.* 2016), IL-1 β , IL-6, TNF- α (citocinas pro-inflamatorias) y NF- κ B (factor de transcripción que regula la expresión de los genes que codifican para mediadores inflamatorios) (Abbas, *et al.* 2018; Tatiya-aphiradee, 2018), sobre el modelo de inducción de colitis por DNBS en ratas Wistar tratadas con una dosis de 100 mg/kg del extracto.

Los niveles de TNF- α no se vieron incrementados en las ratas DNBS en comparación con el grupo control (Figura 16A). No obstante, el grupo DNBS presentó un aumento estadísticamente significativo en la expresión génica de IL-1 β de aproximadamente 1.5 veces respecto al grupo control. La expresión de IL-1 β en el tejido colónico de ratas inyectadas I.P con 100 mg/kg de ELV se redujo significativamente en comparación con los de las ratas DNBS (Figura 16B). También se observó un aumento en la expresión de IL-6, CXCL-1, y NF- κ B en los tejidos colónicos de ratas DNBS en comparación con el grupo control, pero este aumento no fue estadísticamente significativo y el tratamiento con el ELV (100 mg/kg) también tendió a disminuir los niveles de estos mediadores proinflamatorios en comparación con el grupo control, pero esta disminución no fue estadísticamente significativa (Figura 16 C, D y E).

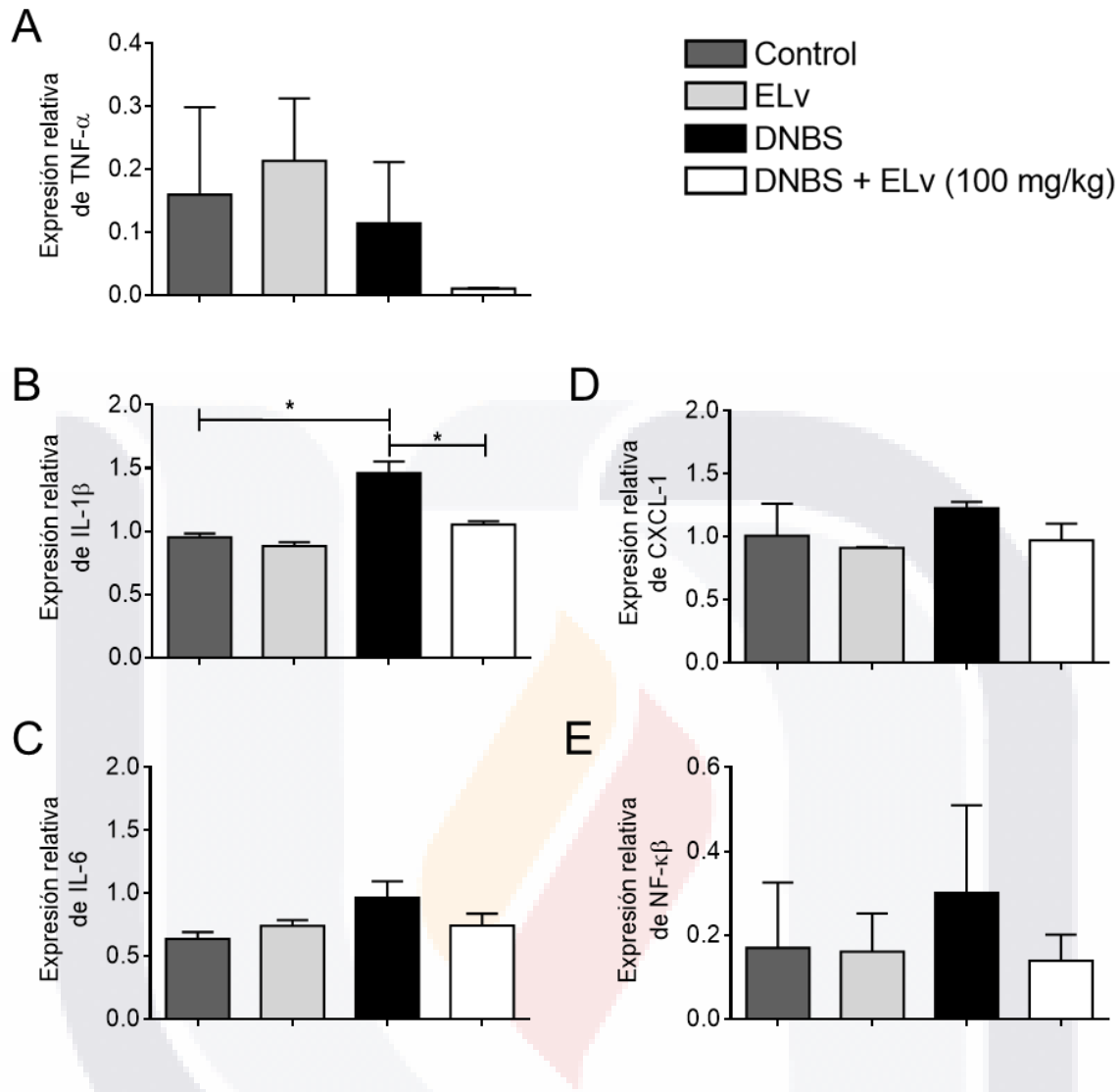


Figura 16. Efecto del tratamiento I.P. con el extracto etanólico de *L. virginicum* (100 mg/kg) sobre la expresión de genes inflamatorios en tejido colónico inflamado inducido por la administración intrarrectal de DNBS en ratas Wistar. Las barras representan el valor promedio y las líneas verticales los S.E.M obtenidos de control N = 3; ELv N = 3; DNBS N= 3; DNBS + 100 mg/Kg ELv N= 3. * $P < 0.05$ denota estadísticamente significativo por una ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Bonferroni.

8. DISCUSIÓN

En general, las terapias actualmente disponibles para la CU se limitan a la reducción de los síntomas. El uso de los inmunomoduladores inespecíficos no es suficiente debido a la falta de eficacia o a los efectos secundarios intolerables; así que, el tratamiento de la CU sigue siendo un área con importantes necesidades médicas. Este estudio demuestra por primera vez que el extracto etanólico de la planta *L. virginicum* reduce las manifestaciones clínicas de la colitis en un modelo inducido por DNBS, atenuando la condición inflamatoria. Este modelo de colitis experimental inducido por DNBS es útil para el cribado de fármacos con actividad antiinflamatoria y tiene varias similitudes con las características patológicas y clínicas de la CU humana, como son pérdida de peso, diarrea, infiltración de neutrófilos en el colon, distorsión de las criptas, lesión epitelial (Nidhi, *et al.* 2014). Además, las ratas tratadas con DNBS mostraron un acortamiento prominente del colon y un aumento del peso de éste, aumentando así la relación peso/longitud, el cual es un indicador de la gravedad de la inflamación (Yan, *et al.* 2009),

Los resultados del presente estudio indican que la vía de administración desempeña una influencia significativa sobre la eficacia terapéutica y la actividad del extracto de *L. virginicum*. De este modo, tenemos que la administración oral del extracto durante 4 días no fue tan efectiva para disminuir la condición inflamatoria de la colitis, mientras que la administración I.P, disminuyó eficientemente la inflamación inducida por el DNBS en ratas Wistar. La explicación de este hallazgo puede ser por una mala absorción de los componentes vegetales activos en el tracto digestivo o por la presencia de enzimas metabolizantes en la mucosa intestinal que pudieran estar degradando los componentes activos del extracto vegetal (Fan & Lannoy, 2014).

Los resultados de este estudio demuestran que la administración I.P de 30 y 100 mg/kg del extracto de *L. virginicum* atenuan significativamente la pérdida de peso corporal, mejora la consistencia de las heces, revierte el aumento de peso del colon y la reducción de la longitud del colon inducida por la inflamación y reduce el daño macroscópicamente visible. Estos efectos son dependientes de la dosis del extracto, siendo la dosis más efectiva la de 100 mg/kg. Además, las alteraciones en la arquitectura de la mucosa, el daño de las criptas y la infiltración de células inflamatorias inducidas por el DNBS se reducen notablemente por el tratamiento con el extracto de *L. virginicum*, sugiriendo que éste podría ser una alternativa para el tratamiento de la CU en humanos. Los efectos atenuantes de la inflamación por el extracto pueden deberse probablemente a los compuestos bioactivos

presentes en *L. virginicum*, entre los cuales se han caracterizado fenoles, flavonoides, terpenos y cumarinas (Martínez-Castro, 2016). Se ha comprobado que dichos compuestos exhiben propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Decker, 1997; Kuklinski, 2003).

Resultados similares a los obtenidos en este trabajo, han sido observados con extractos de otras plantas. Por ejemplo, Stan y colaboradores (2019) estudiaron el efecto del extracto de *Thuja occidentalis* sobre un modelo de colitis inducido por TNBS; en sus resultados encontraron que concentraciones de 25 y 50 mg/kg atenuaron algunos de los síntomas característicos de la colitis por TNBS. Se destaca que en el análisis histológico del colon, encontraron que el daño tisular producido por el TNBS fue reducido en el tratamiento con las dosis de 25 y 50 mg/kg de su extracto; así mismo, relacionan este efecto en la atenuación del daño tisular al efecto antioxidantes que detectaron en *T. occidentalis*. Por otro lado, Mostafa y colaboradores (2020) encontraron en un modelo de inducción de colitis por la administración intrarrectal de ácido acético (AA) al 4%, que el tratamiento con extracto acuoso de stevia mejoró la colitis no solo histopatológicamente, sino que también disminuyó el nivel de TNF- α , IL-1 β , MPO y la expresión de NF- κ B que se vieron aumentadas significativamente en el grupo AA. Asimismo, los extractos y aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) fueron efectivos para reducir las lesiones de tejido del colon, así como los parámetros histopatológicos de la colitis experimental inducida con TNBS (Minaiyan, *et al.* 2011). De forma muy similar, la cáscara del cítrico yuzu (*Citrus junos* Siebold ex Tanaka, Rutaceae) atenúo la patología de la colitis inducida por DSS al suprimir de manera coordinada la inflamación y el estrés oxidativo (Abe, *et al.* 2018). Tanto el romero (*R. officinalis*) como la *T. occidentalis* son de difícil acceso debido a que el romero tiene dificultad en su propagación sexual, ya que no florece con facilidad y cuando lo hace sus semillas presentan poca viabilidad (Álvarez-Herrera, *et al.* 2007). El yuzu es un fruto cítrico originario del noreste de Asia, incluyendo Japón, China y Corea (Yu, *et al.* 2011), por lo que su importación sería costosa. En cambio, *L. virginicum* está ampliamente distribuida en México y crece prácticamente en todos los terrenos y climas (Villaseñor y Espinosa, 1998), por lo que su disponibilidad es alta y sus costos de obtención o producción serían mínimos.

En el presente estudio, la pérdida de peso, el sangrado, el daño macroscópico visible y la actividad de MPO no mejoraron tras la administración intrarrectal del fármaco de referencia, 5-ASA, que es un medicamento antiinflamatorio utilizado comúnmente para el tratamiento de la CU en humanos (Van de Meeberg, *et al.* 2020). Algunos estudios han encontrado que el tratamiento intrarrectal con 5-ASA en un modelo de colitis inducido por

TNBS disminuye significativamente las manifestaciones clínicas y la actividad de MPO después del cuarto día de iniciar el tratamiento (Pereira *et al.* 2017; Li *et al.* 2014). Tomando en cuenta que nosotros sacrificamos a los animales al cuarto día después de la inducción de la colitis y comparando con respecto a los resultados obtenidos en los estudios de Li, *et al.* (2014) y Pereira, *et al.* (2017), la ausencia de un efecto atenuante por parte del 5-ASA sobre la inflamación en nuestro estudio, se pudo deber a que éste fármaco de referencia utilizado requiere un periodo de tiempo más prologado de administración para lograr observar los efectos antiinflamatorios sobre las manifestaciones clínicas de la colitis. Lo cual nos sugiere que el extracto de *L. virginicum* tiene un efecto antiinflamatorio inmediato en comparación con el 5-ASA.

Los neutrófilos tienen un papel crucial en la gravedad, la perpetuación y las complicaciones de la EII (Wera *et al.* 2016); son las primeras células que llegan a los sitios inflamatorios cuando los patógenos han atravesado la barrera epitelial. El influjo de neutrófilos provoca la degradación de la matriz extracelular y la alteración del tejido, lo que da lugar a la formación de úlceras. El tratamiento con el extracto de *L. virginicum* disminuyó la infiltración polimorfonuclear inducida por DNBS en ratas, como lo demuestra la reducción significativa en los niveles de MPO, un indicador ampliamente utilizado de la infiltración de neutrófilos en el tejido gastrointestinal inflamado (Pulli, *et al.* 2013). Además, observamos en el colon de ratas tratadas con el extracto de *L. virginicum* una menor aparición de edema y lesión tisular. El extracto a la dosis de 100 mg/kg redujo el daño tisular causado por DNBS en mayor medida que a la dosis de 30 mg/kg, lo que indica que el efecto antiinflamatorio del extracto depende de la dosis.

Una característica importante de la EII y de la colitis experimental es el alto nivel de mediadores proinflamatorios, como las citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL 6), que a su vez conducen a una inflamación crónica con ulceración y lesiones de la mucosa colónica e infiltración de leucocitos (Tatiya-aphiradee, 2018). El TNF- α parece contribuir a la ruptura de la barrera epitelial induciendo la apoptosis de las células epiteliales (Schmitz *et al.* 1999), y algunos estudios han encontrado elevados niveles de esta citocina en biopsias de pacientes con EII y en colitis experimental (Ibeakanma & Vanner, 2010). La IL-8 participa en el reclutamiento y activación de neutrófilos, lo que agrava el estado inflamatorio en la EII (Hyam *et al.* 2013), y se ha encontrado en concentraciones altas en suero y en biopsias de tejido intestinal de pacientes con CU (Reimund, *et al.* 1996; Tatiya-aphiradee, 2018). Las IL-1 β e IL-6 son importantes para la defensa gastrointestinal del huésped, pero su

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sobreproducción puede provocar una inflamación intestinal excesiva y trastornos de la motilidad intestinal (Bossone *et al.* 2001). La IL-1 β parece ser un estimulador primario del daño tisular y la diarrea, siendo esta última un síntoma importante de inflamación intestinal. En este estudio se observó una disminución significativa de la expresión del gen IL-1 β del tejido colónico en los animales tratados con 100 mg/kg de extracto de *L. virginicum* en comparación con los animales que recibieron solo DNBS, los cuales tenían los niveles de IL-1 β más elevados que los controles. También se vio una tendencia a una menor expresión de TNF- α , IL-6 y NF- κ B del tejido colónico en animales tratados con 100 mg/kg de extracto de *L. virginicum* en comparación con los animales que recibieron solo DNBS, lo que sugiere la capacidad del extracto para disminuir los niveles de ARNm de citocinas proinflamatorias, probablemente reduciendo también la expresión de las proteínas, aunque, se requieren los estudios para corroborarlo.

Las ratas control tratados con 100 mg/kg de extracto de *L. virginicum*, no mostraron alteraciones en la relación peso/longitud e histología del colon, ni alteraciones en la actividad de MPO o citocinas en los tejidos colónicos. Esto confirma que el tratamiento agudo con el extracto no alteró la homeostasis del tejido normal, sino que suprimió la inflamación en el colon cuando se presentó.

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan evidencia significativa del efecto terapéutico del extracto de *L. virginicum* para el tratamiento de la CU humana. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder establecer su efectividad a largo plazo, identificar el o los componentes activos del extracto herbal, los cuales son realmente los responsables de sus acciones farmacológicas beneficiosas. Así como, estudios farmacológicos, toxicológicos y clínicos bien diseñados antes de que puedan ser ampliamente usados en los pacientes con CU.

9. CONCLUSIÓN

Este estudio demostró que la administración I.P. del extracto etanólico de *L. virginicum* para el tratamiento de la colitis inducida por DNBS en ratas fue mejor que el tratamiento oral con el extracto.

La dosis I.P más efectiva del extracto de *L. virginicum* para atenuar los síntomas y signos de inflamación de la colitis inducida por DNBS fue 100 mg/kg de extracto.

La curva dosis-respuesta del extracto de *L. virginicum* arrojó un DE50 62.5 mg/kg.

El tratamiento I.P con el extracto de *L. virginicum* tuvo un efecto atenuante sobre los síntomas de la colitis inducida por DNBS, incluyendo la pérdida de peso corporal, acortamiento del colon, diarrea, sangrado y daño macroscópico visible del colon.

Se demostró que el extracto de *L. virginicum* disminuyó el infiltrado de células inmunes en la lámina propia y submucosa, la actividad de MPO y la expresión de citocinas proinflamatorias, como la IL-1 β , demostrando que el extracto de *L. virginicum* tiene propiedades antiinflamatorias.

Por lo tanto, puede ser razonable suponer que el extracto de *L. virginicum* atenuó los síntomas de la colitis inducida por DNBS debido a que posee compuestos bioactivos con propiedades antiinflamatorias.

Nuestros resultados sugieren una actividad terapéutica potencial para el extracto de *L. virginicum* como planta medicinal antiinflamatoria para la CU. Esto refuerza el uso de esta planta como remedio para las condiciones inflamatorias intestinales y la terapia de prevención de la recurrencia, en la medicina tradicional. Se recomiendan más estudios para establecer los mecanismos involucrados y los componentes activos que son realmente responsables de sus acciones farmacológicas beneficiosas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Inmunología celular y molecular* (9° ed.). Barcelona, España: Elsevier.
- Abe, H., Ishioka, M., Fujita, Y., Umeno, A., Yasunaga, M., Sato, A., Ohnishi, S., Suzuki, S., Ishida, N., Shichiri, M., Yoshida, Y., & Nakajima, Y. (2018). Yuzu (Citrus junos Tanaka) Peel Attenuates Dextran Sulfate Sodium-induced Murine Experimental Colitis. *Journal of oleo science*, 67(3), 335–344. <https://doi.org/10.5650/jos.ess17184>
- Abraham C, Cho JH. (2006). Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. *Inflamm Bowel Dis* 12: 641-650 [PMID: 16804402 DOI: 10.1097/01.MIB.0000225332.83861.5f]
- Abreu MT, Fukata M, Arditi M. (2005). TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol*; 174: 4453-4460 [PMID: 15814663]
- Aguilar, C. A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacques P., & López, M. E. (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social Etnobotánica. México: Instituto Mexicano del Seguro Social, 70-71.
- Ali T, Shakir F, Morton J. (2012) Curcumin and inflammatory bowel disease: Biological mechanisms and clinical implication. *Digestion*.85(4):249-255.
- Almero, J. M. (2007). Modelos experimentales in vivo de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal. Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad. *Nutrición Hospitalaria*, 22(2), 178-189.
- Ananthakrishnan AN, McGinley EL, Binion DG, Saeian K. (2011). Ambient air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: an ecologic analysis. *Inflamm Bowel Dis* 17: 1138-1145 [PMID: 20806342 DOI: 10.1002/ibd.21455]
- Ancha, H. R., Kurella, R. R., McKimmey, C. C., Lightfoot, S., & Harty, R. F. (2008). Luminal Antioxidants Enhance the Effects of Mesalamine in the Treatment of Chemically Induced Colitis in Rats. *Experimental Biology and Medicine*, 233(10), 1301–1308. doi:10.3181/0805-rm-140
- Anderson, C. A., Boucher, G., Lees, C. W., Franke, A., D'Amato, M., Taylor, K. D., Lee, J. C., Goyette, P., Imielinski, M., Latiano, A., Lagacé, C., Scott, R., Amininejad, L., Bumpstead, S., Baidoo, L., Baldassano, R. N., Barclay, M., Bayless, T. M., Brand, S., Büning, C., ... Rioux, J. D. (2011). Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nature genetics*, 43(3), 246–252. <https://doi.org/10.1038/ng.764>
- Andoh A, Imaeda H, Aomatsu T, Inatomi O, Bamba S, Sasaki M, Saito Y, Tsujikawa T, Fujiyama Y. (2011). Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *J Gastroenterol* 46: 479-486 [PMID: 21253779 DOI: 10.1007/s00535-010-0368-4].

- Appleyard, C. B., Hernández, G., & Rios-Bedoya, C. F. (2004). Basic epidemiology of inflammatory bowel disease in Puerto Rico. *Inflamm Bowel Dis*, 10(2), 106-111. doi:10.1097/00054725-200403000-00007
- Argüta, V. A., Cano, A. L., & Rodarte, M. E. (1994). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. México: Instituto Nacional Indigenista.
- Askari, A. (2016). Anatomy and Physiology of the Large Bowel (Colon) and Pelvic Floor. *Bowel Dysfunction*, 7-20. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-43214-4_2
- Ávalos, & Pérez-Urria. (2009). *Metabolismo secundario de las plantas*. Madrid: Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- Barrueco, N., Martínez Fernández-Llamazares, C., Durán, E., Martínez Marín, M. T., & Relaño García, C. (2008). Administración de medicamentos por vía oral. *Interacciones medicamento - alimento*. *Index de Enfermería*, 17(1), 53-57.
- Bell, C. J., Gall, D. G., & Wallace, J. L. (1995). Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol*, 268(4), G622-G630.
- Ben-Horin, S., Kopylov, U., & Chowers, Y. (2014). Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity reviews*, 13(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.06.002>
- Berlin, E. A., Berlin, B., Lozoya, X., Breedlove, D. E., Meckes, M., Villarreal, M. L., . . . Laughlin, R. M. (1996). *Medical Ethnobiology of the Highland Maya of Chiapas, Mexico: The Gastrointestinal Diseases*. Princeton University Press.
- Bermejo, F., Aguas, M., Chaparro, M., Domènech, E., Echarri, A., García-Planella, E., Guerra, I., Gisbert, J. P., López-Sanromán, A., & en representación de GETECCU (2018). Recommendations of the Spanish Working Group on Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU) on the use of thiopurines in inflammatory bowel disease. *Recomendaciones del Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (GETECCU) sobre el uso de tiopurinas en la enfermedad inflamatoria intestinal*. *Gastroenterología y hepatología*, 41(3), 205–221. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2017.11.007>
- Bernardo D, Vallejo-Díez S, Mann ER, Al-Hassi HO, Martínez-Abad B, Montalvillo E, Tee CT, Muruganathan AU, Núñez H, Peake ST, Hart AL, Fernández-Salazar L, Garrote JA, Arranz E, (2012). Knight SC. IL-6 promotes immune responses in human ulcerative colitis and induces a skin-homing phenotype in the dendritic cells and Tcells they stimulate. *Eur J Immunol* 42: 1337-1353 [PMID: 22539302 DOI: 10.1002/eji.201142327]
- Bitton, A., Dobkin, P. L., Edwardes, M. D., Sewitch M. J., Meddings, J. B., Rawal, S., Cohen A., Vermeire, S., Dufresne, L., Franchimont, D., Wild, G. E. (2008). Predicting relapse in Crohn's disease: a biopsychosocial model. *Gut* 57: 1386-1392 [PMID: 18390994 DOI: 10.1136/gut.2007.134817]

- Bonen, D. K., Ogura, Y, Nicolae, D. L., Inohara N, Saab L, Tanabe T, Chen FF, Foster SJ, Duerr RH, Brant SR, Cho JH, Nuñez G. (2003). Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 124: 140-146 [PMID: 12512038 DOI:10.1053/gast.2003.50019]
- Borges, F. R., Silva, M. D., Córdova, M. M., Schambach, T. R., Pizzolatti, M. G., & Santos, A. R. (2014). Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid α -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 144-150. doi: 10.1016/j.jep.2013.10.009.
- Bossone C, Hosseini JM et al (2001) Alterations in spontaneous contractions in vitro after repeated inflammation of rat distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G949–G957
- Bosques-Padilla, F. J., Sandoval-García, E. R., Martínez-Vázquez, M. A., Garza-González, E., & Maldonado-Garza, H. J. (2011). Epidemiología y características clínicas de la colitis ulcerosa crónica idiopática en el noreste de México. *Revista de gastroenterología de México*, 76(1), 34-38.
- Boyer, L., Ghoreishi, M., Templeman, V., Vallance, B. A., Buchan, A. M., Jevon, G., & Jacobson, K. (2005). Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. *Auton. Neurosci.*, 117, 41-53.
- Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, 78, 206-209.
- Brand S. (2009). Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*, 58(8), 1152–1167. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.163667>
- Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker-Smith JA, Mac-Donald TT. (1993). Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 78: 127-131 [PMID: 8436398]
- Bueno-Hernández, N., Núñez-Aldana, M., Ascaño-Gutierrez, I., & Yamamoto-Furusho, J. K. (2015). Evaluation of diet pattern related to the symptoms of mexican patients with Ulcerative Colitis. *Nutrition*, 25(14).
- Burisch, J., & Munkholm, P. (2013). Inflammatory bowel disease epidemiology. *Curr Opin Gastroenterol*, 29(4), 357–362. doi:10.1097/MOG.0b013e32836229fb
- Calzada, F., Barbosa, E., & Cedillo-Rivera, R. (2003). Antiamoebic Activity of Benzyl glucosinolate from *Lepidium virginicum*. *Phytotherapy Research*, 17, 618-619.
- Cámara RJ, Schoepfer AM, Pittet V, Begré S, von Känel R. (2011). Mood and nonmood components of perceived stress and exacerbation of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 17: 2358-2365 [PMID: 21287671 DOI: 10.1002/ibd.21623]

- Chavez-Álvarez S., Gómez-Flores M., & Ocampo-Candiani J. (2016). Manifestaciones cutáneas en enfermedad inflamatoria intestinal. *Gac Med Mex.* 152:622-30.
- Cohn, H. M., Dave, M., & Loftus, E. V., Jr (2017). Understanding the Cautions and Contraindications of Immunomodulator and Biologic Therapies for Use in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory bowel diseases*, 23(8), 1301–1315. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000001199>
- Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Serraino, I., Lepore, V., Terranova, M. L., Ciccolo, A., & Caputi, A. P. (2001). Melatonin reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J. Pineal Res.*, 30, 1-12.
- da Silva, B. C., Lyra, A. C., Rocha, R., & Santana, G. O. (2014). Epidemiology, demographic characteristics and prognostic predictors of ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology*, 20(28), 9458–9467. doi:10.3748/wjg.v20.i28.9458
- De Lange T., Larsen S., & Aabakken L. (2004). Inter-observer agreement in the assessment of endoscopic findings in ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol* 4:9 (1-10)
- Decker, E. A. (1997). Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutritional Reviews*, 55(1), 396-398.
- Delgado, O., Puigventós, F., & Serra, J. (1997). Administración de medicamentos por vía oral. *Medicina clínica* (108), 426-435.
- Di Sabatino A, Biancheri P, Rovedatti L, MacDonald TT, Corazza GR. (2012). New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 18: 368-371 [PMID:21538717 DOI: 10.1002/ibd.21735]
- Dignass, A., Eliakim, R., Magro, F., Maaser, C., Chowers, Y., Geboes, K., Mantzaris, G., Reinisch, W., Colombel, J. F., Vermeire, S., Travis, S., Lindsay, J. O., & Van Assche, G. (2012). Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's & colitis*, 6(10), 965–990. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2012.09.003>
- Docherty, M. J., Jones, R. C., & Wallace, M. S. (2011). Managing pain in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatology*, 7(9), 592-60.
- Dothel, G., Vasina, V., Barbara, G., & Ponti, F. D. (2013). Animal models of chemically induced intestinal inflammation: predictivity and ethical issues. *Pharmacol Ther*, 139(1), 71-86.
- Dyck, P., & Thomas, P. (2005). Autonomic and somatic systems to the anorectum and pelvic floor. En P. Dyck, & P. Thomas, *Peripheral neuropathy* (4° ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Eaden JA., Abrams KR., Mayberry JF. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: A meta-analysis. *Gut* 48:526-35
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308: 1635-1638 [PMID: 15831718 DOI: 10.1126/science.1110591]

- Ellis, H., & Mahadevan, V. (2011). The abdomen and pelvis. En H. Ellis, & V. Mahadevan, *Clinical anatomy: applied anatomy for students and junior doctors* (12° ed., págs. 124-135). Massachusetts: Wiley-Blackwell.
- Fan, J., & de Lannoy, I. A. (2014). Pharmacokinetics. *Biochemical pharmacology*, 87(1), 93–120. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.09.007>
- Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner- Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. (2004). Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 113: 1490-1497 [PMID:15146247 DOI: 10.1172/JCI19836]
- Gallego-Barrero, M., & al., E. (2012). Protocolo de acogida de enfermería al paciente en el momento del diagnóstico de una enfermedad inflamatoria intestinal. *Enfermedad infamatoria intestinal al día*, 11(1), 73-81.
- Ghia, J. E., Blennerhassett, P., Deng, Y., Verdu, E. F., Khan, W. I., & Collins, S. M. (2009). Reactivation of inflammatory bowel disease in a mouse model of depression. *Gastroenterology*, 136, 2280-2288.
- Gomollón-García, F., & García-López, S. (2006). Evidencia científica en Colitis Ulcerosa. *Manual de Actuación*. Ministerio de salud y consumo.
- Gupta, I., Parihar, A., Malhotra, P., Singh, G. B., Lüdtke, R., Safayhi, H., & Ammon, H. P. (1997). Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with ulcerative colitis. *European journal of medical research*, 2(1), 37–43.
- Gupta, I., Parihar, A., Malhotra, P., Gupta, S., Lüdtke, R., Safayhi, H., & Ammon, H. P. (2001). Effects of gum resin of *Boswellia serrata* in patients with chronic colitis. *Planta medica*, 67(5), 391–395. <https://doi.org/10.1055/s-2001-15802>
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). Principios generales de la función gastrointestinal: motilidad, control nervioso y circulación sanguínea. En A. C. Guyton, J. E. Hall, & B. B. Serra (Ed.), *Tratado de fisiología médica* (12° ed., págs. 753-762). Barcelona, España: Elsevier.
- Hanai, H., Iida, T., Takeuchi, K., Watanabe, F., Maruyama, Y., Andoh, A., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y., Mitsuyama, K., Sata, M., Yamada, M., Iwaoka, Y., Kanke, K., Hiraishi, H., Hirayama, K., Arai, H., Yoshii, S., Uchijima, M., Nagata, T., & Koide, Y. (2006). Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 4(12), 1502–1506. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.08.008>
- Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129: 550-564 [PMID: 16083712 DOI: 10.1016/ j. gastro.2005.05.002]

- Hernández-Rocha C., Ibáñez P., Molina M. E., Klaassen J., Valenzuela A., Candia R., Bellolio F., Zuñiga A., Miguieles R., Miquel J.F., Chianale J. Álvarez-Lobos M. (2017). Diagnóstico y manejo de colitis ulcerosa grave. Una mirada actualizada. *Rev. Med. Chile* 145:96-105.
- Higashiyama, M., Hokari, R., Kurihara, C., Ueda, T., Watanabe, C., Tomita, K., . . . Miura, S. (2012). Indomethacin-induced small intestinal injury is ameliorated by cilostazol, a specific PDE-3 inhibitor. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 47(8-9), 993-1002. doi:10.3109/00365521.2012.690043
- Hoie, O., Wolters, F. L., Riis, L., Bernklev, T., Aamodt, G., Clofent, J., . . . Moum, B. (2007). Low colectomy rates in ulcerative colitis in an unselected European cohort followed for 10 years. *Gastroenterology*, 132(2), 507-515. doi: 10.1053/j.gastro.2006.11.015
- Holt PR, Katz S, Kirshoff R. Curcumin therapy in inflammatory bowel disease: A pilot study. *Dig Dis Sci*. 2005;50(11):2191-2193.
- Hyam SR, Jang SE et al (2013) Echinocystic acid, a metabolite of lincemaside A, inhibits TNBS-induced colitis in mice. *Int Immunopharmacol* 15:433–441.
- Ibeakanma, Charles, and Stephen Vanner. (2010). TNFalpha Is a Key Mediator of the Pronociceptive Effects of Mucosal Supernatant from Human Ulcerative Colitis on Colonic DRG Neurons. *Gut* 59 (5):612–21. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.190439>.
- Jian, F., & Dusting, G. J. (2003). Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects. *Curret Vascular Pharmacology*, 1(22), 135-156.
- Jin, L., Batra, S., Douda, D. N., Palaniyar, N., & Jeyaseelan, S. (2014). CXCL1 Contributes to Host Defense in Polymicrobial Sepsis via Modulating T Cell and Neutrophil Functions. *The Journal of Immunology*, 193(7), 3549-3558.
- Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P, Vermeire S. (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 60: 631-637 [PMID: 21209126 DOI: 10.1136/gut.2010.223263]
- Kadivar K, Ruchelli ED, Markowitz JE, Defelice ML, Strogatz ML, Kanzaria MM, Reddy KP, Baldassano RN, von Allmen D, Brown KA. Intestinal interleukin-13 in pediatric inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 10: 593-598 [PMID: 15472520]
- Kaplan GG, Hubbard J, Korzenik J, Sands BE, Panaccione R, Ghosh S, Wheeler AJ, Villeneuve PJ. (2004). The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 2412-2419 [PMID: 20588264 DOI: 10.1038/ajg.2010.252]
- Kawada, M., Arihiro, A., & Mizoguchi, E. (2007). Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 13, 5581-5593.

- Kim, J. J., Shajib, M. S., Manocha, M. M., & Khan, W. I. (2012). Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD. *J. Vis. Exp.* (60). doi:10.3791/3678
- Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T. (2008). IL23 differentially regulates theTh1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 57: 1682-1689 [PMID: 18653729 DOI: 10.1136/gut.2007.135053]
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*; 27: 485-517 [PMID: 19132915 DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710]
- Kuklinski, C. (2003). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona, España: Omega S.A.
- Kyung, M., & Young, M. (2013). Nutritional modulators of ulcerative colitis. Clinical efficacies and mechanistic view. *World J Gastroenterology*, 19, 994–1004. doi: 10.3748/wjg.v19.i7.994.
- Lakatos, P. L. (2006). Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World journal of gastroenterology*, 12(38), 6102-6108.
- Langhorst J, Wulfert H, Lauche R, Klose P, Cramer H, Dobos GJ, et al. Systematic review of complementary and alternative medicine treatments in inflammatory bowel diseases. *J CrohnsColitis*. 2015;9(1):86-106.
- Lee, S. H., Kwon, J. e., & Cho, M. L. (2018). Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intestinal Research*, 16(1), 26-42. doi:10.5217/ir.2018.16.1.26
- Leslie, W. D., Miller, N., Rogala, L., & Bernstein, C. N. (2008). Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study. *The American journal of gastroenterology*, 103(6), 1451–1459. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01753.x>
- Li, J., Chen, C., Cao, X., Wang, G., Hu, J., & Wang, J. (2014). Efficacy of topical versus oral 5-aminosalicylate for treatment of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 34(1), 59-65. doi:10.1007/s11596-014-1232-1
- Loftus Jr, E. V. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126(6), 1504-1517. doi.org/10.1053/j.gastro.2004.01.063
- López-Posadas, R., Requena, P., González, R., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Sánchez de Medina, F., & Martínez-Augustin, O. (2010). Bovine glycomacropeptide has intestinal antiinflammatory effects in rats with Dextran Sulfate-induced colitis. *The Journal of Nutrition*, 140(11), 2014-2019. doi:10.3945/jn.109.118448.
- Lukas, M., Bortlik, M., & Maratka, Z. (2006). What is the origin of ulcerative colitis? Still more questions than answers. *Postgrad Med J*, 82, 620-625. doi:10.1136/pmj.2006.047035.

- Manceñido-Marcos N, (2015). Medicina alternativa y complementaria en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal* al día 14 (2): 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.eii.2015.06.006>
- Marks DJ, Harbord MW, MacAllister R, Rahman FZ, Young J, Al-Lazikani B, Lees W, Novelli M, Bloom S, Segal AW. (2006). Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet* 367: 668-678 [PMID: 16503465 DOI:10.1016/S0140-6736(06)68265-2]
- Martín, R., Chain, F., Miquel, S., Motta, J. P., Vergnolle, N., Sokol, H., & Langella, P. (2017). Using murine colitis models to analyze probiotics–host interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(1), S49–S70. doi:10.1093/femsre/fux035
- Martín, R., Chain, F., Miquel, S., Lu, J., Gratadoux, J. J., Sokol, H., & Langella, P. (2014). The commensal bacterium *faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(3), 417-430.
- Martinez C, Antolin M, Santos J, Torrejon A, Casellas F, Borrueal N, Guarner F, Malagelada JR. Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 643-648 [PMID: 18341488 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007. 01592.x]
- Martínez-Castro, J. R. (2016). Análisis fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante de extractos de hoja, tallo y raíz de la especie *Lepidium virginicum* L. en sistema in vitro e in situ. Tesis Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache.
- Maunder RG. (2005) Evidence that stress contributes to inflammatory bowel disease: evaluation, synthesis, and future directions. *Inflamm Bowel Dis* 11: 600-608 [PMID: 15905709]
- Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 2005; 54: 1481-1491 [PMID: 16162953 DOI: 10.1136/gut.2005.064261]
- Mawdsley JE, Rampton DS. (2006). The role of psychological stress in inflammatory bowel disease. *Neuroimmunomodulation* 13: 327-336 [PMID: 17709955 DOI: 10.1159/000104861]
- McAlindon, M., Hawkey, C., & Mahida, Y. (1998). Expression of interleukin 1 β and interleukin 1 β converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. *Gut*, 42(2), 214-219. doi:10.1136/gut.42.2.214
- Medzhitov R, Janeway C. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med* 343: 338-344 [PMID: 10922424 DOI: 10.1056/NEJM200008033430506]
- Melgar, S., Karlsson, A., & Michaëlsson, E. (2005). Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(6), G1328–G1338. doi:10.1152/ajpgi.00467.2004.

- Minaiyan, M., Ghannadi, A. R., Afsharipour, M., & Mahzouni, P. (2011). Effects of extract and essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. on TNBS-induced colitis in rats. *Research in pharmaceutical sciences*, 6(1), 13–21.
- Modi, W. S., & Yoshimura, T. (1999). Isolation of novel GRO genes and a phylogenetic analysis of the CXC chemokine subfamily in mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 16(2), 180-193. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026101
- Momin, A., & McNaughton, P. A. (2009). Regulation of firing frequency in nociceptive neurons by pro-inflammatory mediators. *Experimental Brain Research*, 196(1), 45-52.
- Monteleone G, Monteleone I, Fina D, Vavassori P, Del Vecchio Blanco G, Caruso R, Tersigni R, Alessandrini L, Biancone L, Naccari GC, MacDonald TT, Pallone F. (2005). Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferongamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 128: 687-694 [PMID: 15765404]
- Morampudi, V., Bhinder, G., Wu, X., Dai, C., Sham, H. P., Vallance, B. A., & Jacobson, K. (2014). DNBS/TNBS Colitis Models: Providing Insights Into Inflammatory Bowel Disease and Effects of Dietary Fat. *Journal of Visualized Experiments* (84), 1-8.
- Moreau, R. A., Whitaker, B. D., & Hicks, K. B. (2002). Phytosterols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Review. Progress in Lipid Research*(41), 457-500.
- Morris, G., Beck, P., Herridge, M., Depew, W., Szewczuck, M., & Wallace, J. (1989). Hapten induced model of inflammation and ulceration in rat colon. *Gastroenterology*, 96, 795–803.
- Mostafa, A. F., Elalfy , M. M., Shata, A., & Elhadidy, M. G. (2020). Prophylactic effect of aquatic extract of stevia on acetic acid induced-ulcerative colitis in male rats: a possible role of Nrf2 and PPAR γ . *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. doi:10.1515/jbcpp-2020-0039
- Nidhi, G., Ajay, R., Abhilasha, A., Krishna-Reddy, V. B., & Puneet, K. (2014). Animal models of inflammatory bowel disease: a review. *Inflammopharmacology*, 22, 219-233. doi:10.1007/s10787-014-0207-y
- Ochsenkühn, T., & D'Haens, G. (2011). Current misunderstandings in the management of ulcerative colitis. *Gut.*, 60(9), 1294-1299. doi:10.1136/gut.2010.218180
- OECD. (2002). Test No. 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method., (págs. 1-14). Obtenido de http://www.oecd-library.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en
- OMS. (s.f.). Organización Mundial de la Salud. Obtenido de *Medicina tradicional: definiciones*: https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
- Osawa, Y., Banno, Y., Nagaki, M., Brenner, D. A., Naiki, T., & Nozawa, Y. (2001). TNF- α -induced sphingosine 1-phosphate inhibits apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human hepatocytes. *Journal of Immunology*, 167, 173-180.

- Pereira, S. R., Pereira, R., Figueiredo, I., Freitas, V., Dinis, T. C., & Almeida, L. M. (2017). Comparison of anti-inflammatory activities of an anthocyanin-rich fraction from Portuguese blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) and 5-aminosalicylic acid in a TNBS-induced colitis rat model. *PLoS ONE*, 12(3). doi:https://doi.org/10.1371/journal.
- Pozzoli, C., Menozzi, A., Grandi, D., Solenghi, E., Ossiprandi, M. C., Zullian, C., . . . Coruzzi, G. (2006). Protective effects of proton pump inhibitors against indomethacin-induced lesions in the rat small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 374(4), 283-291. doi:10.1007/s00210-006-0121-y.
- Pulli B, Ali M, Forghani R et al (2013) Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. *PLoS One* 8:e67976
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, LiY, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59-65 [PMID: 20203603 DOI: 10.1038/nature08821].
- Raftery, A. (2005). Alimentary system. En A. Raftery, *Applied basic science for basic surgical training* (1° ed., págs. 477-534). Philadelphia: Elsevier.
- Reber, S. O. (2012). Stress and animal models of inflammatory bowel disease—An update on the role of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*, 37, 1-19.
- Reimund, J. M., Wittersheim, C., Dumont, S., Muller, C. D., Baumann, R., & Poindron, P. (1996). Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Journal Clinical Immunology*, 16, 144-150.
- Robbins, R. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem*, 51, 2866-2887.
- Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, Corazza GR, Monteleone G, Di Sabatino A, Macdonald TT. (2009). Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut*; 58: 1629-1636 [PMID: 19740775 DOI: 10.1136/gut.2009.182170]
- Saladin, K. S. (2013). *Anatomía y Fisiología* (6° ed.). México: McGraw-Hill Education.
- Salim SY, Söderholm JD. (2011). Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 17: 362-381 [PMID: 20725949 DOI: 10.1002/ibd.21403]

- Salim, S. Y., & Söderholm, J. D. (2011). Importance of Disrupted Intestinal Barrier in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 17(1), 362–381.
- Sandborn WJ, Targan SR, Byers VS, Ruddy DA, Mu H, Zhang X, et al. Andrographis paniculata extract (HMPL-004) for active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(1):90-98.
- Sarra M, Monteleone I, Stolfi C, Fantini MC, Sileri P, Sica G, Tersigni R, Macdonald TT, Pallone F, Monteleone G. (2010). Interferon-gamma-expressing cells are a major source of interleukin-21 in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 16: 1332-1339 [PMID: 20186935 DOI: 10.1002/ibd.21238].
- Sawant, K. V., Poluri, K. M., Dutta, A. K., Sepuru, K. M., Troshkina, A., Garofalo, R. P., & Rajarathnam, K. (2016). Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep33123
- Saunders, P. R., Miceli, P., Vallance, B. A., Wang, L., Pinto, S., Tougas, G., Jacobson, K. (2006). Noradrenergic and cholinergic neural pathways mediate stress-induced reactivation of colitis in the rat. *Auton. Neurosci. Basic Clin.*, 124, 56-68. doi.org/10.1016/j.autneu.2005.12.002.
- Schmitz H, Fromm M et al (1999) Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 112(Pt 1):137–146
- Shaw, S. Y., Blanchard, J. F., & Bernstein, C. N. (2010). Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology*, 105(12), 2687–2692. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.398>
- Sholter, D. E., & Armstrong, P. W. (2000). Adverse effects of corticosteroids on the cardiovascular system. *The Canadian journal of cardiology*, 16(4), 505–511.
- Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2144-2155.
- Silva, F., Gatica, T., & Pavez, C. (2019). Etiología y fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 30(4), 262-272.
- Smith, P. D., Ochsenbauer-Jambor, C., & Smythies, L. E. (2005). Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunological Reviews*, 206(1), 149-159. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00288.x
- Solberg, I. C., Lygren, I., Jahnsen, J., Aadland, E., Høie, O., Cvancarova, M., IBSEN Study Group. (2009). Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). *Scand J Gastroenterol*, 44(4), 431-440.
- Stan, M. S., Voicu, S. N., Caruntu, S., Nica, I. C., Olah, N. K., Burtescu, R., . . . Dinischiotu, A. (2019). Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of a Thuja occidentalis

Mother Tincture for the Treatment of Ulcerative Colitis. *Antioxidants* (Basel), 8(9), 416. doi:10.3390/antiox8090416

- Sugihara T, Kobori A, Imaeda H, Tsujikawa T, Amagase K, Takeuchi K, Fujiyama Y, Andoh A. (2010). The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 160: 386-393 [PMID: 20089077 DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04093.x]
- Tan WC, Qiu D, Liam BL, Ng TP, Lee SH, van Eeden SF, D'Yachkova Y, Hogg JC. (2000). The human bone marrow response to acute air pollution caused by forest fires. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1213-1217 [PMID: 10764314 DOI:10.1164/ajrccm.161.4.9904084].
- Tang T, Targan SR, Li ZS, Xu C, Byers VS, Sandborn WJ. Randomised clinical trial: Herbal extract HMPL-004 inactive ulcerative colitis - a double-blind comparison with sustained release mesalazine. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33(2):194-202.
- Tatiya-aphiradee, N. C. (2018). Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology.* doi:10.1515/jbcpp-2018-0036
- Thia KT, Loftus EV, Sandborn WJ, Yang SK. (2008). An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am J Gastroenterol* 103: 3167-3182 [PMID: 19086963 DOI:10.1111/j.1572-0241.2008.02158.x]
- Torrejón-Herrera, A., & Borruel-Sainz, N. (2008). Todo lo que necesitas saber de colitis ulcerosa. GETTEII. Obtenido de <http://www.ua-cc.org/phocadownloadpap/colitis-ulcerosa.pdf>
- Torres, M. I., & Rios, A. (2008). Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World J. Gastroenterology*, 129, 1972-1980.
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2011). *Principios de Anatomía y Fisiología* (11° ed.). Valencia: Medica Panamericana.
- Tran, C. D., Katsikeros, R., & Abimosleh, S. M. (2012). Current and novel treatments for ulcerative colitis. En *Ulcerative Colitis from Genetics to Complications*. Shennak M.
- Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L., & Colombel, J. F. (2017). Ulcerative colitis. *The Lancet*, 389, 1756-1770. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32126-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32126-2)
- Vainer B, Nielsen OH, Hendel J, Horn T, Kirman I. (2000). Colonic expression and synthesis of interleukin 13 and interleukin 15 in inflammatory bowel disease. *Cytokine* 12: 1531-1536 [PMID: 11023669 DOI: 10.1006/cyto.2000.0744]
- Valdivia-Silva, J. E., López-Molina, G. K., & González-Altamirano, J. C. (2007). Angiogénesis pulmonar mediada por adenosina vía CXCL1/CXCR2. *An Fac Med Lima*, 68(3), 211-221.

- Van Assche, G., Vermeire, S., & Rutgeerts, P. (2009). Immunosuppression in inflammatory bowel disease: Traditional, biological or both? *Opin. Gastroenterology*, 25, 323-328.
- Van de Meeberg, M. M., Schultheiss, J., Oldenburg, B., Fidder, H. H., & Huitema, A. (2020). Does the 5-Aminosalicylate Concentration Correlate with the Efficacy of Oral 5-Aminosalicylate and Predict Response in Patients with Inflammatory Bowel Disease? A Systematic Review. *Digestion*, 101(3), 245–261. <https://doi.org/10.1159/000499331>.
- Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB, Einerhand AW. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131: 117-129 [PMID: 16831596 DOI: 10.1053/j.gastro.2006.04.020]
- Van der Valk, M. E., Mangen, M. J., Leenders, M., Dijkstra, G., van Bodegraven, A. A., Fidder, H. H., de Jong, D. J., Pierik, M., van der Woude, C. J., Romberg-Camps, M. J., Clemens, C. H., Jansen, J. M., Mahmmud, N., van de Meeberg, P. C., van der Meulen-de Jong, A. E., Ponsioen, C. Y., Bolwerk, C. J., Vermeijden, J. R., Siersema, P. D., van Oijen, M. G., ... COIN study group and the Dutch Initiative on Crohn and Colitis (2014). Healthcare costs of inflammatory bowel disease have shifted from hospitalisation and surgery towards anti-TNF α therapy: results from the COIN study. *Gut*, 63(1), 72–79. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303376>
- Van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, Qui D, Vincent R, Hogg JC. (2001). Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM (10)). *Am J Respir Crit Care Med* 164: 826-830 [PMID: 11549540 DOI: 10.1164/ajrccm.164.5.2010160]
- Vavricka, S. R., Schoepfer, A., Scharl, M., Lakatos, P. L., Navarini, A., & Rogler, G. (2015). Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory bowel diseases*, 21(8), 1982–1992. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000392>
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4113-4117.
- Venkata Sairam, K., Gurupadayya, B. M., Chandan, R. S., Nagesha, D. K., & Vishwanathan, B. (2016). A review on chemical profile of coumarins and their therapeutic role in the treatment cancer. *Current Drug Delivery*, 13(2), 186-201. [doi:doi.org/10.2174/1567201812666150702102800](https://doi.org/10.2174/1567201812666150702102800)
- Vergara-Fernández O., Takahashi-Monroy T., González-Contreras Q. H. (2006). Conceptos actuales en colitis ulcerativa crónica inespecífica. *Cirujano General* 28 (1): 42-49)
- Villaseñor, R., & Espinosa, G. (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F: Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica.

- Vinson, J. A., Yousef, A., Dabbag-Mamdouh, M., Jang, S., & Jang, J. (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem*, 43(11), 2800-2802.
- Wallace, J. L. (2001). Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. *The American Journal of Medicine*, 110(1), S19-S23.
- Wan P, Chen H, Guo Y, Bai A-P. (2014). Advances in treatment of ulcerative colitis with herbs: From bench to bedside. *World J Gastroenterol*. 2014;20(39):14099---104.
- Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. (2004). NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 5: 800-808 [PMID:15220916 DOI: 10.1038/ni1092]
- Wawrzyniak M. & Scharl M. (2018) Genetics and epigenetics of inflammatory bowel disease. *Swiss Med Wkly* 148: w14671. DOI: <https://doi.org/10.4414/smw.2018.14671>
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schroeder JM, Stange EF. (2003). Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 9: 215-223 [PMID: 12902844]
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. (2004) NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal Alpha defensin expression. *Gut* 53:1658-1664 [PMID: 15479689 DOI:10.1136/gut.2003.032805].
- Wera O, Lancellotti P, Oury C (2016) The dual role of neutrophils in inflammatory bowel diseases. *J Clin Med* 5(12):118. <https://doi.org/10.3390/jcm5120118>
- Wilgus, T. A., Roy, S., & McDaniel, J. C. (2013). Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Advances in Wound Care*, 2(7), 379–388. doi:10.1089/wound.2012.0383
- Wilson MS, Ramalingam TR, Rivollier A, Shenderov K, Mentink-Kane MM, Madala SK, Cheever AW, Artis D, Kelsall BL, Wynn TA. (2011). Colitis and intestinal inflammation in IL10^{-/-} mice results from IL-13R α 2-mediated attenuation of IL-13 activity. *Gastroenterology* 140: 254-264 [PMID:20951137 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.09.047]
- Yamamoto-Furusho J.K., Gutiérrez-Grobe Y., López-Gómez J-G., Bosques-Padilla F., Rocha-Ramírez J.L., (2018). Consenso mexicano para el diagnóstico y tratamiento de la colitis ulcerosa crónica idiopática. *Revista de Gastroenterología de México*. 83(2): 144-167
- Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcón G, et al. (2004). Polymorphisms in the promoter region of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and the HLA-DRB1 locus in Mexican Mestizo patients with ulcerative colitis. *Immunol Lett*. 95:315.

- Yamamoto-Furusho, J. K. (2009). Clinical Epidemiology of Ulcerative Colitis in Mexico A single Hospital-based Study in a 20-year Period (1987- 2006). *Clinical Gastroenterology*, 43, 221-224.
- Yan, Y., Kolachala, V., Dalmasso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S. V., & Merlin, D. (2009). Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS one*, 4(6), e6073.
- Yen, G. C., Duh, P. D., & Tsai, C. L. (1993). Relationship between antioxidant activity and maturity in peanuts hulls. *Agric. Food Chem.*, 41, 67-70.
- Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8: 967-974 [PMID: 17581537 DOI: 10.1038/ni1488]

