



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**

---

**DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**ESPECIALIZACIÓN EN ACUPUNTURA Y FITOTERAPIA**

**EFFECTO PREVENTIVO DEL  
ARÁNDANO ROJO (*Vaccinium macrocarpon*)  
EN UN MODELO MURINO DE COLITIS ULCERATIVA**

**IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS**

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:  
ESPECIALISTA EN ACUPUNTURA Y FITOTERAPIA**

**PRESENTA:**

**Med. Cir. ARMANDO JAVIER LARA TORRES**

**Director:**

**Dr. GERARDO BLANCAS FLORES**

**Asesor:**

**Dr. JULIO CESAR ALMANZA PÉREZ**

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE 2016

**Sinodales:**

**PRESIDENTE:**

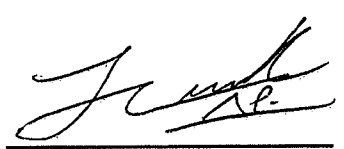
**Dr. RUBÉN ROMÁN RAMOS** .....



Profesor Titular C de Tiempo Completo  
Departamento de Ciencias de la Salud.  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

**SECRETARIO:**

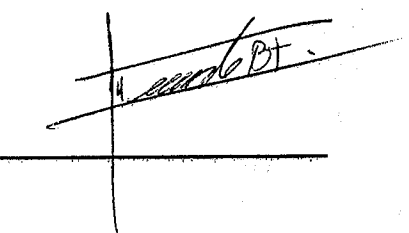
**Dr. JULIO CESAR ALMANZA PÉREZ** .....



Profesor Titular C de Tiempo Completo  
Departamento de Ciencias de la Salud.  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

**VOCAL:**

**Dr. GERARDO BLANCAS FLORES**.....



Profesor Asociado D de Tiempo Completo  
Departamento de Ciencias de la Salud.  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **DIRECTOR:**

**Dr. GERARDO BLANCAS FLORES**

Profesor Asociado D de Tiempo Completo

Departamento de Ciencias de la Salud.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

### **ASESOR:**

**Dr. JULIO CESAR ALMANZA PÉREZ**

Profesor Titular C de Tiempo Completo

Departamento de Ciencias de la Salud.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

**La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud y bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.**

**EL JURADO DESIGNADO POR LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA APROBÓ LA IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS TITULADA “EFECTO PREVENTIVO DEL ARÁNDANO ROJO (*Vaccinium macrocarpon*) EN UN MODELO MURINO DE COLITIS ULCERATIVA”. CON FECHA 06 DICIEMBRE DE 2016.**

**PRESENTÓ:**

**Med. Cir. ARMANDO JAVIER LARA TORRES**

**Sinodales:**

**PRESIDENTE:**

**Dr. RUBÉN ROMÁN RAMOS** ..... \_\_\_\_\_

Profesor Titular C de Tiempo Completo

Departamento de Ciencias de la Salud.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

**SECRETARIO:**

**Dr. JULIO CESAR ALMANZA PÉREZ** ..... \_\_\_\_\_

Profesor Titular C de Tiempo Completo

Departamento de Ciencias de la Salud.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

**VOCAL:**

**Dr. GERARDO BLANCAS FLORES**..... \_\_\_\_\_

Profesor Asociado D de Tiempo Completo

Departamento de Ciencias de la Salud.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

A mi esposa

**Verónica Isis**

A mis hijas

**Elizabeth Cristina**

**Ana Karina**

## **AGRADECIMIENTOS:**

Mi gratitud, principalmente está dirigida a Dios por permitirme llegar al inicio de una profesión.

A mi esposa Verónica Isis y a mis hijas Elizabeth Cristina y Ana Karina por todo el apoyo, comprensión, aliento, ánimo y todo el esfuerzo que hicieron para que alcanzara el éxito, fervientemente creo que no hay amor más grande que estar incondicionalmente con alguien y así están ustedes.

A mis padres José Eusebio y María del Socorro, a mis suegros Cruz Jaime y Ma. Dolores por el aliento y respaldo que me han brindado.

Son muchas las personas especiales a las que agradezco su apoyo, ánimo, amistad y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en el corazón.

A mis amigos que me dedicaron su ayuda, su atención y lo más importante su amistad, sin importar en donde estén o si alguna vez llegan a leer esta dedicatoria les doy las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me manifestaron y por todas sus bendiciones...



A esta institución por permitir mi formación como profesional.

Un agradecimiento muy especial a los Doctores Gerardo Blancas Flores y Julio Cesar Almanza Pérez, que, como director y asesor de este trabajo, me han orientado, apoyado y corregido mi labor científica, con un interés y una entrega que han sobrepasado, con mucho, todas las expectativas que, como alumno, deposité en su persona.

# ÍNDICE

<b>1. Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Introducción</b> .....	<b>8</b>
3.1 Enfermedad inflamatoria intestinal (EII) .....	8
3.2 Concepto de Colitis Ulcerativa.....	10
3.3 Clasificación.....	10
3.4 Epidemiología de la CU .....	13
3.5 Etiología y patogenia de la CU .....	15
3.6 Clínica .....	19
3.7 Tratamiento.....	24
3.7.1 Tratamiento farmacológico.....	24
3.7.2 Tratamiento quirúrgico .....	26
3.7.3 Tratamiento nutricional .....	26
3.7.4 Tratamiento alternativo o fitoterapéutico.....	29
3.8 Antecedentes.....	30
<b>4. Justificación</b> .....	<b>33</b>
<b>5. Pregunta de investigación</b> .....	<b>35</b>
<b>6. Hipótesis</b> .....	<b>36</b>

<b>7. Objetivos .....</b>	<b>37</b>
7.1 Objetivo General .....	37
7.2 Objetivos Específicos .....	37
<b>8. Materiales y métodos .....</b>	<b>38</b>
8.1 Desarrollo experimental .....	38
8.2 Variables .....	38
8.3 Criterios de Inclusión y Exclusión .....	39
8.4 Extracto acuoso .....	40
8.5 Estandarización .....	40
8.6 Grupos experimentales .....	41
8.7 Obtención de muestras iniciales o basales .....	42
8.8 Tratamiento subagudo de los grupos control, indometacina y arándano .....	42
8.9 Inducción del modelo experimental de colitis ulcerativa .....	43
8.10 Obtención de muestras finales .....	43
8.11 Cuantificación de AST y ALT .....	44
8.12 Determinación de concentración de IL6 y TNF- $\alpha$ mediante técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) .....	44
8.13 Extracción de RNA total. ....	46
8.14 Cuantificación de la expresión de citocinas por RT-PCR .....	47
8.15 Trato ético de los animales de laboratorio .....	49

8.16 Análisis estadístico .....	49
<b>9. Resultados .....</b>	<b>50</b>
<b>10. Discusión .....</b>	<b>56</b>
<b>11. Conclusiones .....</b>	<b>61</b>
<b>12. Perspectivas .....</b>	<b>62</b>
<b>13. Financiamiento y conflicto de intereses .....</b>	<b>63</b>
<b>14. Referencias .....</b>	<b>64</b>
<b>15. Anexo .....</b>	<b>72</b>
15.1 Mecanismo de acción de los flavonoides y de la indometacina. ....	72
15.2 Mecanismo de la colitis ulcerativa inducida por ácido acético .....	75
15.3 Referencias.....	78

# 1. Resumen

La colitis ulcerativa (CU) pertenece a un grupo de enfermedades llamado Enfermedad Inflamatoria Intestinal. No se conoce la causa específica de la CU, sin embargo, se sabe de muchos factores asociados al desarrollo de la misma, tal es el caso de la predisposición genética y las alteraciones inmunológicas ante antígenos alimentarios o bacterianos. La CU es una enfermedad que cursa con inflamación, úlceras en mucosa y submucosa del colon y recto, se caracteriza por dolor abdominal, sangrado rectal o hemorragia de tubo digestivo bajo, moco en heces, y en algunos casos se presenta tenesmo, diarrea, fiebre, anemia, fatiga y pérdida de peso.

En México se ha reportado un incremento en la incidencia y prevalencia, siendo principalmente detectados en las grandes ciudades como son la Ciudad de México y Monterrey, Nuevo León.

Existen muchos tratamientos farmacológicos para la CU, entre los más empleados existe una combinación de medicamentos encaminados a disminuir la inflamación, así como a aminorar los síntomas. Sin embargo, el paciente no siempre sigue el tratamiento y las causas son diversas, entre las que se destaca el costo, los efectos secundarios o las reacciones adversas de los medicamentos existentes, por lo que siempre manifiesta molestias asociadas a la CU, recurriendo frecuentemente a terapéuticas alternativas, como el uso de plantas medicinales.

En este sentido, la Organización Mundial de la Salud elaboró directrices para el empleo de fitoterapia que incluyen protocolos de investigación y elaboración de fitofármacos, promoviendo el rescate de la medicina tradicional utilizada por la población para tratar sus enfermedades, un ejemplo de ello es el uso de arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*), el cual es utilizado por sus efectos antioxidantes y antibacteriales, pero sobretodo es usado como antiinflamatorio.

En este trabajo se evaluó el efecto preventivo y antiinflamatorio del arándano rojo en el desarrollo de la colitis ulcerativa experimental. Para ello se elaboró un extracto acuoso de arándano rojo el cual se administró una dosis de 100 mg/kg/día por vía intragástrica durante 34 días a ratas Wistar sanas, posteriormente se indujo el modelo de colitis ulcerativa administrando solución de ácido acético al 5% intrarectal. Una vez estandarizado el modelo, la dosis de anestesia y las técnicas a emplear, se formaron tres grupos: control, indometacina y arándano. Se tomaron muestras de sangre y biopsias de tejido en las cuales se cuantificaron transaminasas hepáticas (alanina-amino transferasa (ALT), aspartato-amino transferasa (AST)), se realizó un análisis macroscópico de la sección distal del colon y se cuantificaron los niveles de secreción y expresión del RNAm de IL6 y TNF- $\alpha$  respectivamente, como marcadores de inflamación.

En el análisis macroscópico se observa una disminución en la lesión en la mucosa intestinal. Se percibe una reducción en las transaminasas hepáticas con tendencia a la normalidad. Por otro lado, tanto la secreción como la expresión de IL6 y TNF- $\alpha$ , disminuyeron significativamente en las ratas tratadas con el extracto de arándano rojo.

El extracto de arándano rojo puede ser considerado una fuente alimentaria importante, con potencial farmacológico para el tratamiento de la CU.

**Palabras clave:**

Colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria intestinal, inflamación, arándano rojo, citocinas, antiinflamatorio.

## **2. Abstract**

Ulcerative colitis (UC) belongs to a group of diseases called Inflammatory Bowel Disease. The specific cause of UC is not known, however, many factors are known to be associated with the development of UC, such as genetic predisposition and immunological alterations to food or bacterial antigens. UC is a disease that occurs with inflammation, ulcers in the mucosa and submucosa of the colon and rectum, characterized by abdominal pain, rectal bleeding or hemorrhage of the lower digestive tract, mucus in feces, and in some cases tenesmus, diarrhea, fever, anemia, fatigue, and weight loss.

In Mexico, an increase in incidence and prevalence has been reported, mainly detected in big cities such as Mexico City and Monterrey, Nuevo León.

There are many pharmacological treatments for UC, among the most employed there is a combination of drugs aimed at decreasing inflammation as well as reducing symptoms. However, the patient does not always follow the treatment and the causes are diverse, including the cost, side effects or adverse reactions of the existing drugs, which is why he always manifests discomfort associated with CU, often using therapeutic alternatives such as the use of medicinal plants.

In this regard, the World Health Organization developed guidelines for the use of phytotherapy, including protocols for research and development of phytopharmaceuticals, promoting the rescue of traditional medicine used by the



population to treat their diseases, an example of which is the use of cranberry (*Vaccinium macrocarpon*), which is used for its antioxidant and antibacterial effects, but above all it is used as an anti-inflammatory.

In this work the preventive and anti-inflammatory effect of cranberry was evaluated in the development of experimental ulcerative colitis. For this purpose, an aqueous extract of cranberry was prepared and a dose of 100 mg/kg/day was administered intragastrically for 34 days in healthy Wistar rats, after which the ulcerative colitis model was induced by administering 5% intrarectal. Once the model, the dose of anesthesia and the techniques to be used were standardized, three groups were formed: control, indomethacin and cranberry. Blood samples and tissue biopsies were taken in which liver transaminases (alanine-amino transferase (ALT), aspartate-amino transferase (AST)) were quantified, a macroscopic analysis of the distal section of the colon was performed and levels were quantified of secretion and expression of mRNA of IL6 and TNF- $\alpha$  respectively, as markers of inflammation.

In the macroscopic analysis, a decrease in the lesion is observed in the intestinal mucosa. A reduction in hepatic transaminases with a tendency to normality is perceived. On the other hand, both secretion and expression of IL6 and TNF- $\alpha$  were significantly decreased in rats treated with cranberry extract.

Cranberry extract can be considered an important food source, with pharmacological potential for the treatment of UC.

**Keywords:**

Ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, inflammation, cranberry, cytokines, anti-inflammatory.

## **PRINCIPALES ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

CU: Colitis ulcerativa

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

EC: Enfermedad de Crohn

HLA: Antígenos leucocitarios humanos

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

IL: Interleucina

IG: Inmunoglobulina

Th: Linfocito T helper

AST (GOT): Aspartato-amino transferasa (transaminasa glutámico oxalacética)

ALT (GPT): Alanina-amino transferasa (transaminasa glutámico pirúvica)

Transmural: Involucra el espesor de la pared.

## **3. Introducción**

### **3.1 Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)**

Bajo la denominación de EII se agrupan una serie de trastornos inflamatorios del intestino, unos de etiología conocida (infecciosa, física, química o por sensibilidad inmunológica específica) y otros en los que no se establece un factor responsable claro (Peña, 2006).

Los trastornos de etiología desconocida o idiopática abarcan un espectro patológico muy amplio, en los que la colitis ulcerativa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC) son los más comunes (Yamamoto, 2015), por su parte, aproximadamente en el 10% de los casos no es posible realizar un diagnóstico definitivo entre CU y EC y se habla de colitis inespecífica o indeterminada (Prenzel y Uhlig, 2009).

La CU y la EC presentan rasgos clínico patológicos que se superponen y difieren de forma significativa en su curso clínico, su pronóstico, su respuesta al tratamiento farmacológico, a la necesidad de tratamiento quirúrgico y a la tasa de recurrencia posquirúrgica. Ambas se caracterizan por un espectro epidemiológico y tratamiento similar, así como por la aparición de inflamación repetitiva del intestino delgado y/o grueso que pueden producir diferentes manifestaciones clínicas, sobre todo en sus formas típicas, así como la aparición de complicaciones (OMGE, 2009).

La patogenia de la EII no se comprende completamente, tiene factores genéticos y ambientales como la modificación de las bacterias luminales y el aumento de la

permeabilidad intestinal, que juegan un importante papel en la mala regulación de la inmunidad intestinal, lo que lleva a lesión gastrointestinal (OMGE, 2009).

La EC es una enfermedad inflamatoria crónica granulomatosa y transmural (afecta a todas las capas del intestino), con la consiguiente aparición de fisuras, fistulas o abscesos, que puede afectar a cualquier punto del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano, de forma focal, segmentaria, asimétrica, aunque preferentemente se asienta en el íleon y en el colon, pero su distribución suele ser discontinua (puede ser simultánea en varios segmentos del aparato gastrointestinal), siendo normal la pared del tubo digestivo entre las zonas más afectadas. En ocasiones estas características se solapan, o la naturaleza inflamatoria no puede establecerse con certeza, con características histológicas no definitivas de CU y EC, hablándose entonces de colitis indeterminada (Oliva-Hemker y Fiocchi, 2002).

En un sentido estricto también se incluyen en la EII otras tres entidades que crean problemas de diagnóstico diferencial, tanto con la CU como con la colitis granulomatosa, como son la colitis colágena, la colitis microscópica (linfocitaria) y la colitis transitoria o autolimitada (Peña, 2006).

En la CU, la inflamación difusa de la mucosa afecta exclusivamente al colon y recto de forma continua o simétrica, se extiende desde el recto proximalmente a otros segmentos del colon, sin afectar otros tramos del tubo digestivo (Peña, 2006).

### **3.2 Concepto de Colitis Ulcerativa**

Es una enfermedad recurrente inflamatoria aguda, subaguda o crónica no granulomatosa de la mucosa del colon y del recto, de etiología y patogenia desconocidas, de evolución variable y pronóstico impredecible, puede presentar numerosas complicaciones locales y sistémicas, afecta preferentemente a personas jóvenes. Es esencialmente una enfermedad de la mucosa, la cual se afecta de forma continua (Oliva-Hemker y Fiocchi, 2002).

### **3.3 Clasificación**

De acuerdo con la clasificación de Montreal, adoptada en 2005, la CU se clasifica de dos formas: en tres grandes grupos según su extensión y de acuerdo a las crisis activas (Gomollón, 2012).

El conocimiento de la extensión es de gran importancia por las implicaciones terapéuticas y pronósticas que conlleva.

1. Colitis extensa: También llamada colitis universal o pancolitis, se extiende más allá del ángulo esplénico.
2. Colitis distal o izquierda: Su extensión es distal al ángulo esplénico.

3. Proctitis: La extensión de esta CU se circunscribe al recto o hasta la unión rectosigmoidea.

Por su parte el grado de actividad de la CU tiene implicaciones tanto terapéuticas como pronósticas, de ahí su importancia en la práctica clínica diaria. La mayoría de índices elaborados para cuantificar el grado de actividad de la CU tienen en cuenta tanto variables clínicas como analíticas y ninguno de ellos ha sido validado, siendo el más utilizado el índice de Truelove-Witts, mismo que ha sido adaptado a la clasificación de Montreal (cuadro 1). Este índice clasifica la intensidad de la actividad en remisión, si no hay síntomas de colitis, leve, moderada o grave. La principal desventaja de este índice es no tener en cuenta la extensión de la CU, por lo que en algunos casos pierde gran parte de su valor.

Existen otros índices que valoran la actividad según los hallazgos endoscópicos o histológicos o incluso de forma combinada; sin embargo, no se ha logrado establecer una buena correlación de las variables clínicas, endoscópicas e histológicas, por lo que suelen utilizarse sólo en el contexto de ensayos clínicos (Gomollón, 2012).

### Cuadro 1

#### *Clasificación de Montreal de acuerdo al grado de actividad de la CU*

Variable	Leve	Moderado	Grave
Número de deposiciones	≤ 4	5 – 6	> 6
Sangre en heces	+	++	+++
Hemoglobina (g/l)	> 10.5	> 10.5	< 10.5
Fiebre	Ausente	Ausente	> 37.5 °C
Frecuencia cardíaca	< 90	< 90	≥ 90
Velocidad de sedimentación globular	< 30	< 30	> 30

Guía clínica GETECCU del tratamiento de la colitis ulcerativa elaborada con la metodología GRADE. Gomollón, 2012

Cabe destacar que, especialmente en las colitis extensas, la alteración de parámetros bioquímicos que actúan como reactantes de fase aguda o de proteínas como la albúmina o electrolitos como el potasio, suelen presentar una buena correlación con la gravedad de los brotes y, aunque no se incluyan en la mayoría de índices, deben tenerse en cuenta en el momento de la evaluación de los pacientes, también es de suma importancia tener actualizados los principales resultados de laboratorio, como son: biometría hemática, química sanguínea, pruebas de función hepática y de función renal, recordando que al ser una patología con repercusión sistémica siempre será



necesario tener en consideración la mayor información posible de la salud del paciente (Gomollón, 2012).

### **3.4 Epidemiología de la CU**

Afecta principalmente a adolescentes y adultos jóvenes, con una incidencia entre la segunda y cuarta década de la vida (Ford, 2013) y otros posteriores entre los 50 y 70 años (Baumgart, 2007). La incidencia y prevalencia varía enormemente dependiendo de la localización geográfica y entre distintas razas o grupos étnicos. Se han descrito incidencias de 5-18/100.000 habitantes para CU, con las tasas más altas en los países escandinavos y Escocia, seguidos por Inglaterra y América del Norte, y después Europa Central y del Sur. Entre grupos étnicos, los judíos Ashkenazis tienen el riesgo más alto de desarrollar CU. Hasta hace poco tiempo, se consideraba rara en afroamericanos, hispanos y asiáticos, sin embargo, la incidencia y prevalencia no se han evaluado con exactitud en razas no caucásicas (Oliva-Hemker y Fiocchi, 2002; Russel, 1996).

En México existen pocos estudios referentes a la colitis ulcerativa (Sandoval, 2008), en ellos se evidencia un incremento en casos nuevos diagnosticados por año, observando 76 pacientes, comparados con 28 pacientes de la década anterior, y prevalencia que pasó de 2.3/1000 a 3.6/1000 pacientes hospitalizados como lo demuestran los estudios realizados en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y

Nutrición “Salvador Zubirán” (Yamamoto-Furusho, 2009) y los realizados en el Hospital Universitario de la UANL (Sandoval, 2008), siendo ligeramente más frecuente en mujeres (Rodríguez-Leal, 2001).

En general, existe un mayor riesgo de desarrollar CU en zonas urbanas frente a rurales, en clases socioeconómicas altas frente a bajas, y en países desarrollados frente a poco desarrollados. Se ha observado, además, que la incidencia en una población aumenta cuando esta emigra de un área geográfica de bajo riesgo hacia una zona de riesgo más alto (Andus y Gross, 2000), además de presentarse una mayor incidencia en el estilo de vida occidentalizado en el que parece estar vinculado al abandono del tabaquismo, las dietas altas en grasas y azúcares, la utilización de fármacos, el estrés, también se ha asociado con antecedentes de apendicectomía (Danese, 2011).

Existen varios inconvenientes en el estudio epidemiológico de la CU: no se han adoptado universalmente criterios diagnósticos firmes, éstos no se han aplicado de forma similar en todos los estudios y la información usada para clasificar a los pacientes no se puede obtener fácilmente al estudiar poblaciones a gran escala. Además, el intervalo de tiempo entre un evento inicial y el comienzo de los síntomas clínicos o el tiempo de diagnóstico puede ser prolongado, de manera que la asociación entre causa y efecto son particularmente difíciles. Una desventaja adicional es que la mayoría de los estudios retrospectivos no tienen en cuenta los casos categorizados como colitis indeterminada, aunque posiblemente se estén considerando en estudios más recientes (Oliva-Hemker y Fiocchi, 2002).

### **3.5 Etiología y patogenia de la CU**

Se trata de una enfermedad compleja y poligénica, de etiología multifactorial, cuya fisiopatología se caracteriza por una inflamación que afecta en su inicio principalmente el recto, pudiendo extenderse en forma continua y difusa hacia el colon. La CU cursa con infiltrado linfocitario que se extiende de manera continua a través de la mucosa y una pérdida total de la arquitectura normal de criptas con desarrollo de microabscesos en el fondo de éstas, e infiltrado inflamatorio en la lámina propia (Sepúlveda, 2008).

En los últimos años, se han producido importantes avances en la comprensión de la patogénesis de la CU. En primer lugar, el descubrimiento de nuevos genes de susceptibilidad, que han permitido demostrar la importancia de la función de barrera del epitelio del colon, así como las alteraciones en los mecanismos tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. En segundo lugar, la identificación de factores ambientales que implican a las bacterias comensales (o sus productos), como los inductores de la desregulación de la respuesta inmunológica. En tercer lugar, el estudio de modelos murinos de CU, en los que la enfermedad se desarrolla sólo en presencia de bacterias (Khor, 2011).

El principal papel del sistema inmune en la patogénesis de la CU ha recaído en el sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA). Varios estudios han reportado la existencia de una asociación entre HLA-DR2 y CU (Sepúlveda, 2008).

Se ha reportado una asociación importante entre los cromosomas 3, 7 y 12, con la susceptibilidad para desarrollar CU. Estos datos han generado la hipótesis de que la enfermedad tiene algunos genes que predisponen su desarrollo. Al parecer la suma de genes en un individuo afectado, es lo que condiciona la edad de inicio de la enfermedad, así como la intensidad y el comportamiento clínico del padecimiento (Sepúlveda, 2008; Roda, 2011).

Así mismo, en los últimos años se ha tratado de asociar las infecciones intestinales con el desarrollo de CU, sin embargo, no se ha logrado identificar algún patógeno específico. A pesar de esto, en la actualidad se considera que el contenido intestinal o las bacterias que en él habitan, influyen con el inicio de la enfermedad. Es factible que exista un estado de tolerancia a las bacterias habituales del intestino y que, de alguna manera, posiblemente por predisposición genética, ese equilibrio se rompe, lo cual genera que se desarrolle un proceso inflamatorio que se manifiesta como CU (Roda, 2011).

El sistema inmune participa en las reacciones inflamatorias características de estos padecimientos. Se ha identificado una respuesta humoral, principalmente a cargo de Inmunoglobulina G (IgG). De hecho, las dos formas de EII, pueden distinguirse al identificar las subclases de IgG: existe un incremento de IgG1 en CU y un aumento de IgG2 en EC. Las razones de estos hallazgos se desconocen, pero existen pistas que orientan a bases genéticas como responsables del tipo de respuesta inmune que se desarrollará (Danese, 2006).

También se ha informado de una disminución de IgA en pacientes con CU, lo cual posiblemente tiene que ver con una disminución de la respuesta inmune humoral a nivel intestinal. Asimismo, se han encontrado anticuerpos contra leucocitos polimorfonucleares y anticuerpos antineutrófilos citoplásmicos perinucleares (pANCA), los cuales aparecen con mayor frecuencia en pacientes con colitis ulcerativa en su forma grave (Roda, 2011; Danese, 2006).

El cómo y el por qué estas células inmunes se depositan en la pared intestinal son preguntas aún sin responder, pero que tienen que ver sin duda con la fisiopatología de esta enfermedad.

Por otro lado, se considera que, en la colitis ulcerativa, el fenotipo inflamatorio que se desarrolla es el Th2. Las células Th2 producen IL4, IL5, IL6, IL10, e IL13 y promueven la atopia a través de la activación de mastocitos y la inducción de respuestas IgE. Las células no inmunes del intestino (células epiteliales, mesenquimatosas, células nerviosas y células endoteliales) participan en forma activa en el desarrollo y curso de la CU. Las células epiteliales pueden expresar antígenos clase II y funcionar como células presentadoras de antígenos (APC), jugando un papel fundamental en el proceso inflamatorio; presentan también receptores a citocinas IL2, IL15; secretan IL7, la cual es un factor regulador de linfocitos. Por otra parte, el epitelio del colon tiene una capacidad disminuida para inducir células T supresoras y aún más, activan células T cooperadoras CD4+, lo que produce una amplificación de la respuesta inmune y de la inflamación (Roda, 2011).

La presencia de TNF- $\alpha$  es originada por las APC y los macrófagos, promoviendo la inflamación crónica a través de la producción de IL1 $\beta$  e IL6, así como la expresión de moléculas de adhesión, proliferación de fibroblastos, activación de factores procoagulantes, la citotoxicidad y la inhibición de la apoptosis, además de activación de neutrófilos y macrófagos, que estimulan a células B y aumenta la producción de IFN- $\gamma$  por las células T.

La IL4 y TGF- $\beta$  son citocinas antiinflamatorias y su papel en la CU no se ha determinado con claridad. La IL4 es una molécula de estimulación para células T y B y se produce principalmente por linfocitos activados. Pero no se ha detectado IL4 en los tejidos de la UC, pero IL13 e IFN- $\gamma$  se encuentra en altos niveles. Mientras que la TGF- $\beta$  es un regulador en el mantenimiento de las respuestas inmunes e inflamatorias, pero se ha encontrado un aumento en la producción de TGF- $\beta$ 1 por células mononucleares de la lámina propia haciendo que a pesar de TGF- $\beta$  actúa como una molécula antiinflamatoria en el sistema inmune sistémico, localmente tiene propiedades proinflamatorias (Roda, 2011).

Se ha sugerido, que en las manifestaciones clínicas se da una participación importante de las citocinas que intervienen; por ejemplo, la IL1 al favorecer la secreción de aniones e inducción de prostaglandinas y ciclooxigenasa dan origen a la diarrea clásica de este padecimiento (Roda, 2011; Fonceca-Camarillo, 2009).

### 3.6 Clínica

La colitis ulcerativa puede manifestarse de forma gradual o aparecer bruscamente y en ocasiones tan súbitamente, que requiera cirugía precoz. Suele caracterizarse por presentar periodos de actividad o crisis en los que se produce un aumento transitorio de exacerbación de los síntomas, seguidos de periodos de remisión espontáneos o inducidos por el tratamiento. En formas activas graves de CU, el colon puede sufrir una dilatación, lo que clínicamente se denomina como megacolon (WGO, 2015; SEGHN, 2010).

Los signos y síntomas que produce la CU son muy variables y dependientes de la extensión de la enfermedad y de la actividad inflamatoria de cada periodo concreto. Por lo general, los síntomas más frecuentes son los siguientes (WGO, 2015; SEGHN, 2010):

**Diarrea:** Se entiende como un aumento de agua en las heces, causando un aumento en el número de deposiciones y un cambio en su consistencia, con deposiciones más acuosas o sueltas. Es uno de los síntomas más frecuentes de la CU, aunque no es exclusivo de ella, pudiendo estar presente en otras enfermedades intestinales o gástricas, lo que puede causar confusión en el diagnóstico de la CU. En la CU la diarrea puede estar causada por el propio proceso inflamatorio de la mucosa intestinal, aunque también pueden estar implicadas otras alteraciones relacionadas con la absorción de agua o minerales (WGO, 2015; SEGHN, 2010).

En los pacientes con CU, el número de deposiciones es mayor y su volumen escaso, debido a la que inflamación del recto dificulta la evacuación de las mismas. Cuando la afectación del recto es intensa (proctitis), puede producirse la liberación de pequeñas cantidades de sangre fresca y moco (esputo rectal) de manera aislada o conjuntamente con deposiciones líquidas y acompañarse de síndrome rectal caracterizado por sensación de urgencia, incontinencia y de tenesmo. Cuando la enfermedad es más extensa (colitis izquierda y pancolitis), las deposiciones suelen acompañarse de sangre oscura, moco y/o pus y diarreas nocturnas (WGO, 2015; SEGHN, 2010).

Dolor abdominal: No suele ser uno de los síntomas característicos de la CU, aunque puede estar presente en algunos pacientes, dependiendo de la extensión y gravedad de la inflamación o de la crisis. Principalmente lo presentan aquellos pacientes con colitis ulcerativa extensa moderada y grave. Se manifiesta en forma de cólicos y dolor abdominal intenso en la zona central, inferior o izquierda del abdomen. El dolor abdominal puede estar causado por las contracciones musculares del intestino asociadas a los movimientos intestinales, las cuales ejercen una tensión excesiva sobre la capa mucosa inflamada, causando sensación de dolor (WGO, 2015; SEGHN, 2010).

Hemorragia rectal o rectorragia: Junto con la diarrea es otro de los síntomas más frecuentes de la CU. En la capa mucosa del colon, existen gran cantidad de vasos sanguíneos, por lo que la presencia de úlceras originadas por el propio proceso inflamatorio de la mucosa intestinal, pueden causar la liberación de



sangre de forma aislada o durante las deposiciones. La coloración de la sangre puede variar en función del tipo de CU del paciente (WGO, 2015; SEGHNP, 2010).

En los pacientes con CU extensa, puede haber una cantidad de sangre variable mezclada con las heces, en alguna o todas las deposiciones, o incluso aparecer de forma aislada causando ocasionalmente alteraciones en la presión sanguínea (alteraciones hemodinámicas). Si el brote es leve, la hemorragia rectal suele ser escasa y sólo con algunas deposiciones; si el brote es moderado, la presencia de hemorragia rectal en las deposiciones es más frecuente; y si el brote es grave, la cantidad de pérdida de sangre aumenta y tiene lugar durante todas las deposiciones, incluso puede producirse de forma aislada en forma de hemorragia rectal o intestinal (enterorragia) (WGO, 2015; SEGHNP, 2010).

**Fiebre:** La presencia de un proceso inflamatorio puede ser causa suficiente para la presentación de fiebre en cualquier circunstancia; por lo tanto, los pacientes que padezcan una crisis moderada o grave de la enfermedad pueden cursar estados febriles durante la misma. La presencia de fiebre elevada debe tenerse en cuenta, ya que puede ser indicativo de un proceso infeccioso ocasionado por la enfermedad (abscesos, fístulas, etc.) (WGO, 2015; SEGHNP, 2010).

**Anemia:** Su presencia puede surgir a consecuencia de la pérdida de sangre rectal o intestinal. Si esta pérdida es muy importante, puede causar una anemia aguda que será necesario tratar específicamente con suplementos

farmacológicos o requerir en circunstancias extremas, transfusiones sanguíneas (WGO, 2015; SEGHNP, 2010).

**Fatiga:** Algunos pacientes con CU pueden presentar sensación de excesivo cansancio o fatiga, condicionando su calidad de vida. Esta fatiga o sensación de excesivo cansancio puede relacionarse con factores diversos, algunos relacionados con la propia enfermedad (anemia, brote de actividad, etc.), con déficits nutricionales, con la alteración del sueño o con factores psicológicos (miedo a la enfermedad, no aceptación de la misma, estrés, etc.) (WGO, 2015; SEGHNP, 2010).

**Pérdida de peso:** A pesar de no ser un síntoma muy frecuente en los pacientes con CU, las alteraciones de la mucosa intestinal conducen a una reducción en la capacidad de absorción de nutrientes, lo que se traduce en una pérdida de peso en los pacientes. Esta pérdida de peso también puede ser causada por el proceso inflamatorio; ya que cuando éste tiene lugar se produce una mayor demanda y consumo de energía resultado de la degradación de nutrientes (catabolismo), lo que se traduce en un metabolismo acelerado y en una consecuente pérdida de peso (WGO, 2015; SEGHNP, 2010).

**Alteraciones psicológicas:** La CU no está asociada con ninguna enfermedad mental conocida; aunque debido a su carácter crónico y a sus síntomas puede producir alteraciones en el estado emocional del paciente, afectando

directamente a su autoestima y causándole estrés psicosocial en el paciente (WGO, 2015; SEGHNP, 2010).

Retraso en el crecimiento y maduración sexual en edad pediátrica: La CU puede iniciarse durante la edad pediátrica, periodo crítico en el que tienen lugar grandes cambios físicos y una rápida velocidad de crecimiento, y causar en escasas situaciones (solamente en un 3-10% de los pacientes pediátricos) fracaso de crecimiento infantil, malnutrición, retraso de la maduración sexual (retraso puberal), alteraciones en el metabolismo óseo y deficiencia vitamínica (WGO, 2015; SEGHNP, 2010).

Otras manifestaciones extraintestinales: La CU es una enfermedad sistémica, lo que implica que puede causar alteraciones o síntomas en otros órganos o sistemas del cuerpo. Estas manifestaciones extraintestinales pueden ser el resultado de la propia naturaleza inflamatoria de la CU, asociándose temporalmente con una crisis de actividad de la enfermedad o apareciendo de manera independiente al mismo, lo que implica un tratamiento diferente para su desaparición. Entre las más comunes se encuentran las manifestaciones dermatológicas, oculares, articulares, artritis, dolor lumbar, aftas bucales, úlceras cutáneas y alteraciones hepáticas (Laroux, 2001).

### **3.7 Tratamiento**

De acuerdo con las Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología (OMG) para el manejo de la enfermedad inflamatoria intestinal, entre ellas la CU, publicadas en junio de 2009, el tratamiento debe tener en cuenta el estado general de la enfermedad, la extensión de la enfermedad, el curso de la enfermedad durante el tratamiento y seguimiento y las preferencias del paciente, además de estar divididos en diferentes momentos del tratamiento, inducción a la remisión, mantenimiento de la remisión y tratamiento quirúrgico, siendo este último la opción cuando los demás tratamientos fallan (WGO, 2015).

#### **3.7.1 Tratamiento farmacológico**

La inducción de la remisión de la CU se lleva a cabo con la administración de inhibidores de leucotrienos (sulfasalazina, mesalamina y 5-aminosalicilatos) como primera línea, en caso de no obtener buenos resultados se combinan con corticoides (hidrocortisona, budesonida, beclometasona o prednisona), en casos resistentes o de mayor extensión se adicionan agentes inmunosupresores (azatioprina o 6-mercaptopurina), en casos de poca respuesta al tratamiento, casos refractarios o de que se requiera el uso sostenido de corticoides se emplea la combinación del

anticuerpo monoclonal anti-TNF y azatioprima (Martínez-Montiel, 2015; Sales-Campos, 2015; Nielsen, 2014).

Una vez alcanzada la remisión, la meta es mantener al paciente libre de síntomas, que puede ser con varios medicamentos, excepto los glucocorticoides. Cuando el paciente es dependiente de los corticoides pueden emplearse tiopurinas pero pueden pasar varios meses antes de alcanzar su máxima eficacia (Martínez-Montiel, 2015; Sales-Campos, 2015).

En caso de tratamientos prolongados con glucocorticoides se debe vigilar la función suprarrenal y posibles alteraciones en el eje hipotalámico pituitario adrenocortical. En más del 10% de los pacientes se identificaron efectos adversos de la azatioprima, como pancreatitis aguda y supresión de la médula ósea (Zenlea, 2014; Böhm, 2014). Las tiopurinas, se acompañan de un mayor riesgo de trastornos linfoproliferativos (<1 caso/1.000 pacientes año). El empleo de glucocorticoides, tiopurinas y de anticuerpos monoclonales anti-TNF- $\alpha$  tiene un efecto inmunosupresor, lo que convierte al paciente en un blanco fácil de infecciones oportunistas entre la que destaca la tuberculosis. Al iniciar esquemas de antibióticos es importante revisar las interacciones medicamentosas con los glucocorticoides, 5-aminosalicilatos, anticuerpos monoclonales anti-TNF- $\alpha$  y en general con todos los fármacos utilizados para tratar al paciente con CU (Zenlea, 2014; Böhm, 2014).

### **3.7.2 Tratamiento quirúrgico**

Entre los pacientes con CU la cirugía puede ser curativa, las tasas de cirugía van desde <5% a >20%. Las indicaciones de cirugía y las opciones quirúrgicas son múltiples, incluyendo la falta y la falla de tratamiento médico, sin embargo, pueden tener complicaciones como obstrucción del intestino delgado, fístulas, dolor persistente, disfunción vesical y sexual e infertilidad. Este enfoque se asocia con una tasa de morbilidad de 19-27% y una tasa de mortalidad extremadamente baja 0.2-0.4%, con una buena calidad de vida postoperatorio. Es de tenerse en cuenta que cualquier mucosa residual del colon puede convertirse en cancerosa, lo que requiere la vigilancia endoscópica a largo plazo (Danese, 2011; WGO, 2015).

### **3.7.3 Tratamiento nutricional**

Una vez que la enfermedad se ha desarrollado, sus síntomas pueden disminuir si se presta atención a la dieta, reponiendo nutrientes perdidos y promoviéndose la curación. No hay una sola dieta o plan alimenticio que sea beneficioso para todos los que sufren de colitis ulcerativa. Las recomendaciones dietéticas deben ser formuladas de forma individual para cada paciente dependiendo de la parte de su intestino afectada, sus síntomas y los cambios experimentados en el paciente con el paso del

tiempo, particularmente durante una crisis es conveniente modificar la dieta, incluyendo, (DSM, 2009; WGO, 2015):

1. Dieta baja en sodio: Se usa durante terapia con corticosteroides para reducir la retención de agua.
2. Dieta baja en fibra: Evitar la estimulación del movimiento intestinal en la colitis ulcerativa.
3. Dieta baja en grasas: Recomendada durante un brote cuando la absorción de grasas pudiera convertirse en un problema.
4. Dieta libre de lactosa: Pacientes con intolerancia a los productos lácteos.
5. Dieta alta en calorías: En caso de pérdida de peso o retraso en el crecimiento.

Algunos pacientes pueden tener deficiencias de ciertas vitaminas y minerales (incluyendo la vitamina B-12, ácido fólico, vitamina C, hierro, calcio, zinc, y magnesio) o dificultad en ingerir suficientes alimentos para satisfacer las necesidades calóricas, los que hace necesario reconocer, detectar y corregir oportunamente estas deficiencias con suplementos vitamínicos y nutricionales (DSM, 2009; WGO, 2015).

Es conveniente recomendar al paciente realizar un diario de los alimentos que consume lo que permite ver la conexión entre lo que come y los síntomas que surgen y con ello tratar de evitarlos. Aun cuando algunos alimentos específicos no empeoran

la inflamación subyacente de la colitis ulcerativa, ciertos alimentos tienden a empeorar los síntomas. También es recomendable sugerir, (DSM, 2009; WGO, 2015):

- a. Reducir la cantidad de comida grasa o alimentos fritos, los cuales causan diarrea y gas.
- b. Comer porciones pequeñas a intervalos frecuentes.
- c. Limitar el consumo de leche o productos lácteos si tiene intolerancia a la lactosa.
- d. Evitar bebidas gaseosas si tiene problemas excesivos de gas.
- e. Limitar la cafeína cuando se tiene diarrea fuerte, ya que la cafeína actúa como laxante.
- f. Los alimentos blandos se toleran mejor que los alimentos picantes o condimentados.
- g. Limitar el consumo de alimentos que contengan mucha fibra tales como las nueces, las semillas, el maíz y las palomitas de maíz, debido a que estos alimentos no son digeridos completamente por el intestino delgado, pueden causarle diarrea. Es por eso que a menudo se sugiere una dieta baja en fibra y compuestos con bajo contenido de fibra.



La buena nutrición es esencial en cualquier enfermedad crónica, pero especialmente en la colitis ulcerativa ya que el dolor estomacal y la fiebre pueden causar pérdida de apetito y peso, por su parte la diarrea y el sangrado rectal representan pérdida de fluidos, minerales y electrolitos, los cuales deben mantenerse lo más balanceados para alcanzar la mejoría (DSM, 2009; WGO, 2015).

La mayoría de los médicos recomienda una dieta balanceada para evitar la deficiencia nutricional. Una dieta saludable debe contener una variedad de alimentos de todos los grupos alimenticios. La carne, el pescado, el pollo y los productos lácteos (si los tolera) son fuente de proteína; pan, cereal, almidones, frutas, y vegetales son fuente de carbohidratos; la margarina y los aceites son fuente de grasas (DSM, 2009; WGO, 2015).

#### **3.7.4 Tratamiento alternativo o fitoterapéutico**

En años recientes la Organización Mundial de la Salud ha fomentado y promovido el empleo de los tratamientos alternativos (terapias naturales, la medicina tradicional y la herbolaria), es aquí en donde la fitoterapia cobra una gran importancia, pero también es importante que estas terapéuticas estén reguladas y que en efecto cumplan con su objetivo sin causar más daño, con pocos efectos indeseables o que estos sean mínimos, además de que estén al alcance del paciente de forma económica y práctica,

el presente trabajo tiene como finalidad determinar el efecto preventivo del arándano rojo en un modelo de colitis ulcerativa inducido en ratas Wistar.

### **3.8 Antecedentes**

Se sabe que los arándanos son ricos en antioxidantes y vitaminas, además se ha demostrado que la fibra de arándanos es importante y puede aliviar y proteger contra las inflamaciones intestinales (Piberger, 2011; Skrovankova, 2015).

Los arándanos son ricos en polifenoles entre los que destacan los flavonoides principalmente antocianinas y proantocianidinas, que tienen efecto antitumorigénico, anticancerígeno, antiinflamatorio, antimicrobiano y antioxidante (Ballester, 2006; Mercado, 2013).

Las antocianinas son un grupo de flavonoides que se encuentran en el tejido de la planta que son responsables de la pigmentación roja, azul o violeta de frutas y flores. Estas sustancias solubles en agua se pueden encontrar en altas concentraciones en los arándanos y se ha asociado con varios efectos beneficiosos sobre la salud humana. Los datos resultantes de experimentos demuestran que la ingesta de arándanos puede estar directamente relacionada con una disminución en la intensidad de la inflamación en su forma aguda y crónica al reducir las citocinas proinflamatorias como son TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL2, IL10 y óxido nítrico, esto a través de su acción

inhibidora sobre el factor de transcripción nuclear kappa B (NF-KB), activador de muchas citocinas proinflamatorias.

Por otro lado, también ejerce su acción antiinflamatoria al inhibir las actividades enzimáticas del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la 5-lipooxigenasa y del leucotrieno B, así como por su actividad antiproteolítica al inhibir algunas proteasas de la matriz (Martínez-Flores, 2002), al tiempo que aumenta el contenido de ácido butírico y ácido propiónico en la sangre, dos sustancias que se forman cuando las fibras del arándano se rompen y que han sido previamente conocidas por ser importantes fuentes de energía para las células intestinales (Piberger, 2011; Ballester, 2006; Mercado, 2013).

En los últimos años también han demostrado su impacto favorable de la defensa inmune (Piberger, 2011). De hecho, se ha demostrado que los flavonoides pertenecientes a plantas medicinales de Tafi del Valle, Tucumán (Argentina), tienen actividad antimicrobiana (Martínez-Flores, 2002).

Los flavonoides tienen potentes propiedades protectoras celulares, principalmente los protoantocianídicos, presentes en el arándano rojo, pueden ser absorbidos por las membranas celulares y protegerlas de la acción de los radicales libres. Tienen la ventaja de ser liposolubles e hidrosolubles: es decir, se disuelven en lípidos o en agua. Por eso, en contraste con otros antioxidantes que no poseen esa doble cualidad, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y pueden proteger a las células cerebrales, que son muy sensibles a las lesiones producidas por los radicales libres.

Además, combaten las alergias y aumentan la efectividad de las células natural killer del sistema inmunológico (Piberger, 2011; Skrovankova, 2015; Ballester, 2006; Mercado, 2013; Martínez-Flores, 2002).

## 4. Justificación

La colitis ulcerativa (CU) es una enfermedad que cursa con inflamación y úlceras en la mucosa y submucosa del colon y recto. En México se ha reportado un incremento en su incidencia y prevalencia, siendo principalmente detectados en grandes ciudades como son la Ciudad de México y Monterrey, Nuevo León. Estos cambios epidemiológicos suceden cuando una sociedad se encuentra en vías de desarrollo económico, caracterizado por la movilidad de la población del ambiente rural al medio urbano y al aumento de productos industrializados.

Actualmente se cuenta con guías de la OMG para el tratamiento de este padecimiento, el cual está basado en la administración de fármacos formulados para disminuir la inflamación de la mucosa del colon y que en el mejor de los casos deben ser administrados por largos periodos de tiempo, en otros casos se tomarán indefinidamente y en casos graves o difíciles será necesaria la cirugía, lo que representa para el paciente y para el sistema de salud pública enfrentar costos elevados en medicamentos, riesgo de efectos secundarios y de reacciones adversas.

La Organización Mundial de la Salud ha fomentado y promovido el empleo de tratamientos alternativos, para lo cual elaboró directrices para el empleo de fitoterapia que incluyen protocolos de investigación y elaboración de fitofármacos. Una alternativa fitoterapéutica, que puede estar incluida en su alimentación, es el arándano rojo grande el cuál modifica favorablemente factores proinflamatorios presentes en la CU, además el paciente se beneficia de los efectos antioxidantes y antibacteriales que posee el arándano rojo.

## 5. Pregunta de investigación

¿La administración subcrónica del extracto acuoso de arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*) tendrá un efecto preventivo en la inflamación en un modelo experimental de colitis ulcerativa?

## 6. Hipótesis

La administración subcrónica del extracto acuoso de arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*) previene el proceso inflamatorio en un modelo experimental de CU.



## **7. Objetivos**

### **7.1 Objetivo General**

Determinar el efecto protector del extracto acuoso de arándano rojo sobre la mucosa del colón en un modelo animal de enfermedad inflamatoria intestinal del tipo colitis ulcerativa.

### **7.2 Objetivos Específicos**

- Determinar el efecto del extracto acuoso de arándano sobre parámetros bioquímicos en un modelo de colitis ulcerativa.
- Determinar el efecto del extracto acuoso de arándano sobre la arquitectura macroscópica del endotelio de colón en un modelo de colitis ulcerativa.
- Evaluar el efecto del extracto acuoso de arándano sobre la secreción y expresión de citocinas proinflamatorias (IL6 y TNF- $\alpha$ ) después de la inducción de la colitis ulcerativa.

## **8. Materiales y métodos**

### **8.1 Desarrollo experimental**

#### 8.1.1 Tipo y diseño de investigación

Investigación experimental aleatorizado, controlado, cuantitativa y cualitativa de corte transversal con diseño cruzado de casos y controles.

#### 8.1.2 Unidad de estudio.

Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud y Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

#### 8.1.3 Población estudiada

- 30 Ratas Wistar de 16 semanas de edad, obtenidos del Bioterio de la UAM-Iztapalapa y mantenidos bajo condiciones controladas de luz/obscuridad con base en la Norma Oficial Mexicana-062-ZOO-1999.

### **8.2 Variables**

#### 8.2.1 Variable independiente

- Tiempo y vía de administración del extracto acuoso de arándano rojo grande.
- Tiempo de la inducción de la colitis.

- Dosis del extracto acuoso del arándano rojo grande.
- Dosis del AINES
- Tiempo y duración de la sedación.

#### 8.2.2 Variables dependientes

- Cambios macroscópicos del tejido del colón.
- Cambios en los marcadores bioquímicos proinflamatorios.

### **8.3 Criterios de Inclusión y Exclusión**

#### 8.3.1 Inclusión

- Ratas Wistar de 16 semanas de edad con un peso de 290 a 360 gramos.

#### 8.3.2 Exclusión

- Muerte del ejemplar
- Ejemplar enfermo

#### **8.4 Extracto acuoso**

Se compraron arándanos rojos comerciales (1200 g), se lavaron con agua bidestilada y cortaron en rodajas finas, se colocaron las rodajas en charolas para su deshidratación en campana de flujo laminar por 10 días. La muestra seca se trituró hasta obtener un polvo fino.

El polvo (127 g) se colocó en un matraz Erlenmeyer de 2000 ml y se agregaron 1500 ml de agua bidestilada, se tapó con gasa simple para transpiración y se dejó en campana de flujo laminar por 72 horas para su maceración, se filtró el extracto colocándolo en refractarios de vidrio y se colocaron en campana de flujo laminar hasta que se secó completamente. Se colectó el extracto seco del fondo de los refractarios y se colocó en frasco de vidrio color ámbar.

#### **8.5 Estandarización**

Para obtener la dosis estándar de sedación con fenobarbital, se usaron dosis de 35-45 mg/kg de peso del promedio de las ratas Wistar, obteniendo una dosis estándar de 0.80 ml de fenobarbital en dilución 1:10 con agua bidestilada, que administrándose vía subcutánea se obtienen 15 minutos de sedación del ejemplar para punción intracardiaca e inducción del modelo de CU.

El modelo experimental de CU se obtuvo mediante la administración de 1 ml de ácido acético al 5% intrarectal con catéter blando de 4 cm x 23G, después de 30 segundos de exposición, se retira el líquido y se enjuaga el colon con 1.5 ml de solución salina y fosfato, como búfer y dilución del ácido acético restante en el colon (Elson, 1995; Almero,2007).

Los animales empleados para estos procedimientos se sacrificaron a las 24 horas con CO<sub>2</sub>, procediendo a realizar disección para verificar la implantación y duración del modelo de CU.

## **8.6 Grupos experimentales**

Se recibieron 30 ratas Wistar al bioterio de la universidad y se separaron aleatoriamente en tres grupos: control (agua purificada), control positivo (indometacina) y experimental (extracto acuoso de arándano).

Todos los ejemplares fueron manipulados por un periodo de 10 días, para lograr una habituación antes de iniciar la fase experimental. Esta manipulación consistió en cambio y limpieza de hábitat, con libre acceso al agua y alimento y ciclo de luz/obscuridad de 12 por 12 horas.

## **8.7 Obtención de muestras iniciales o basales**

Se tomaron muestras de sangre con técnica de extracción por goteo de la vena caudal, recolectándose en tubos eppendorf de 1.5 ml. Obtenidas las muestras se centrifugaron a 2500 rpm por 15 minutos a 4° C. Se separó el suero con pipeta automática con punta de 500 µl y se congeló a -70° C para su posterior análisis.

## **8.8 Tratamiento subagudo de los grupos control, indometacina y arándano**

- a) Al grupo control se le administraron 2 ml de agua purificada en una toma.
- b) Los controles positivos recibieron indometacina en tabletas pulverizadas diluidas en 2 ml de agua destilada a dosis de 3 mg/kg/día en una toma.
- c) Al grupo experimental se le administró extracto acuoso de arándano rojo diluido en 2 ml de agua destilada a dosis de 100 mg/kg/día en una toma.

La administración de todos los tratamientos fue por 34 días.

## **8.9 Inducción del modelo experimental de colitis ulcerativa**

Los días 30, 32 y 34, bajo sedación ligera con 0.80 ml vía subcutánea de fenobarbital en dilución 1:10, se administró a todos los grupos 1 ml de ácido acético al 5% vía intrarectal, después de 30 segundos de exposición, se retira el líquido y se enjuaga el colon con 1.5 ml de solución salina y fosfato, como búfer y dilución del ácido acético restante en el colon (Elson, 1995; Almero,2007).

## **8.10 Obtención de muestras finales.**

A las 24 horas de la inducción del modelo experimental (día 35), previa sedación, a todos los grupos se les realizó extracción de sangre mediante punción cardíaca con la finalidad de obtener un volumen de 5 ml de sangre. La muestra fue recolectada en tubos de centrifuga de 10 ml de capacidad, sin anticoagulante, protegiéndolos de la luz. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm a temperatura de 4° C durante 15 minutos, el suero se separa en tubos eppendorf de 200 µl para realizar las determinaciones de AST y ALT y en tubos eppendorf de 1.5 ml para determinación de TNF-α e IL6, se congeló la muestra a -70° C.

Las ratas se sacrificaron en una cámara de CO<sub>2</sub> y se sometieron a disección, obteniendo muestras del colon descendente en su porción distal de 2.5 a 6 cm del recto.

En la muestra obtenida de colon se observó macroscópicamente el daño existente en el colon. Otra muestra de colon se colocó en RNAlater para determinar los niveles de expresión de citocinas (IL6 y TNF- $\alpha$ ).

### **8.11 Cuantificación de AST y ALT.**

Se descongeló la muestra de suero, con el aplicador del Reflotron se recolectó el suero en un tubo capilar, sosteniendo el aplicador Reflotron con el tubo capilar sobre la tira reactiva y se presionó el botón en la parte superior del aplicador para asegurar el paso de aire por el tubo capilar obligando así a que el suero gotee en la tira reactiva. Quedando la tira cubierta de suero (32  $\mu$ l), se cerró el analizador para medir la concentración de AST, ALT cada uno con su tira reactiva específica.

### **8.12 Determinación de concentración de IL6 y TNF- $\alpha$ mediante técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).**

Se utilizaron kit de ELISA para determinación de IL6 en suero de rata, marca Novex life technologies por Thermo Fisher Scientific, con sensibilidad de <5 pg/mL y kit de



ELISA para determinación de TNF- $\alpha$  en suero de rata, marca Invitrogen por Thermo Fisher Scientific, con sensibilidad de <4 pg/mL.

Se realizaron las diluciones de las muestras y los estándares en los tubos de polipropileno, se agregaron 100  $\mu$ L de muestra (suero de las ratas) con el diluyente indicado, en cada pozo. Se mezclaron suavemente en la placa durante un minuto y cubrieron con una tira adhesiva para posteriormente incubarse por dos horas a temperatura ambiente. Se aspiró y lavó la placa. Se agregaron 100  $\mu$ L del anticuerpo diluido a cada pozo, se cubrieron con una nueva tira adhesiva para incubar nuevamente por dos horas más a temperatura ambiente en el empaque que traen los kits. Se aspiró y lavó la placa. Se agregaron 100  $\mu$ L de Streptavidin-HRP a cada pozo. Se cubrió la placa e incubó por 20 minutos a temperatura ambiente en el empaque que traen los kits. Se aspiró y lavó la placa. Se agregaron 100  $\mu$ L de solución de substrato a cada pozo, dejando incubar por 30 minutos a temperatura ambiente en el empaque que traen los kits. Se agregaron 50  $\mu$ L de solución de paro a cada pozo (para detener la reacción y realizar una buena medición). Se mezcló suavemente para asegurar la homogenización. Se determinó la absorbancia de cada pozo con el espectrofotómetro a 570 nanómetros. Se realizó la curva estándar para el cálculo de reacciones para calcular las concentraciones de IL6, TNF- $\alpha$  sobre la base de estándares.

### **8.13 Extracción de RNA total.**

Para la extracción del RNA total se utilizó la metodología descrita por QIAGEN. Después de los tratamientos indicados en el diseño experimental, se obtuvieron 200 mg de colon descendente de todos los ejemplares; el tejido intestinal se cubrió inmediatamente con RNAlater se mantuvo durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se almacenó a -70 °C.

a) Homogeneización: Se agregó 1 ml de trizol en cada una de las muestras de colon y se homogeneizó el tejido 30-40 segundos. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente (20-26 °C) por 5 minutos. Este paso promueve la disociación de los complejos de las nucleoproteínas. Para separar se agregaron 200 µl de cloroformo por ml de trizol agitando vigorosamente. Se incubó a temperatura ambiente (20-26 °C), por 5 minutos. Centrifugándose a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se extrajo la fase acuosa y se colocó en un tubo limpio.

b) Precipitación: Se agregaron 500 µl de isopropanol por ml de trizol (agitando por inversión). Se incubó en hielo 30 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante cuidando no resuspender el botón.

c) Lavado: Se retiró el sobrenadante, se agregó 1 ml de alcohol al 70% por cada ml de trizol, se agitó utilizando el vortex hasta suspender el botón, se centrifugó a 7500 rpm por 5 minutos a 4 °C.

d) Redisolución: Se eliminó todo el etanol posible procurando dejar solo el pellet, dejando evaporar el etanol restante por 10-15 minutos, se agregaron 45  $\mu$ L de agua. Incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. Se colocaron 999  $\mu$ L de agua en un tubo eppendorf de 1.5 ml. El nanodrop se limpió con 1.5  $\mu$ L de agua, se secó, se abrió el software y se calibró. Se colocó 1.5  $\mu$ L de RNA. Se leyó a 260 y 280 nm, obteniendo la concentración. Se dividió el RNA en alícuotas y se guardaron a -70 °C.

#### **8.14 Cuantificación de la expresión de citocinas por RT-PCR**

Para la transcripción reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), primero se preparó el DNA complementario (cDNA) a partir de RNA. Los productos de PCR se analizaron por medio de la tecnología SYBER Green (Roche Molecular Biochemicals Mannheim Germany).

El equipo que se utilizó fue un LightCycler 2.0, que mide continuamente la amplificación de productos de PCR en cada ciclo (preincubación 90°/10 minutos, PCR 90°/00 segundos; 61°/07 segundos; 72°/10 segundos, melting 90°/00 segundos; 65°/15 segundos; 90°/00 segundos y enfriamiento 40°/30 segundos, usando iniciadores normales de PCR y el fluorocromo SYBER Green Dye I® que se intercala en las hebras de doble cadena.

Los iniciadores para las citocinas seleccionadas fueron los siguientes:

TNF- $\alpha$	F5'-CCTCCCTCTCATCAGTTCTA-3' R5'- ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'
IL6	F5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3' R5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3'

Como sonda de normalización se utilizó  $\beta$ -actina (F5'-AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT-3' R5'-CCGCAGGGGCAGCAGTGGT-3').

Se estandarizaron las reacciones para cada uno de los iniciadores y se utilizó el método de RRcT para cuantificar la expresión de cada citocina. Se verificó la amplificación específica de cada uno de los transcritos por medio del análisis de las curvas de fusión respectivas. La integridad de PCR se determinó por el análisis de los productos de amplificación en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio.

### **8.15 Trato ético de los animales de laboratorio**

Durante la ejecución de la investigación se siguieron las normas éticas nacionales e internacionales para realizar experimentos en animales de laboratorio, establecidas por las NOM-062-ZOO-1999, NOM-087-ECOL-SSA1-2002, el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, conjuntamente con la OMS y la UNESCO–CIOMS. En este sentido, en concordancia con el enunciado de “las tres erres” de William Russell y Rex Birch, se usó el mínimo número de animales de la especie y calidad apropiada para obtener resultados científicamente válidos. Así mismo, con el propósito de minimizar el sufrimiento de los animales, al finalizar el tratamiento a las ratas se les aplicó la eutanasia por el método de inhalación. Los animales fueron colocados en una caja de acrílico en la que se suministró un flujo constante de bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

### **8.16 Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) con una prueba complementaria de Tuckey Kramer, de acuerdo con la distribución de los datos, para evaluar las diferencias dentro de un mismo grupo y entre los grupos, con un nivel de significancia del 95%,  $p \leq 0.05$ .

## 9. Resultados

En la figura 1 panel (a) se muestran ejemplares utilizados para la estandarización de la anestesia; posteriormente se observan cortes de colon descendente entre los 2.5 y los 6 cm del recto (Anatomía Möller, 2013) después de inducir el modelo experimental de CU, en el panel (b) podemos observar necrosis en la mucosa del colon descendente y el panel (c) muestra hemorragia en la mucosa del colon.

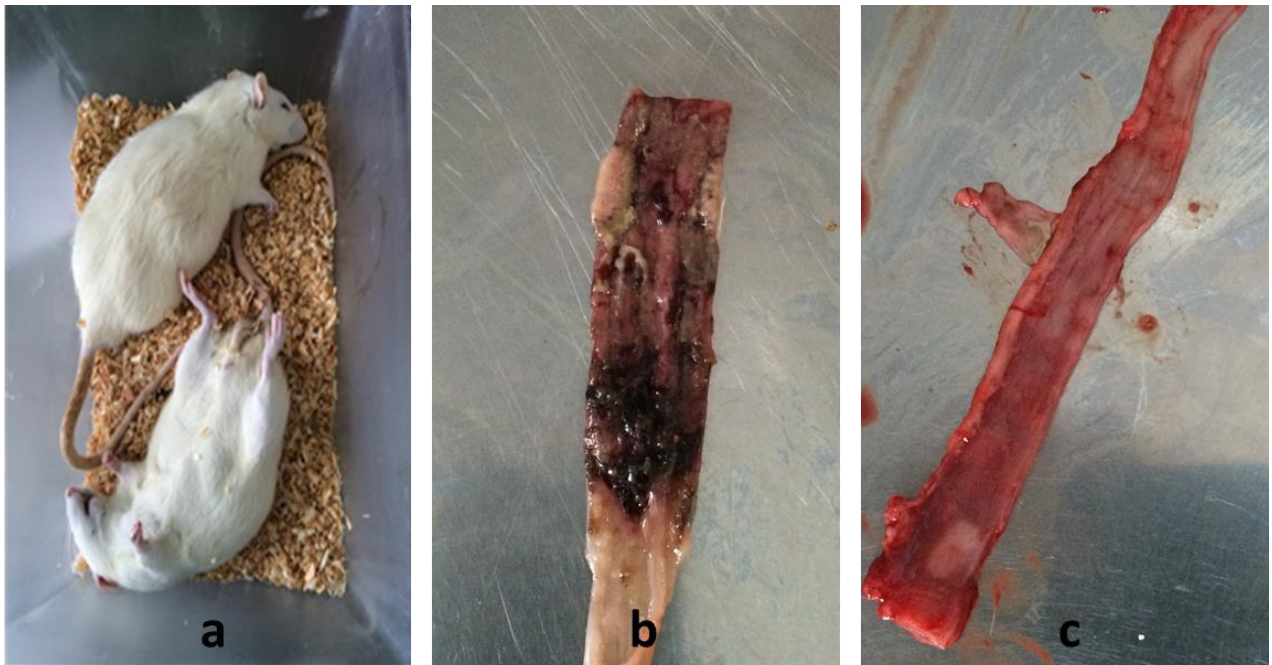


Figura 1. Ejemplares utilizados para la estandarización de la anestesia y del modelo de colitis ulcerativa respectivamente.

En la figura 2 se muestran por fila los segmentos de colon descendente de los ejemplares de rata Wistar de los grupos (a) control, (b) indometacina, (c) arándano. En la fila (a) se puede apreciar tejido intestinal con presencia de láminas acartonadas por necrosis, úlceras secas de tamaño medio con presencia de mucosa afectada entre ellas, hemorragia, edema, congestión vascular, friabilidad e hiperemia en la mucosa del colon, en la fila (b) se observa afectación moderada en la que hay presencia de zonas hiperémicas, friabilidad con presencia de pequeños focos hemorrágicos, en la fila (c) se aprecia afectación claramente delimitada en la que únicamente se aprecia hiperemia, edema y pequeñas ulceraciones aisladas.



Figura 2. Vista de sección transversal del colon descendente a 2.5 cm del recto de rata Wistar sometidas a modelo experimental de colitis ulcerativa. (a) control, (b) indometacina, (c) arándano.

En el cuadro 2 se muestran los valores iniciales, de las ratas Wistar empleadas en este estudio, previos a cualquier tipo de manipulación o tratamiento.

**Cuadro 2**  
*Valores iniciales de la muestra en estudio<sup>1</sup>*

	AST (U/L)	ALT (U/L)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IL6 (pg/ml)
Sanos	169.7 $\pm$ 6.0	67.4 $\pm$ 5.6	568.3 $\pm$ 2.3	1.06 $\pm$ 0.01

<sup>1</sup> Valores obtenidos de ratas Wistar antes de ser sometidas a los procedimientos realizados en el presente trabajo. (media  $\pm$  S.E.M.) (N=24).

La determinación de ALT y AST (cuadro 3) muestra que el grupo tratado con extracto de arándano rojo tiene una disminución estadísticamente significativa, que si bien los valores no salen de los parámetros de la normalidad si presentan una fuerte tendencia a regresar a los valores iniciales (cuadro 2).

**Cuadro 3**  
*Determinación de transaminasas hepáticas*

	AST (U/L)	ALT (U/L)
Control	203.75 $\pm$ 17.4	72.4 $\pm$ 5.23
Indometacina	190.2 $\pm$ 2.0	71.7 $\pm$ 2.8
Arándano	*161.8 $\pm$ 3.4	*43.2 $\pm$ 4.5

Determinación cuantitativa de parámetros bioquímicos (media  $\pm$  S.E.M.) en suero de ratas Wistar tratadas con indometacina y extracto acuoso de arándano rojo en modelo experimental de colitis ulcerativa (N=24). \*Se observa una diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$  con respecto al grupo control.



En el cuadro 4 se observa, en el grupo indometacina, una disminución en los valores de TNF- $\alpha$  sin ser significativos; en IL6 sin embargo encontramos una diferencia significativa con respecto al grupo control. Mientras que el grupo tratado con extracto de arándano rojo presenta una disminución en los valores de TNF- $\alpha$  e IL6 estadísticamente significativa.

**Cuadro 4**  
*Determinación de citocinas proinflamatorias*

	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IL6 (pg/ml)
Control	677.13 $\pm$ 3.9	1.92 $\pm$ 0.03
Indometacina	595.6 $\pm$ 2.9	*1.14 $\pm$ 0.03
Arándano	*388.8 $\pm$ 0.4	*1.12 $\pm$ 0.01

Valores obtenidos mediante técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas de citocinas proinflamatorias IL6 y TNF- $\alpha$  en suero de ratas Wistar tratadas con indometacina y extracto acuoso de arándano rojo en modelo experimental de colitis ulcerativa. \*Se observa una diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$  con respecto al grupo control.

En la figura 3 se observa un aumento en la expresión de RNAm de TNF- $\alpha$  en el grupo control con respecto a los valores obtenidos antes de ser tratados (cuadro 2), por su parte en las muestras de colon de los ejemplares tratados con indometacina hay una disminución de la expresión del RNAm de TNF- $\alpha$  con respecto al grupo control que no es estadísticamente significativa. Las muestras de colon de los animales tratados con extracto de arándano (\*) presentan una disminución de la expresión de RNAm de TNF- $\alpha$  con respecto a los demás grupos, incluso de los animales sanos (cuadro 2), siendo esta disminución estadísticamente significativa.

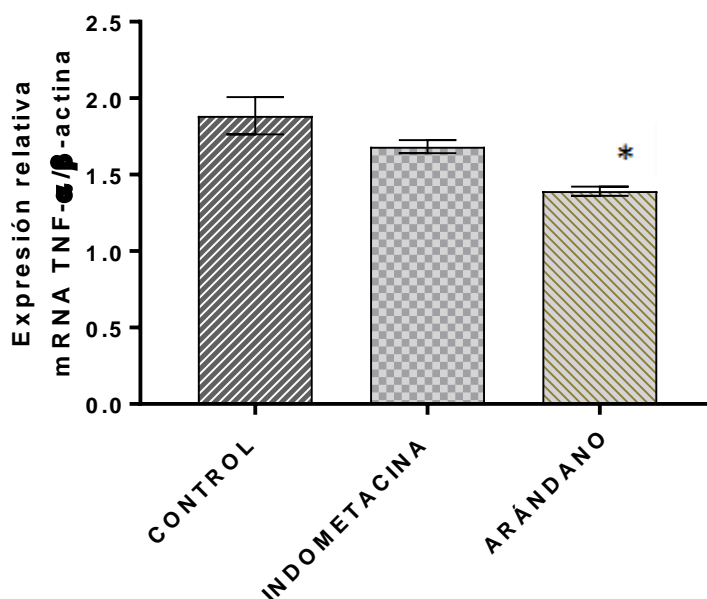


Figura 3. Expresión del RNAm de TNF- $\alpha$  en tejido de colon, después de 30 días de tratamiento con arándano rojo (100 mg/kg/día), se cuantificó el nivel de expresión de RNAm de TNF- $\alpha$  en ratas Wistar sanas por RT-PCR en tiempo real, que se normalizó con la expresión del RNAm de la proteína ribosomal  $\beta$ -actina. Los resultados representan el promedio  $\pm$  S.E.M. de 24 determinaciones independientes. El grupo arándano (\*) presenta una disminución de la expresión de RNAm de TNF- $\alpha$   $p < 0.05$ .

En la figura 4 se observa un aumento en la expresión de RNAm de IL6 en el grupo control. Los grupos indometacina y arándano (\*) presentan una disminución en la expresión de RNAm de IL6 con respecto al grupo control, entre ellos y con relación al grupo sano (cuadro 2) presentan una diferencia significativa principalmente el grupo arándano.

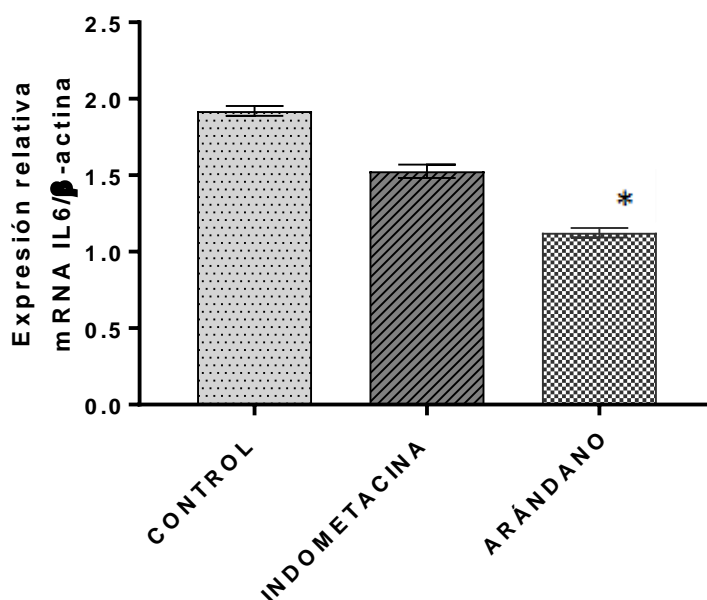


Figura 4. Expresión del RNAm de IL6 en tejido de colon, después de 30 días de tratamiento con arándano rojo (100 mg/kg/día), se cuantificó el nivel de expresión de RNAm de IL6 en ratas Wistar sanas por RT-PCR en tiempo real, que se normalizó con la expresión del RNAm de la proteína ribosomal  $\beta$ -actina. Los resultados representan el promedio  $\pm$  S.E.M. de 24 determinaciones independientes. El grupo arándano (\*) presentan una disminución con relación a los demás grupos  $p < 0.05$ .

## 10. Discusión

Durante la última década se ha observado un incremento significativo de pacientes diagnosticados con CU en dos grandes ciudades de México: Monterrey y la Ciudad de México. Al tiempo en el ámbito de la investigación internacional se presentan grandes avances en los posibles factores para este padecimiento, lo que nos lleva a buscar una forma de control de la enfermedad, la cual está caracterizada por la inflamación de la mucosa del colon.

La defensa natural del organismo se basa en tres elementos: barrera externa, sistemas inespecíficos y respuestas antígeno-específicas. La inflamación es la respuesta inicial e inespecífica del organismo ante estímulos mecánicos, químicos o microbianos. Es una respuesta rápida y ampliada, controlada humoral y celularmente (complemento, cininas, coagulación y cascada fibrinolítica) y se desencadena por la activación conjunta de fagocitos y células endoteliales. Es una respuesta beneficiosa si el proceso inflamatorio mantiene un equilibrio entre células y mediadores. Aparece vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, activación/adhesión celular e hipercoagulabilidad. La vasodilatación y el incremento de la permeabilidad microvascular en el lugar de la inflamación aumentan la disponibilidad local de nutrientes y de oxígeno, produciendo calor, hinchazón y edema tisular (García, 2008).

La inflamación aguda es una respuesta rápida ante un agente agresor que sirve para liberar mediadores de defensa (leucocitos y proteínas plasmáticas). Esta reacción está principalmente producida por la actividad fagocítica de las células mesodérmicas (García, 2008).

Los estudios que integran este trabajo evalúan el potencial terapéutico del arándano rojo como antiinflamatorio en un problema de salud pública creciente en la actualidad de nuestro país, por lo que es importante tener más alternativas para su manejo y tratamiento, principalmente si estas son de bajo costo y se encuentran al alcance de la población de poco poder adquisitivo, al tiempo que se puedan ingerir sin la necesidad de estar sujetos a un horario, dosis o presentación farmacológica.

En el contexto de que la colitis ulcerativa experimental inducida con ácido acético se asemeja a la colitis ulcerativa en humanos, se debe tomar en cuenta que a pesar de que la colitis daña la mucosa intestinal y activa células endoteliales en las proximidades del foco inflamatorio, con el conducente incremento en la secreción y expresión de citocinas proinflamatorias no implica necesariamente que jueguen un papel en la fisiopatología del proceso inflamatorio o puedan ser dianas terapéuticas (Soriano, 2004).

La disminución de los marcadores proinflamatorios, especialmente el TNF- $\alpha$  es importante ya que al existir inflamación el proceso se puede perpetuar al activarse un mecanismo fisiológico conocido como retroalimentación positiva, así mismo se ha demostrado que la falta de inactivación del TNF- $\alpha$  puede ser de origen genético

(Marjoram y Bagnat, 2015) lo que lleva a pensar en la posibilidad de encontrar un mecanismo alternativo para su inactivación, dado que el disminuir el proceso inflamatorio lleva a la mejoría en el paciente, disminuyendo con ello la sintomatología motivo de consulta y en casos severos de hospitalización con la consecuente pérdida temporal de seguir siendo productivo.

Por el lado de los arándanos es conveniente considerar que tienen la capacidad de evitar la concentración de malondialdehído (MDA), que al igual que los polisacáridos de plantas, incluyendo pectinas, se supone que son capaces de minimizar el daño inducido por radicales libres. Un polisacárido de *Angelica sinensis* se ha encontrado que posee un efecto protector sobre lesión de colon inmunológica, que es probablemente debido al mecanismo de antioxidación (Liu, 2003; Ko, 2005) mostró que el daño del colon se redujo significativamente por el pretratamiento de los ratones con un extracto *Astragalus membranaceus* que contiene polisacáridos y saponinas. Un polisacárido de *Rheum tanguticum* se ha demostrado que protege las células epiteliales intestinales contra el estrés oxidativo (Liu, 2005).

Los polifenoles pertenecen, como los carotenoides, a los cerca de 60.000 metabolitos secundarios de las plantas que contribuyen a protegerlas de las plagas o a darles color, aroma o fragancia. Entre los polifenoles encontramos los ácidos fenólicos y los flavonoides (pigmentos), se encuentran principalmente en frutas y bebidas derivadas de plantas como los zumos de fruta, el té, el cacao y el vino tinto, así como en las verduras, los cereales y el chocolate. Puesto que los polifenoles se encuentran en numerosos alimentos y participan en diversos procesos biológicos, no es fácil

investigarlos Según los estudios actuales, los polifenoles podrían contribuir a la prevención de enfermedades crónicas. Sin embargo, los datos disponibles aún no son suficientes para extraer de ellos recomendaciones de ingesta generales o dirigidas a determinados grupos de población con riesgo de sufrir determinadas enfermedades. (DSM, 2009).

Gran parte de la evidencia sobre la eficacia de los polifenoles se ha extraído de estudios realizados en animales, con dosis muy por encima de los niveles que los humanos alcanzan a través de la dieta. Por otra parte, hay estudios epidemiológicos y clínicos sobre la relación entre la ingesta de polifenoles (en particular del gran grupo de los flavonoides) y el mantenimiento de la salud en humanos, así como la prevención de enfermedades. La función de los polifenoles parece proceder de la modulación del estrés oxidativo: se habla de su capacidad de unir proteínas o minerales, de unirse a bacterias y virus, así como de sus efectos hormonales (DSM, 2009).

Dentro de los flavonoides encontramos las antiocianinas, que se encuentran en gran cantidad en el arándano rojo y frutos del bosque, estas poseen una gran capacidad antioxidante, evitan la fijación de bacterias, virus y hongos, además de ser un excelente modulador del estrés oxidativo y antiinflamatorio al controlar el TNF- $\alpha$  y la IL6, ya que, como se describió en su mecanismo de acción, inhibe el NF-KB y la actividad enzimática del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la 5-lipoxigenasa y del leucotrieno B (Martínez-Flores, 2002). Al reducir la secreción y la expresión de citocinas proinflamatorias se tienen mayores posibilidades de evitar la perpetuación de la inflamación, con la consiguiente mejoría del paciente (DSM, 2009).

El estímulo de la membrana del neutrófilo produce radicales libres derivados del oxígeno, la interacción de estas sustancias con el ácido araquidónico da lugar a la generación de sustancias quimiotácticas, que perpetúan el proceso inflamatorio, por tanto, la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes, como el arándano rojo, puede reducir el riesgo de padecer procesos inflamatorios crónicos.



## 11. Conclusiones

El extracto acuoso de arándano rojo induce una disminución significativa en las transaminasas hepáticas (ALT y AST), las cuales tienden a regresar a la normalidad, lo que indica, un potencial efecto preventivo, al evitar la hepatotoxicidad, en el modelo propuesto.

El extracto de arándano rojo protege el endotelio del colon, al presentarse menores lesiones en los animales que recibieron el extracto en comparación con el grupo control.

El extracto de arándano rojo produce una disminución tanto la secreción como la expresión de TNF- $\alpha$  e IL6.

El arándano rojo tiene un gran potencial para tratar enfermedades gastrointestinales inflamatorias.

## 12. Perspectivas

- Realizar estudios con diferentes dosis y tiempos de administración de extracto acuoso de arándano rojo, para determinar los mínimos necesarios para que exista un efecto protector de la mucosa intestinal.
- Investigar el efecto de extracto acuoso de arándano rojo en otras citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, estableciendo una cronicidad en la ingesta del extracto y de la CU.
- Investigar el potencial preventivo del arándano frente a la hepatotoxicidad.
- Investigar en pacientes con CU el efecto curativo del extracto acuoso de arándano rojo.
- Investigar el efecto del extracto de arándano rojo en otros órganos, sistemas y/o padecimientos.

## **13. Financiamiento y conflicto de intereses**

Los costos de la investigación fueron subvencionados por la Universidad Autónoma Metropolitana y algunos de ellos por los investigadores responsables.

Los investigadores responsables declaran que no existen conflictos de interés relacionados con esta investigación.

## 14. Referencias

- Améndola LM, Quiñónez MB, Muñoz I, Paredes R, Labrador C. Funcionalismo hepático en ratas Wistar tratadas con dosis terapéuticas de Nimesulide. Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel", 2011; 42 (2): 50-55
- Andus T, Gross V. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease-environmental factors. Hepatogastroenterology. 2000;47(31):29-43.
- Ballester, I. Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal. Ars Pharm, 2006; 47(1): 5-21
- Baumgart, DC, Carding, SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. Lancet 2007. 369, 1627-40.
- Böhm SK, Kruis W. Long-term efficacy and safety of once-daily mesalazine granules for the treatment of active ulcerative colitis. Clinical and Experimental Gastroenterology. 2014;7:369-383. doi:10.2147/CEG.S35691.
- Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. World J Gastroenterol 2006; 12(30): 4807-4812
- Danese, S, Fiocchi, C. Ulcerative colitis. N Engl J Med 2011. 365, 1713-25.
- DSM Nutritional Products Europe Ltd, Human Nutrition & Health, 2009. <http://www.nutri-facts.org/esp/tema-del-mes/detail/backPid/860/article/micronutrients-and-inflammatory-diseases/#c7547>.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. Gastroenterology. 1998;115(1):182-205.

- Fonseca-Camarillo GC, Villeda-Ramírez MA, Sánchez-Muñoz F, Barreto-Zúñiga R, Domínguez-López A, Uribe-Esquivel M, Yamamoto-Furusho JK. Expresión del gen de IL6 y TNF- $\alpha$  en la mucosa rectal de pacientes con colitis ulcerativa crónica idiopática y controles Rev Gastroenterol Mex, 2009;74(4).
- Ford Alexander C, Moayyedi Paul, Hanauer Steven B. Ulcerative colitis BMJ 2013; 346 :f432
- García B. Pedro. Inflamación, IX Programa de promoción de la cultura científica y tecnológica. Rev R Acad Cien Exact Fis Nat (Esp), 2008; 102(1), 91-159.
- Garrido A, Martínez MJ, Ortega JA, Lobato A, Rodríguez MJ, Guerrero FJ. Estudio epidemiológico de la enfermedad inflamatoria intestinal en la zona norte de Huelva. Rev Esp Enferm Dig 2004; 96:687-694.
- Garzon, G. Anthocyanins As Natural Colorants And Bioactive Compounds: A Review. Acta Biol.Colomb. 2008; 13(3), 27-36. ISSN 0120-548X.
- Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated From an Italian Red Wine. J Agric Food Chem. 1998;46 (2),361-367.
- Giulia Roda, Margherita Marocchi, Alessandro Sartini, and Enrico Roda, "Cytokine Networks in Ulcerative Colitis," Ulcers, 2011. Article ID 391787, 5 pages. doi:10.1155/2011/391787
- Gomollón F, García-López S, Sicilia B, Gisbert JP, Hinojosa J. Guía clínica GETECCU del tratamiento de la colitis ulcerativa elaborada con la metodología GRADE. Gastroenterol Hepatol. 2013; 36(8):e1-e47

- Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología (WGO). Enfermedad intestinal inflamatoria. 2015
- Hematología basal y valores de hematología clínica de ratas Charles River Wistar (CRL:(W)BR) en función de sexo y edad. Charles River Techn. Bull. 1982; 1(2).
- Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson J, Lee J, Beaugierie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew C, Lennard-Jones J, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. Nature 1996; 379: 821-5.
- Khor, B, Gardet, A, Xavier, RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature 2011. 474, 307-17.
- Ko JK, Lam FY, Cheung AP. Amelioration of experimental colitis by Astragalus membranaceus through anti-oxidation and inhibition of adhesion molecule synthesis. World J Gastroenterol 2005; 11: 5787-5794
- Laroux FS, Pavlick KP, Wolf RE, Grisham MB. Dysregulation of intestinal mucosal immunity: implications in inflammatory bowel disease. News Physiol Sci. 2001;16:272-7.
- Liu LN, Mei QB, Liu L, Zhang F, Liu ZG, Wang ZP, Wang RT. Protective effects of Rheum tanguticum polysaccharide against hydrogen peroxide-induced intestinal epithelial cell injury. World J Gastroenterol 2005; 11: 1503-1507

- Liu SP, Dong WG, Wu DF, Luo HS, Yu JP. Protective effect of angelica sinensis polysaccharide on experimental immunological colon injury in rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2786-2790
- Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504-17.
- Marjoram L, Alvers A, Deerhake ME, Bagwell J, Mankiewicz J, Cocchiaro JL, Beerman RW, Willer J, Sumigray KD, Katsanis N, Tobin DM, Rawls JF, Goll MG, Bagnat M. Epigenetic control of intestinal barrier function and inflammation in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 3; 112(9): 2770–2775.
- Martínez-Montiel, M., Casis-Herce, B., Gómez-Gómez, G., Masedo-González, A., Yela-San Bernardino, C., Piedracoba, C., Castellano-Tortajada, G. Pharmacologic therapy for inflammatory bowel disease refractory to steroids. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 2015-8, 257–269.
- McDougall GJ, Stewart D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors* 2005-23, 189-195.
- Mercado-Mercado G, López JA, Wall-Medrano A, de la Rosa L, Álvarez-Parrilla E, Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria* 2013, 2836-46.
- Mi JK, Jeong O, Jung HK, Ho-KK. Effects of freeze-dried cranberry powder on serum lipids and inflammatory markers in lipopolysaccharide treated rats fed an atherogenic diet. *Nutr Res Pract* 2011;5(5):404-411.

- Mi Joung K, Jeong O, Jung Hee K and Ho-Kyung K. Effects of freeze-dried cranberry powder on serum lipids and inflammatory markers in lipopolysaccharide treated rats fed an atherogenic diet. *Nutrition Research and Practice (Nutr Res Pract)* 2011;5(5):404-411
- Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K. Direct Intestinal Absorption of Red Fruit Anthocyanins, Cyanidin-3-Glucoside and Cyanidin-3,5-Diglucoside, Into Rats and Humans. *J Agric Food Chem.* 1999;47(3):1083-1091.
- Möller R, Vázquez N, Teliz D, Méndez V. Digestive Peritoneum in Wistar Rat (*Rattus norvegicus*). *Int. J. Morphol.* [Internet]. 2013 Mar; 31(1): 128-130.
- Moura FA, de Andrade KQ, dos Santos JCF, Araújo ORP, Goulart MOF. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? *Redox Biology.* 2015;6:617-639. doi:10.1016/j.redox.2015.10.006.
- Nielsen OH. New Strategies for Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Medicine.* 2014;1:3. doi:10.3389/fmed.2014.00003.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1- 2002 Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
- Oliva-Hemker M, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: the importance of the pediatric perspective. *Inflamm Bowel Dis.* 2002;8 (2):112-28.



- Peña MS. Tesis doctoral “Estudio de la calidad de vida en pacientes ambulatorios con enfermedad inflamatoria intestinal, tipo colitis ulcerativa idiopática”. Universidad de Granada, Facultad de Medicina, Departamento de Medicina. España, 2006.
- Piberger H, Oehme A, Hofmann C, Dreiseitel A, Sand PG, Obermeier F, Rogler G. Bilberries and their anthocyanins ameliorate experimental colitis. *Molecular nutrition & food research*, 2011-55(11), 1724-1729.
- Prenzel F, Uhlig HH. Frequency of indeterminate colitis in children and adults with IBD—a metaanalysis. *Journal of Crohn's and Colitis* Dec 2009, 3 (4) 277-281; DOI: 10.1016/j.crohns.2009.07.001.
- Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAEP. 2ª Edición, 2010.
- Roda G, Marocchi M, Sartini A, Roda. Cytokine Networks in Ulcerative Colitis. *Ulcers*. 2011, Article ID 391787, doi:10.1155/2011/391787
- Rodríguez-Leal GA. Enfermedad inflamatoria intestinal: Epidemiología y patogénesis. *Med Sur* 2001: 8(3).
- Russel MG, Stockbrügger RW. Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update. *Scand J Gastroenterol*. 1996 May; 31(5): 417–27.
- Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, 1959. Reprinted by UFAW, 1992:8 Hamilton Close, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QD England. ISBN 0 900767 782

- Sales-Campos H, Basso PJ, Alves VBF, Fonseca MT, Bonfá G, Nardini V, Cardoso CR. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Braz J Med Biol Res.* 2015 Feb;48(2):96-107.
- Sandoval GE, Bosques PF. Enfermedad Inflamatoria Intestinal: realidad en México. *Rev Gastroenterol Mex* 2008;73(2):38-42
- Sepúlveda SE, Beltrán CJ, Peralta A, Rivas P, Rojas N, Figueroa C, Quera R, Hermoso MA. Enfermedad inflamatoria intestinal: Una mirada inmunológica *Rev Méd Chile* 2008; 136: 367-375
- Shanahan F, Bernstein CN. The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25:301-305.
- Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: Is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996; 39:690-697.
- Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. Battino M, ed. *International Journal of Molecular Sciences.* 2015;16(10):24673-24706. doi:10.3390/ijms161024673.
- Soriano I, Antonio. Moléculas de adhesión endotelial: nuevas dianas terapéuticas en la enfermedad inflamatoria intestinal. Tesis doctoral, Univ Barcelona, 2004

- Torres MI, Rios A. Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World J Gastroenterol* 2008;14:1972-1980.
- Uberos J, Narbona-López E, Tortosa-Pinto P, Ruíz-López A, Segura-Carretero A, Muñoz-Hoyos A. Efecto de una formulación de cranberry pediátrica sobre la adherencia de *E. coli*. *Bol. SPAO* 2012; 6(1).
- Yamamoto J; Bosques F; Gastrotrilogía V “Rompiendo paradigmas en el diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal” Asociación Mexicana de Gastroenterología, A.C. 2015.
- Yamamoto-Furusho JK, Rodríguez-Bores L, González-Contreras QH, Martínez-Benítez B. Prevalence and clinical features of indeterminate colitis in Mexico: a 17-year study. *Rev Gastroenterol Mex* 2010;75, 1
- Yamamoto-Furusho JK. Clinical epidemiology of ulcerative colitis in Mexico. A single hospital-based study in a 20 year period (1987-2006). *J Clin Gastroenterol* 2009;43:221-4.
- Zafriri D, Ofek I, Adar R, Pocino M, Sharon N. Inhibitory activity of cranberry juice on adherence of type 1 and type P fimbriated *Escherichia coli* to eucaryotic cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1989; 33(1), 92-98.
- Zenlea T, Peppercorn MA. Immunosuppressive therapies for inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014; 20(12):3146-3152. doi:10.3748/wjg.v20.i12.3146.

## 15. Anexo

### 15.1 Mecanismo de acción de los flavonoides y de la indometacina.

El daño celular asociado a la inflamación actúa en las membranas celulares produciendo liberación de enzimas lisosómicas en los leucocitos. Posteriormente se produce la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana mediante las lipasas del tipo fosfolipasa A2, estas son inhibidas por los antiinflamatorios esteroideos (Batlouni, 2010).

Este ácido araquidónico es fundamental para la síntesis de varios eicosanoides que participan directamente en el proceso inflamatorio. En esta parte la respuesta inflamatoria se divide en dos vías (Batlouni, 2010):

#### 1. Vía de la lipoxigenasa

El metabolismo del ácido araquidónico por las lipoxigenasas (principalmente la 5-Lipoxigenasa) da como resultado la producción de ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETES), los cuales rápidamente se convierten en derivados hidróxidos (HETES) y leucotrienos.

La 5-Lipoxigenasa está presente en las células inflamatorias (PMN, mastocitos, basófilos, macrófagos y eosinófilos). Esta enzima produce el leucotrieno A4 que se convierte en leucotrieno B4 o leucotrieno C4. Este a su vez puede convertirse en LTD4 y LTE4, mediante peptidasas.

Esta vía es inhibida por los flavonoides contenidos en el arándano rojo (Martínez-Flores, 2002).

De la misma forma, La producción de macrófagos de citoquinas pro-inflamatorias incluyendo IL-6 y TNF- $\alpha$  son inhibidos por la fracción de antocianinas y proantocianidina altamente concentrada de un extracto de arándano, lo que sugiere que los flavonoides inhiben la producción de citocinas inflamatorias tales como IL-6 y TNF- $\alpha$  actuando como inhibidores de la expresión génica y la producción de citoquinas pro-inflamatorias suprimiendo la activación de factores de transcripción tales como NF-KB y NF-KB / ADN vinculante (factor potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) (Bodet, 2006; Park, 2008; Reed, 2002)

## 2. Vía de la Cicloxigenasa

Solo se han descubierto dos isoenzimas de la cicloxigenasa que son capaces de convertir el ácido araquidónico en prostaglandinas: La PGH sintetasa 1 (llamada COX-I) y la PGH sintetasa 2 (llamada COX-II). La primera se encuentra constantemente en los tejidos mientras que la segunda puede ser inducida.

La COX-I tiene funciones de mantenimiento principalmente, mientras que la COX-II se produce tempranamente y de forma masiva por las células inflamatorias e inmunes y su producción se aumenta por factores de crecimiento, promotores tumorales, citocinas y especialmente por endotoxinas bacterianas.

El conocimiento de estas isoenzimas es importante para el manejo farmacológico de la inflamación con agentes no esteroideos, ya que ellos actúan precisamente inhibiéndolas, tal es el caso de la indometacina.

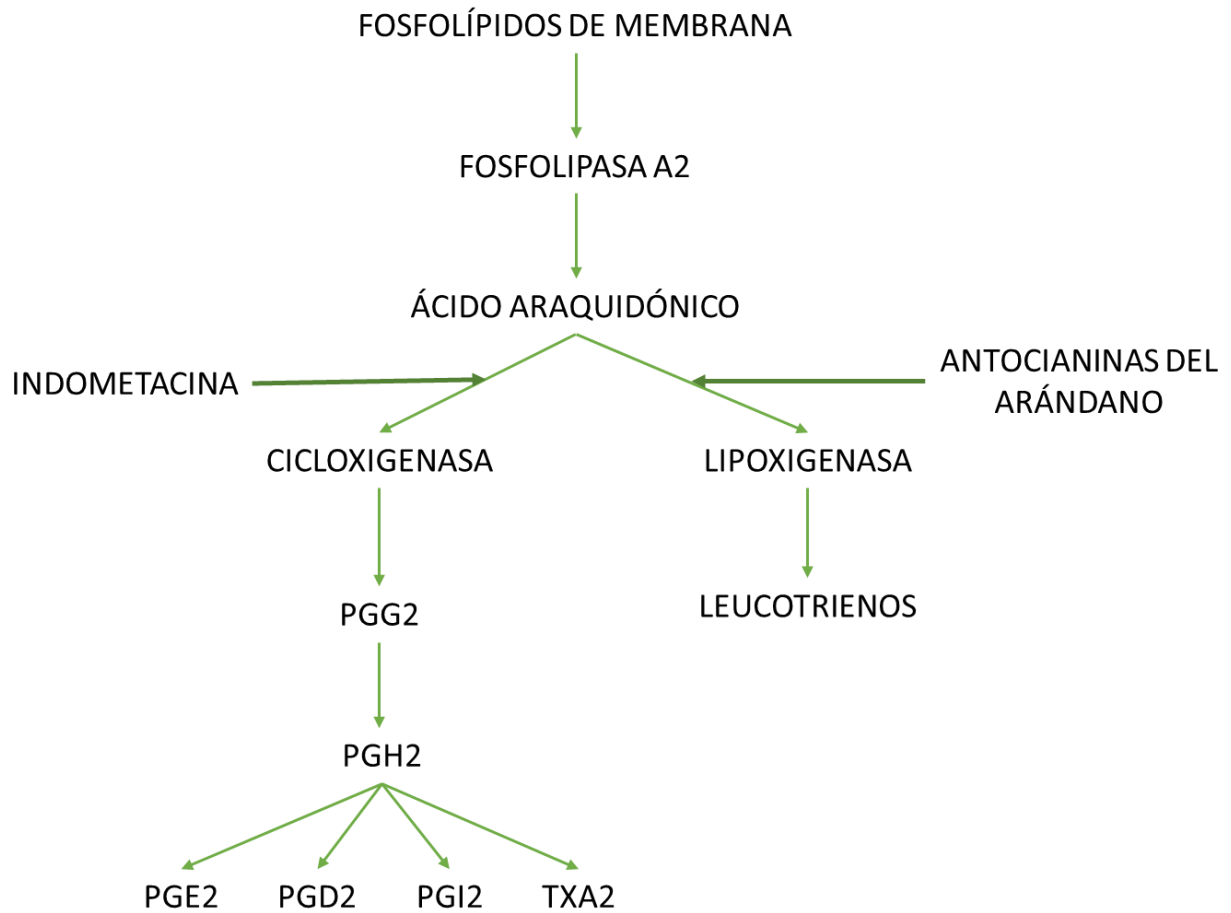


Figura 5. Respuesta inflamatoria a partir del ácido araquidónico.

## 15.2 Mecanismo de la colitis ulcerativa inducida por ácido acético

La necrosis del epitelio o de la mucosa y la inflamación transitoria pueden ser inducidas con una solución de ácido acético diluido aplicado en el lumen intestinal. Se debe tener en cuenta que, la lesión epitelial es una reacción relativamente específica a los ácidos orgánicos porque el ácido clorhídrico a pH similar no induce una lesión parecida (Almero, 2007).

En la descripción original del modelo empleado, 0.5 ml de ácido acético diluido con agua al 10% -50% se aplicó en el recto de ratas Sprague-Dawley. Después de 10 segundos de contacto superficial, se retiró la solución ácida y se purgó el lumen tres veces con 0.5 ml de solución salina. En las modificaciones recientes, se aplica lentamente 1 ml de ácido acético al 4% (pH 2,3) a una distancia de 5 cm en el lumen rectal de una rata ligeramente anestesiada (Elson, 1995).

En el presente trabajo se empleó de la siguiente forma: Los días 30, 32 y 34, bajo sedación ligera con 0.80 ml vía subcutánea de fenobarbital en dilución 1:10, se administró a todos los grupos 1 ml de ácido acético al 5% vía intrarectal, después de 30 segundos de exposición a la solución, se retira el líquido y se enjuaga el colon con 1.5 ml de solución salina y fosfato, como búfer y dilución del ácido acético restante en el colon.

Debido a la variación en la capacidad de las ratas para retener enemas, se pueden emplear diluciones de ácido acético de 4% al 12% aplicados en el lumen del colon ascendente de ratas anestesiadas. La mayoría de los estudios usan exposiciones de 15-30 segundos al ácido acético a 4% o 5% debido a que concentraciones más altas frecuentemente ocasionan perforaciones de la pared del colon (Elson, 1995).

La lesión inicial es una necrosis epitelial relativamente ligera y edema que se extiende de forma variable dentro de la lámina propia, submucosa o capas musculares externas, dependiendo de la concentración y duración de la exposición del ácido acético, provocando a su vez una isquemia local transitoria puede contribuir a la lesión aguda. La inflamación mucosa y submucosa que sigue a la lesión inicial de las células epiteliales se asocia con la activación de las vías del ácido araquidónico. La respuesta inflamatoria parece ser una secuela inespecífica de la pérdida de la barrera epitelial y se cura en pocos días en ratones o en 2-3 semanas en ratas (Almero, 2007; Elson, 1995).

La evidencia de que los productos bacterianos luminales están implicados en la fase inflamatoria secundaria se proporciona mediante la potenciación de la inflamación por los polímeros del polipéptido luminal peptidoglicano (PG-PS) y la mayor captación de PG-PS y péptidos quimiotácticos bacterianos después de la lesión de la mucosa (Almero, 2007; Elson, 1995).



Las ventajas de la lesión inducida por ácido acético son su bajo costo, facilidad de administración y disponibilidad generalizada. Por lo tanto, este modelo fácilmente inducible puede ser útil en la selección inicial de nuevos fármacos, evaluando mecanismos de cicatrización de la mucosa y determinando el papel de los factores luminales en la perpetuación de la inflamación intestinal inespecífica. Debido a que la lesión epitelial aguda en las primeras 24 horas es de naturaleza no inmunológica, los ensayos de terapia con fármacos deben concentrarse en puntos de tiempo posteriores (Almero, 2007; Elson, 1995).

### 15.3 Referencias

- Batlouni, M. Antiinflamatorios no esteroides: efectos cardiovasculares, cerebrovasculares y renales. *Arq Bras Cardiol.* 2010, 94(4), 556-563.
- Martínez-Flores S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 2002, XVII (6) 271-278.
- Ballester I, Camuesco D, Gálvez J, Sánchez de Medina F, Zarzuelo A. Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal *Ars Pharm* 2006; 47 (1): 5-21.
- Elson CH O, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;109:1344-1367.
- Almero JM. Modelos experimentales in vivo de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal. Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad. *Nutr Hosp.* 2007;22(2):178-89.
- Park HH, Lee S, Son HY, Park SB, Kim MS, Choi EJ, Singh TS, Ha JH, Lee MG, Kim JE, Hyun MC, Kwon TK, Kim YH, Kim SH. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch Pharm Res* 2008; 31:1303-11.
- Miller MJS, Zharg XJ, Gux, Sadowski-Kiowicka H, Chotinasuemel S, Mantyre JS, Clark DA, Bustamante SA. Nitric- oxide release in response to gut injury. *Scand J Gastroenterol.* 1993;28:149-154.
- Reed J. Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2002;42:301-16.