

SECCIÓN ARTÍCULOS TÉCNICOS

Modelo experimental para evaluar compuestos gastroprotectores en ratones sometidos a estrés y tratados con indometacina
Toso, F.; Ardoino, S.M.; Hartfiel, L.E. y Benitez, V.P.
Pp. 28-34

Modelo experimental para evaluar compuestos gastroprotectores en ratones sometidos a estrés y tratados con indometacina

Toso, F.¹; Ardoino, S.M.¹; Hartfiel, L.E.¹ y Benitez, V.P.¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF). Calle 5 esquina 116, General Pico (6360) La Pampa. Calle 116 y 5. ftoso@vet.unlpam.edu.ar

RESUMEN

Se describe un modelo experimental para evaluar el efecto gastroprotector de extractos vegetales en ratones sometidos a estrés y administrados con antiinflamatorios no esteroides (AINEs). Este modelo experimental reproduce casos clínicos en los cuales los animales que sufren estrés por dolor durante procesos inflamatorios, traumáticos o quirúrgicos desarrollan lesiones gástricas que se agravan cuando son medicados con AINEs con el objetivo de disminuir la inflamación y el dolor. Frecuentemente se administran antisecretores para prevenir las lesiones en la mucosa gástrica. Para investigar nuevos fármacos gastroprotectores, con mayor eficacia y menores efectos colaterales en estos casos clínicos, se requiere de un modelo experimental que lo reproduzca. Para lograr este objetivo, en este trabajo se describe un protocolo que combina dos reconocidos modelos experimentales en ratones. Uno de ellos induce úlceras por estrés provocado por hipotermia e inmovilización y el otro produce daño gástrico por administración de indometacina. La combinación de ambos métodos en un solo ensayo permite observar que los animales sometidos a estrés y tratados con indometacina sufren mayor daño gástrico que los sometidos a estrés o administrados con indometacina respectivamente. Considerando que los mecanismos involucrados en el daño gástrico producido por estrés son distintos a los provocados por AINEs, el protocolo propuesto es adecuado para seleccionar drogas que protejan la mucosa gástrica en animales que sufren estrés por dolor y que están siendo tratados con AINEs.

Palabras clave: Gastroprotector, AINEs, Antiulcerogénico, Modelo experimental Extractos Vegetales

Experimental model to evaluate gastroprotective compounds in mice subjected to stress and treated with indomethacin

ABSTRACT

An experimental model is described to evaluate the gastroprotective effect of plant extracts in mice subjected to stress and administered with non-steroidal anti-



inflammatory drugs (NSAIDs). This experimental model reproduces clinical cases in which animals that undergo pain stress during inflammatory, traumatic, or surgical processes develop gastric lesions that are aggravated when they are medicated with NSAIDs in order to reduce inflammation and pain. Antisecretors are frequently administered to prevent gastric mucosal injury. To investigate new gastroprotective drugs, with greater efficacy and fewer side effects in these clinical cases, an experimental model is required to reproduce it. To achieve this goal, this work describes a protocol that combines two well-known experimental models in mice. One of them induces stress ulcers caused by hypothermia and immobilization and the other produces gastric damage by administration of indomethacin. The combination of both methods in a single test makes it possible to observe that animals subjected to stress and treated with indomethacin suffer greater gastric damage than those subjected to stress or administered with indomethacin respectively. Considering that the mechanisms involved in gastric damage caused by stress are different from those caused by NSAIDs, the proposed protocol is adequate to select drugs that protect the gastric mucosa in animals that suffer stress due to pain and are being treated with NSAIDs.

Keywords: Gastroprotective, NSAIDs, Antiulcerogenic, Experimental model Vegetable extracts

INTRODUCCIÓN

Las situaciones de estrés, como las que ocurren en animales politraumatizados, intervenidos quirúrgicamente o que cursan enfermedades inflamatorias se asocian a ulceración y hemorragia gastroduodenal en un contexto patogénico que se agrava con la administración de antiinflamatorios no esteroides (AINEs).

El estrés y los AINEs, aunque por distintos mecanismos, debilitan la barrera mucosa gástrica permitiendo que el ácido lesione la mucosa. Estos cuadros han sido estudiados en humanos hospitalizados. En estos pacientes se aplican protocolos terapéuticos que incluyen la administración profiláctica de drogas antisecretoras para prevenir las úlceras por estrés y evitar hemorragias digestivas altas (Betancur Jiménez, 2004) al mismo tiempo que se están empleando AINEs para prevenir o tratar estados febriles, reducir la inflamación y para proporcionar analgesia (Toms et al., 2009).

La administración rutinaria de drogas antisecretoras es discutida en medicina humana (Villatoro Martínez et al., 2012), pero en medicina veterinaria se justifica por la dificultad que presenta diagnosticar lesiones gástricas que cursan como gastritis asintomáticas, que según algunos estudios llega a un 70 % de los casos (Hernández et al., 2007). Algunos efectos colaterales de estas drogas se expresan a largo plazo, mientras que otros, como por ejemplo las infecciones entéricas, son un riesgo a corto plazo (Landeira-Fernandez, 2004). Estos efectos indeseables fundamentan la investigación de alternativas terapéuticas de nuevos gastroprotectores y los ensayos con extractos vegetales son los más investigados.

Teniendo en cuenta lo expuesto, para evaluar la eficacia de nuevos compuestos con posibles efectos gastroprotectores en estos casos clínicos, se describe un novedoso protocolo que combina dos conocidos modelos experimentales en ratones. Uno de ellos induce úlceras por estrés (ME) provocado por hipotermia e inmovilización y el otro causa daño gástrico por administración de indometacina (MI). Los mecanismos fisiopatológicos que provocan estos modelos experimentales son diferentes, aunque finalmente ambos determinan un desequilibrio en la barrera mucosa gástrica. El ME, reduce la circulación sanguínea mucosal disminuyendo la producción de mucus y debilitando la barrera mucosa gástrica. Al mismo tiempo se produce un aumento de la motilidad gástrica que provoca la formación de múltiples úlceras que se ubican con preferencia en las crestas de los pliegues gástricos, más expuestas al efecto erosivo mecánico (Murakami et al., 1985). El desprendimiento de la barrera mucosa permite que el ácido y la pepsina ataquen la mucosa gástrica formando úlceras de distinta gravedad (Jacobson, 1992).

El modelo MI induce la formación de múltiples úlceras en los estómagos de ratas y ratones, con aspecto macroscópico similar a las que produce el modelo ME. Pero el debilitamiento de la barrera mucosa gástrica tiene su origen en el efecto inhibitorio de los AINEs sobre la síntesis de prostaglandinas (PG). Las PG producen un efecto citoprotector sobre la mucosa gástrica al aumentar, la secreción de mucus, la secreción de bicarbonato, el flujo sanguíneo y la restauración epitelial. Por lo tanto, la inhibición de PG altera los mecanismos de protección y permite que la pepsina y el ácido clorhídrico ataquen a la mucosa. La administración de indometacina en animales de experimentación también provoca un aumento de la motilidad gástrica produciendo un efecto erosivo mecánico. Este efecto determina la presencia de múltiples úlceras ubicadas en las crestas de los pliegues gástricos del mismo modo que las producidas por estrés (Takeuchi et al., 1999).

Es frecuente que junto con los AINEs se administren inhibidores de la secreción gástrica como antagonistas del receptor de la H₂ y de la bomba de protones, éstos producen una mejora al aumentar el pH gástrico retrasando la digestión y la formación de úlceras en la mucosa gástrica. Pero no aumentan los factores citoprotectores que contribuirían a prevenir el daño de la mucosa gástrica al reforzar la barrera mucosa gástrica (Betancur Jiménez, 2004).

El modelo de inducción de úlceras por estrés e indometacina (MEI) que se propone y describe en esta publicación, fue utilizado hace dos décadas en ensayos para evaluar el efecto gastroprotector de extractos vegetales obtenidos del Banco de Extractos Vegetales (BEV) en el Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa (Toso y Skliar, 2000). No se encontraron antecedentes de otros autores que hayan empleado el Modelo MEI. Sin embargo se debe mencionar que Toso y Skliar, (2000) asociaron ambos métodos con otros propósitos. En primer lugar, el objetivo fue demostrar que la asociación de los dos modelos lograba inducir mayor daño gástrico cuando se emplean al mismo tiempo, y en segundo lugar, obtener información sobre los posibles mecanismos de acción implicados en el efecto gastroprotector de los extractos

metanólicos y clorofórmicos obtenidos de *Centaurea solstitialis*. Es decir, para determinar si éstos mecanismos gastroprotectores estaban asociados o no a las prostaglandinas. En estos trabajos iniciales, los autores concluyeron que algunos extractos mostraban distinta eficacia para prevenir la formación de úlceras gástricas, dependiendo si eran desafiados empleando el método ME o MI. En ese momento, no se pensó que el Modelo MEI podría emplearse para probar nuevas drogas, más eficaces y con menores efectos colaterales que inhiban o atenúen el daño gástrico provocado por el estrés en animales que sufren dolor traumático y que se los administra con AINES para controlar la inflamación, el dolor y la fiebre.

Los numerosos ensayos realizados en el CIDEF han permitido desarrollar un protocolo confiable que se describe en este trabajo con el objetivo de ponerlo a disposición de otros investigadores. Cabe destacar que los estudios mencionados fueron previamente evaluados por el Comité Científico, en algunos casos y por el CICUAL de la FCV - UNLPam, en otros. Con lo cual queda explícito que los animales involucrados en estos ensayos fueron tratados bajo protocolos avalados por estos organismos. En este Centro de Investigación se estudian las propiedades farmacológicas de extractos vegetales obtenidos de plantas nativas y naturalizadas recolectadas en la Provincia de La Pampa. Aunque el protocolo mencione como drogas a ensayar a extractos vegetales de administración oral, el protocolo, eventualmente, puede ser utilizado para probar otras drogas de origen sintético o semisintético que se administren por ésta u otra vía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Protocolo

Extractos vegetales: considerando que el objetivo de esta publicación es describir el método MEI se omitirán los detalles de la preparación y dosis empleadas de los extractos, los cuales han sido descriptos por Steibel et al. (2007).

Los extractos se diluyen hasta un volumen de 0,5 ml con una solución de Carboximetilcelulosa (Ex) y se administran con ayuda de una sonda gástrica.

Animales de experimentación: se utilizan ratones *Mus musculus* de 28 - 30 g de peso de ambos sexos. Los animales se aclimatan durante 3 días con períodos de luz y oscuridad de 12 h disponiendo de alimento y agua *ad libitum*. 12 h previas al ensayo, los animales se trasladan a jaulas provistas de rejillas para evitar la coprofagia y se someten a ayuno de alimentos sólidos con libre acceso al agua.

Modelo Experimental: para ensayar un solo extracto se utiliza el procedimiento siguiente, aunque pueden agregarse en el mismo ensayo tantos Grupos Tratados como extractos u otras drogas se deseen probar.

Se forman al azar cuatro grupos de cinco ratones cada uno. El Grupo Control (GCEx) se administra con una dosis de 0,5 ml del excipiente (Ex) empleado para diluir el extracto por vía oral (VO) con ayuda de una sonda gástrica, el Grupo Control tratado con indometacina (GCI) se administra con una dosis de 5 mg/kg de indometacina vía subcutánea (SC) disuelta en un volumen total de 0,2 ml con una solución de bicarbonato de sodio al 4 % (IEx), el Grupo Tratado con el Extracto Vegetal (GTE) recibe una dosis VO de 0,5 ml del Extracto a ensayar disuelto hasta un volumen de 0,5 ml con el Ex y el Grupo

Tratado con el Extracto más indometacina (GTEI) una dosis SC de 0,2 ml de indometacina y una dosis VO de 0,5 ml de Extracto.

La administración SC de indometacina y del excipiente empleado para diluirla en los grupos que corresponda, se realiza al iniciar el ensayo y transcurridos 30 minutos se procede a realizar el resto del esquema de administración VO como se indica en el Cuadro 1. Todos los grupos son sometidos a estrés utilizando el modelo MEI.

Cuadro 1: Esquema de administración de drogas utilizado en el Método MEI

Drogas Grupos	Indometacina	Excipiente empleado para diluir la indometacina	Extracto vegetal	Excipiente empleado para diluir los extractos
GCEx		0		X
GCI	0			X
GTE		0	X	
GTEI	0		X	

Ref.: Las drogas marcadas con "0" fueron administradas vía SC al inicio del ensayo, las marcadas con "X" se administraron VO transcurridos 30 minutos después. GCEx: Grupo control administrado con el excipiente utilizado para diluir el Extracto vegetal (Ex) y con el excipiente empleado para diluir la indometacina (IEx). GCI: Grupo Control Indometacina administrado VO con el Ex y vía SC con idometacina. GTE: Grupo tratado con el Extracto administrado vía SC con el IEx y VO con el Extracto. GTEI; Grupo Tratado con Indometacina vía SC y VO con el extracto.

Inmediatamente después de completar el esquema de administración de drogas, todos los grupos de ratones se someten a estrés por hipotermia e inmovilización (Toso y Skliar, 2000). Los animales se colocan en jaulas de inmovilización y se sumergen en agua hasta el cartílago xifoides. La temperatura del agua debe regularse a $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 4,5 h. Los ratones se sacrifican con CO₂, se extraen los estómagos e insuflan con solución fisiológica y se colocan en formol al 10 % durante 2 h. Los estómagos se abren por la curvatura mayor, se lavan cuidadosamente y fotografían para medir las úlceras gástricas.

RESULTADOS

Teniendo en cuenta que este artículo consiste en la descripción de un modelo experimental, no se presenta resultados, sino la forma de obtenerlos y cómo evaluarlos. *Registro y análisis de datos:* el daño gástrico se mide utilizando el programa de manejo de imágenes Scion Image Software (accesible en http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm). El analizador de imágenes permite circundar las úlceras gástricas convirtiendo píxeles en mm para obtener el área de las úlceras de cada estómago en mm². El porcentaje de inhibición de úlceras en los Grupos Tratados se calculó utilizando la fórmula $[(\text{AUGrupo Control o Testigo} - \text{AUGrupo Tratado}) / \text{AUGrupo Control o Testigo}] \times 100$ donde AU es el Área Ulcerada expresada en mm².

Evaluación de resultados

Para evaluar los resultados utilizando el modelo MEI, se compara el GCEX con respecto al GCI y el GCI con respecto al GCE y al GCEI. Para comparar los diferentes grupos se utilizó la prueba ANOVA y el Test Tukey para las comparaciones entre grupos considerando significativo un $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

El modelo MEI descrito en este trabajo emplea al mismo tiempo dos métodos conocidos para inducir úlceras. El propósito es reproducir los efectos de los procesos fisiopatológicos que inducen daño gástrico en situaciones de estrés, efecto que se muestra agravado en cuadros clínicos que requieren la administración de AINEs para tratar la inflamación, el dolor y la fiebre (Betancur Jiménez, 2004; Toms, et al., 2009). En el modelo MEI propuesto se emplean dos grupos control de ratones, GCEX y GCI, para comprobar que efectivamente se indujo daño gástrico por estrés en el modelo ME y por acción de la indometacina en el modelo MI respectivamente. Si el modelo funcionó bien, debe esperarse que el GEI muestre mayor área ulcerada que cualquiera de los GCEX y GCI respectivamente. El mayor daño de la mucosa, que se estima por el área ulcerada de cada grupo, se debe a que los ratones previamente administrados con indometacina, como consecuencia de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, tienen disminuidos los factores citoprotectores. A esta condición se le suman los efectos del estrés que también disminuyen la secreción de mucus y bicarbonato. El aumento de la motilidad gástrica, presente en ambos modelos (Murakami et al., 1985; Takeuchi et al., 1999) ejerce un efecto erosivo desprendiendo la barrera mucosa mostrando mayor número de úlceras, las cuales también pueden tener mayor tamaño. Esta observación macroscópica puede comprobarse estadísticamente comparando las áreas ulceradas de los GCEX con respecto al GCI. Se espera que el GCI tenga un área ulcerada significativamente mayor que el GCEX.

Al comparar el GCI con respecto al GCE y al GCEI permite evaluar la eficacia de drogas gastroprotectoras en úlceras producidas en animales sometidos a estrés y también en animales sometidos a estrés y administrados con AINEs. De esta manera es posible obtener datos preliminares sobre los posibles mecanismos de acción implicados en la gastroprotección. Trabajos recientes llevados a cabo en el CIDEF empleando el Modelo MEI permitieron identificar especies vegetales con efecto inhibitorio sobre la formación de úlceras con el método ME, mientras que no evidenciaron eficacia en el método MI y viceversa. Esto llevó a pensar que algunos extractos necesitan la presencia de PG para actuar, mientras que otros, ejercerían un efecto protector directo sobre la mucosa gástrica o inhibiendo la motilidad y evitando el efecto erosivo mecánico (Toso, et al., 2019; Toso, et al., 2020).

CONCLUSIONES

Considerando que los mecanismos fisiopatológicos que inducen las lesiones gástricas en ambos modelos son distintos, la combinación de los dos métodos, permite en un solo ensayo evaluar el potencial uso de extractos vegetales, o eventualmente de otras

drogas, en cuadros clínicos que cursan animales sometidos a estrés y tratados con AINEs.

El modelo MEI permite obtener datos preliminares sobre los posibles mecanismos de acción implicados en la gastroprotección.

El modelo MEI reduce el número de animales de experimentación, el tiempo de los ensayos y los costos operativos. Permitiendo evaluar varias drogas al mismo tiempo en un solo ensayo.

BIBLIOGRAFIA

- Betancur Jiménez, J. (2004). *Profilaxis de sangrado digestivo*. Revisión bibliográfica. Rev Colomb Cir. 19 (3): 168-173
- Hernández C.A., Gallón G., Restrepo L.F. (2007). *Análisis de biopsias gástricas endoscópicas en caninos*. Rev Col Cienc Pec. 20:250-259
- Jacobson, E.D. (1992). *Circulatory mechanisms of gastric mucosal damage and protection*. *Gastroenterology*. 102: 1788 - 1800
- Ladeira-Fernandez J. (2004). *Analysis of the cold-water restraint procedure in gastric ulceration and body temperatura*. *Physiology & Behavior* 82: 827-833
- Murakami, M.; Lam, S.K.; Inada, M. (1985). *Pathophysiology and pathogenesis of acute gastric mucosal lesions after hypothermic restraint stress in rats*. *Gastroenterology*. 88: 660 - 665
- Steibel, P.E.; Troini, H.O.; Oriani, D.S.; Ardoino, S.M.; Toribio, M.S.; Boeris, M.A.; Toso, R.E. (2007). *Banco de extractos vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de la pampa*. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas Vol. 6 (5)
- Takeuchi, K.; Suzuki, K.; Araki, H.; Mizoguchi, H.; Sugamoto, S. (1999). *Roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide in gastroduodenal ulcerogenic responses induced in rats by hypothermic stress*. *J. Physiol*. 93: 423 - 431
- Toms, L.; Derry, S.; Moore, R.A.; McQuay, H.J. (2009). *Single dose oral paracetamol (acetaminophen) with codeine for postoperative pain in adults*. *Cochrane Database Syst Rev*. doi: 10.1002/14651858.CD001547.pub2
- Toso, F.; Toso, R.E.; Lara, M.L.; Marrón, Y.M.; Mondino, M.A. (2019). *Actividad gastroprotectora de Equisetum giganteum L. n.v. cola de caballo y Cortaderia selloana (Schult & Schult. f.) n.v. cortadera en ratones sometidos a estrés e indometacina*. *Ciencia Veterinaria* 21 (1): 43 : 52
- Toso, F.; Ardoino, S.M.; Harfiel, L.E.; Herpsommer, M.E.; Alvarez, H.L.; Benitez, V.P.; Toso, R.E. (2020). *Evaluación de la actividad antiulcerogénica de Atriplex undulata D. Dietr. sobre estómagos de ratones bajo estrés y administrados con indometacina*. Vol. 22, Núm. 1: 13 : 22
- Toso, R.E.; Skliar M.I. (2000). *Efecto de la indometacina sobre la citoprotección de extractos de Centaurea solstitialis contra úlceras gástricas inducidas por estrés en ratones*. *Ciencia Veterinaria* Vol 2 (1): 16 - 20
- Villatoro Martínez, A.; Carrasco Nieva, M.; Mactzil Sánchez García, T. (2012). *Uso inapropiado de la terapia antisecretora gástrica en Urgencias*. *Archivos de Medicina de Urgencia de México*. 4 (1): 6-12