



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“ESTUDIO BIODIRIGIDO DE LA ACTIVIDAD
GASTROPROTECTORA DE *Croton reflexifolius*: PAPEL DEL
ÓXIDO NÍTRICO, PROSTAGLANDINAS Y GRUPOS
SULFHIDRILOS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A:
ANABEL ARIANA BECERRA GARCÍA



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes cc Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

BECERRA GARCÍA ANABEL ARIANA

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Estudio biodirigido de la actividad gastroprotectora de *Croton reflexifolius*: papel del óxido nítrico, prostaglandinas y grupos sulfhidrilos en el mecanismo de acción.**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	DR. BENITO REYES TREJO
VOCAL*	DR. JESÚS ARRIETA VALENCIA
SECRETARIO	Q. MARTHA TRINIDAD J. OLIVEROS GARCÍA
SUPLENTE	DRA. LETICIA CRUZ ANTONIO
SUPLENTE	DRA. MA. TERESA GRISELDA FUENTES LARA

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a, 18 de noviembre de 2008.

DRA. MARTHA ASUNCIÓN SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
JEFA DE LA CARRERA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

PARA MIS PAPÁS

JOEL Y ERNESTINA

Quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo: amor. Quienes sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme. Quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho. A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo.

A MIS HERMANOS

JOSÉ ANTONIO Y JOEL

Quienes me han acompañado a lo largo de toda mi vida, por escucharme y ayudarme en mis gritos de auxilio, dándome fuerza y serenidad en aquellos momentos en que tenía ganas de tirar la toalla...

Gracias por su constante apoyo, compañía y paciencia.

Gracias a aquellas personas que de una u otra forma han pasado en mi vida dejando su huella, por que me han ayudado a crecer.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. **Jesús Arrieta Valencia** por compartirme su conocimiento y experiencia durante el desarrollo de este trabajo, por su apoyo incondicional en todo momento y principalmente por su amistad.

A la Dra. **María Elena Sánchez Mendoza** por sus acertados comentarios y consejos que fueron de suma importancia para concluir mi tesis, además de brindarme su amistad.

Al Dr. **Benito Reyes Trejo** por amistad y enseñanzas que adquirí en su laboratorio.

Gracias a mis **compañeros** y **amigos** de estudios, con los quienes intercambie algunas de mis ideas.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. FUNDAMENTO TEÓRICO	2
2.1. Úlcera gástrica	2
2.2. Patogénesis	2
2.2.1. Secreción de ácido.....	3
2.2.2. Barrera de moco-bicarbonato.....	3
2.2.3. Factores genéticos	4
2.2.4. Radicales libres	5
2.3. Etiología	5
2.3.1. Fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's).....	5
2.3.2. Infección por <i>Helicobacter pylori</i>	6
2.3.3. Consumo de tabaco.....	6
2.3.4. Estrés	7
2.3.5. Causas secundarias	7
2.4. Sintomatología	7
2.5. Úlcera péptica en México	8
2.6. Tratamientos	8
2.6.1. Antiácidos	9
2.6.2. Antisecretores.....	10
2.6.2.1. Antagonista de los receptores para histamina tipo H ₂	10
2.6.2.2. Antimuscarínicos	11

2.6.2.3. Inhibidores de la bomba de protones	11
2.6.2.4. Bloqueadores de los receptores para la gastrina.....	12
2.6.3. Citoprotectores	12
2.6.3.1. Mecanismo de citoprotección.....	14
2.6.3.2. Factores funcionales	14
2.6.3.3. Factores humorales	17
2.6.3.4. Factores neuronales	20
2.6.4. Fármacos citoprotectores	20
2.6.4.1. Sulfacrato	21
2.6.4.2. Sales de bismuto	21
2.6.4.3. Carbenoxolona.....	21
2.6.5. Mecanismo de defensa de la mucosa gástrica independiente de prostaglandinas	22
2.6.5.1. Grupos sulfhidrilo.....	22
2.6.5.2. Factor de crecimiento epidérmico	22
2.6.5.3. Sulglicòtido	23
III. PLANTAS MEDICINALES CON ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA	23
3.1. Estudios de plantas mexicanas con actividad gastroprotectora	24
3.1.1. <i>Hippocrate excelsa</i>	25
3.1.2. <i>Amphiterygium adstringens</i>	25
3.1.3. <i>Croton</i>	25
3.1.3.1. Especies de <i>Croton</i> con actividad gastrointestinal	26

IV. METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA.....	27
4.1. Flavonoides.....	27
4.2. Saponinas.....	29
4.3. Taninos	29
4.4. Gomas y mucílagos	30
4.5. Alcaloides	30
4.6. Aceites	30
4.7. Triterpenoides	31
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
VI. HIPÓTESIS	33
VII. OBJETIVOS	34
7.1. Objetivo general.....	34
7.2. Objetivos específicos.....	34
VIII. METODOLOGÍA	35
8.1. Material vegetal	35
8.2. Aparatos.....	35
8.3. Extracción y fraccionamiento de las hojas de <i>C. reflexifolius</i>	35
8.4. Datos fitoquímicos	36
8.5. Animales.....	38
8.6. Fármacos y dosificación	38
8.7. Lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto	39

8.8. Lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con indometacina	39
8.9. Lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con L-NAME	40
8.10. Lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con NEM.....	42
8.11. Análisis Estadístico	42
IX. RESULTADOS	44
9.1. Efecto de la indometacina, L-NAME y NEM en la actividad gastroprotectora. .	46
X. DISCUSIÓN.....	53
10.1. Determinación de la participación del óxido nítrico en el efecto gastroprotector del ácido poliáltico.....	55
10.2. Determinación de la participación de las prostaglandinas en el efecto gastroprotector del ácido poliáltico.....	55
10.3. Determinación de la participación de los grupos sulfhidrilo en el efecto gastroprotector del ácido poliáltico.....	56
XI. CONCLUSIONES	57
XII. PERSPECTIVAS	58
XIII. BIBLIOGRAFÍA	59
XIV. ANEXOS.....	69

RESUMEN

Croton reflexifolius H.B.K. (Euphorbiaceae) es una planta medicinal común en la región de la Huasteca Hidalguense la cual se emplea en el tratamiento de la úlcera gástrica, gastritis y enfermedades respiratorias. A pesar de su uso, no existe ningún estudio farmacológico que avale su acción terapéutica. Por lo que en el presente trabajo se evaluó la actividad gastroprotectora de los extractos de hexano, diclorometano y metanol, obtenidos a partir de las hojas de *C. reflexifolius* en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas Wistar, siendo el extracto de hexano el de mayor efecto gastroprotector (64.34 ± 7.72 %). De este, se aisló al ácido poliáltico, el cual resultó ser uno de los principales metabolitos responsables de dicha actividad dando un 65.26 ± 7.71 % de gastroprotección con la dosis de 30 mg/kg. Un valor similar se obtuvo con la carbenoxolona (fármaco de referencia) con la misma dosis (66.78 ± 7.81 % de gastroprotección).

La actividad del ácido poliáltico obtenida a la dosis de 30 mg/kg fue atenuada con L-NAME (70mg/kg, i.p.) un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, o por N-etilmaleimida (10 mg/kg, s.c.) un bloqueador de los grupos sulfhidrilo, lo que sugiere que en su mecanismo gastroprotector están encuentra involucrado el óxido nítrico y los grupos sulfhidrilo. El efecto gastroprotector del ácido poliáltico no se modificó al inhibir la síntesis de prostaglandinas con indometacina (10 mg/kg). En conclusión, *C. reflexifolius* contiene compuestos con actividad gastroprotectora. El ácido poliáltico, aislado de esta planta, fue el principal metabolito con actividad gastroprotectora, teniendo un efecto similar al de la carbenoxolona. Mientras que el óxido nítrico y los

grupos sulfhidrilo están involucrados en el mecanismo de acción del ácido poliáltico, no así las prostaglandinas.

I. INTRODUCCIÓN

La úlcera péptica es un problema del tracto gastrointestinal, caracterizado por un daño en la mucosa debido a la secreción de ácido gástrico y pepsina. *Helicobacter pylori* y el uso de fármacos analgésicos no esteroideos (AINE's) son una de las principales causas en el desarrollo de la úlcera. Se estima que los costos anuales directos e indirectos en el cuidado y tratamiento de esta enfermedad ascienden aproximadamente a 10 billones de dólares (Ramakrishnan *et al.*, 2007); sin embargo, las tasas de mortalidad y morbilidad no se han modificado en los últimos dos años, lo cual indica que los tratamientos que existen en la actualidad siguen siendo insuficientes para el control y erradicación de la enfermedad. En este sentido, el uso de inhibidores de la bomba de protones es el tratamiento de elección primaria debido a su efectividad y a la menor cantidad de efectos colaterales, siendo el único inconveniente, su costo elevado. Por lo que en años recientes, se ha incrementado el interés en terapias alternativas tales como el uso de plantas medicinales las cuales son una fuente atractiva para la obtención de nuevos fármacos (Falcão, 2008). En relación a lo anterior, se tiene el conocimiento de que *Croton reflexifolius* (Huilocuahuitl) es utilizado en la Huasteca Hidalguense para el tratamiento de la úlcera gástrica (Estrada, 1985) sin embargo, no hay un respaldo científico que avale tal efecto. Por lo que el presente trabajo estuvo encaminado en aislar e identificar el o los metabolitos responsables de la actividad gastroprotectora de *Croton reflexifolius* así como generar información sobre su posible mecanismo de acción al evaluar la participación del óxido nítrico, prostaglandinas y grupos sulfhidrilo.

II. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Úlcera gástrica

La úlcera es una pérdida circunstancial de la mucosa epitelial que se extiende a través de la *muscularis mucosae* en aquellas partes del tubo digestivo expuestas al jugo gástrico (Guth, 1973; Wyngaarde, 1985) que alcanza al menos en profundidad a la submucosa. Si se limita a la mucosa, se denomina erosión. Usualmente ocurre en el estómago y duodeno proximal; menos frecuentemente, en el tercio inferior del esófago, duodeno distal y yeyuno (Ramakrishnan *et al.*, 2007). La fisiopatología de la enfermedad por secreción ácida puede considerarse como un desequilibrio entre factores agresivos (ácido clorhídrico, pepsina, infección por *Helicobacter pylori* entre otros) y las defensas locales de la mucosa gástrica constituidas por la secreción de moco, bicarbonato, prostaglandinas, óxido nítrico, grupos sulfhidrilo y flujo sanguíneo (Bruntom, 1996; Abdel-Salam, 2001).

2.2. Patogénesis

La inflamación en la mucosa gástrica y duodenal es el resultado de un desequilibrio entre los mecanismos de defensa y factores agresivos. El grado de inflamación y la pérdida del equilibrio entre la secreción de ácido y los factores protectores de la mucosa pueden originar varios grados de gastritis o úlceras, siendo de los tipos I y II (Blecker, 1999). En las úlceras de tipo I, que se producen en el estómago, hay poca o ninguna hipersecreción de ácido. En cambio, las úlceras de tipo II abarcan tanto úlceras gástricas como úlceras antrales, dístales (prepilóricas) y duodenales, las cuales se caracterizan por hipersecreción de ácido y trastornos de los efectos de retroalimentación negativa de la

acidificación en la descarga de gastrina y en la secreción sostenida de ácido (Brunton, 1996). Estudios recientes demuestran que la gastritis y duodenitis contribuyen en el desarrollo de ambos tipos de úlcera, debido a un incremento en la exposición celular al ácido clorhídrico y por consiguiente en una disminución en la protección de la barrera de la mucosa en el estómago y duodeno (Blecker, 1999).

2.2.1. Secreción de ácido

La secreción de ácido clorhídrico y pepsina, al estar bajo control vagal, son los responsables de una sobreproducción de los factores agresivos en la patogénesis de la úlcera péptica, por lo que la vagotomía se usa en el tratamiento de esta enfermedad, lo que conlleva a una reducción en la secreción de los factores agresivos para la mucosa gástrica (Dembiński, 2005; Abdel-Salam, 2001). La estimulación de la secreción de ácido clorhídrico ocurre por múltiples vías, incluyendo la neuroendocrina (acetilcolina, nervio vago), endocrina (gastrina, pepsina) y la paracrina (histamina) (Blecker, 1999), las cuales interaccionan con receptores específicos localizados en el polo seroso de la célula parietal, lo que a su vez activa segundos mensajeros representados por AMPc y calcio. Estos luego activan en cascada sucesiva a una proteína cinasa que fosforila a una proteína específica, con lo cual se inicia la síntesis de ácido clorhídrico. Finalmente, una bomba de protones situada en el polo luminal de la célula parietal, libera el ácido clorhídrico sintetizado hacia el lumen gástrico (Ruiz, 1996).

2.2.2. Barrera de moco-bicarbonato

La patogénesis de la gastritis y de las úlceras se debe, en parte, por disturbios en la secreción de bicarbonato y en la capa de moco que cubre al epitelio gástrico y duodenal. La capa de moco sirve como una barrera en contra del ácido clorhídrico y pepsina

luminal, evitando el acceso de la pepsina a la superficie de las células epiteliales y neutralizando el ácido clorhídrico en presencia del bicarbonato secretado dentro de la capa de moco. Dicha capa provee protección a las células epiteliales, cambiando bruscamente de un estado normal a un estado perturbado, como en el daño mecánico generado en el estado de hipermotilidad durante las fases digestiva e intestinal de la digestión. La producción y secreción de bicarbonato en la mucosa puede ser estimulada por prostaglandinas, éstas suelen ser inhibidas por fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's) (Blecker, 1999).

2.2.3. Factores genéticos

En particular, las hormonas gástricas han recibido especial atención, específicamente la gastrina y los pepsinógenos I y II, considerados como agentes causales de úlceras e inflamación (Blecker, 1999). En diversos estudios endoscópicos se demostró que las lesiones de la mucosa gastroduodenal se correlacionan con niveles altos de pepsinógeno. Los pepsinógenos son enzimas proteolíticas inactivas que, en medio ácido, se transforman en su forma activa, la pepsina. Los pepsinógenos del grupo I (isopepsinógeno 1 al 5) son secretados en el fondo y el cuerpo del estómago, mientras que los del grupo II (isopepsinógeno 6 y 7) son liberados en el cardias y el antro gástrico, así como en la zona más proximal del duodeno (Kullich, 1994). Por lo que el pepsinógeno I, se ha relacionado especialmente con la úlcera duodenal, no sólo por encontrarse a menudo elevado, sino por ser un posible marcador genético asociado a la transmisión de predisposición a la úlcera duodenal en algunas familias (Feldman *et al.*, 1988).

2.2.4. Radicales libres

Los estudios experimentales han demostrado que los radicales libres generados a partir del oxígeno y de la oxidación de lípidos son factores importantes en la patogénesis de las lesiones gástricas inducidas por etanol. Los oxiradicales generados durante los episodios de ischemia/perfusión provocan severos daños a nivel molecular que conducen a la muerte celular, debido a que son extremadamente reactivos y tienden a agredir a los constituyentes celulares esenciales como los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos. También induce a una oxidación de la membrana lipídica, promoviendo la formación de compuestos tóxicos como son los epóxidos, aldehídos y nuevos radicales libres (La Casa *et al.*, 2000).

2.3. Etiología

En general, se reconoce que la úlcera péptica se debe a la falta de equilibrio entre los factores agresivos y los mecanismos de defensa de la mucosa gástrica tales como la secreción de ácido clorhídrico, pepsina, proteasas, la capa de moco bicarbonato, el flujo sanguíneo, la regeneración celular y agentes protectivos endógenos (prostaglandinas y factor de crecimiento epidérmico). Los factores que influyen en el desarrollo de la úlcera gástrica incluyen a:

2.3.1. Fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's)

Estos medicamentos producen daño local directo en la mucosa gástrica y duodenal por varios mecanismos fisiopatológicos. El ácido acetilsalicílico disminuye el pH en la superficie de las células epiteliales, modulando los constituyentes del moco gástrico, tanto en el contenido como en la calidad, provocando una disminución en la secreción

de bicarbonato. A dosis bajas (75-325 mg/día), comúnmente se emplea en el tratamiento anti-plaquetario en enfermedades cardiovasculares, donde promueve la formación de erosiones o úlceras gástricas. Los demás AINE's inducen daño gastroduodenal activando alguno de los siguientes mecanismos: factor activador plaquetario, radicales libres, disfunción plaquetaria, aumento de las células mastocitos liberadoras de histamina, mayor daño capilar en la mucosa gástrica e inhibición de la síntesis de prostaglandinas por inhibición de la ciclooxigenasa (Blecker, 1999).

2.3.2. Infección por *Helicobacter pylori*

Aunque *Helicobacter pylori* está presente en la mucosa gastrointestinal de algunos pacientes con úlcera duodenal, solo una minoría (10 al 15%), desarrollan la enfermedad de la úlcera. Esta bacteria se adhiere a la mucosa gástrica y en presencia de una proteína inflamatoria junto con una citotoxina funcional asociadas a un gen asilado en el cromosoma bacteriano incrementa la virulencia y probablemente su poder ulcerogénico. Los pacientes con *H. pylori* incrementan los niveles de gastrina después de ingerir alimentos con una disminución en la producción y secreción de moco-bicarbonato en la mucosa gástrica (Ramakrishnan *et al.*, 2007)

2.3.3. Consumo de tabaco

Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de tabaco se relaciona estrechamente con el desarrollo de la úlcera gástrica. Hallazgos experimentales sugieren que fumar aumenta la actividad de la xantina oxidasa, los leucotrienos así como la infiltración de neutrófilos en la mucosa gástrica. El tabaco también afecta al flujo sanguíneo, la producción de prostaglandinas, la actividad de la sintasa de óxido nítrico,

la proliferación de las células epiteliales y la formación de vasos sanguíneos. Estas acciones son importantes tanto para la formación y curación de la úlcera (Ma *et al.*, 1999).

2.3.4. Estrés

Algunos estudios sugieren que el estrés fisiológico agudo se asocia con un incremento en la secreción de ácido clorhídrico, disminución del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica y ulceración duodenal por la activación del sistema nervioso simpático; sin embargo, aún se desconoce la relación entre los factores emocionales y la secreción de ácido clorhídrico, flujo sanguíneo visceral y motilidad intestinal (Jones, 2006).

2.3.5. Causas secundarias

Una variedad de medicamentos están asociados con la formación de la úlcera entre los cuales se incluye al cloruro de potasio, bifosfonatos, cocaína y anfetaminas. Otras etiologías infecciosas menos comunes e independientes a *H. pilory*, son *Helicobacter heilmannii*, citomegalovirus, herpes simple tipo I, tuberculosis y sífilis. Las enfermedades no comunes que causan úlcera incluyen trastornos de hipersecreción de ácido (síndrome de Zollinger Ellison), mastocitosis sistémica, enfermedad de Crohn, linfoma, carcinoma y radiación (Jones, 2006) así como los hábitos alimentarios inadecuados (Falcão, 2008).

2.4. Sintomatología

El dolor es el síntoma más notable de la úlcera péptica, que se caracteriza por su cronicidad y periodicidad en relación con la ingestión de alimentos, debido a que estos estimulan la secreción de ácido, el cual interactúa con la zona lesionada. El dolor suele

ser agudo o sordo y se describe como una sensación de ardor, vacío, pesadez en la parte alta del estómago o como hambre (Smith y Thier, 1989). La indigestión, vómitos, pérdida del apetito e intolerancia a alimentos grasos son algunos de ejemplos de los síntomas menos frecuentes (Ramakrishnan *et al.*, 2007) mientras que el sangrado, fenómenos obstructivos y penetración hacia órganos vecinos o hacia el peritoneo son algunas de las complicaciones de las úlceras pépticas.

2.5. Úlcera péptica en México

En el 2006, la úlcera gástrica, gastritis y duodenitis figuraron en el cuarto lugar a nivel nacional dentro de las 20 principales causas de morbilidad, con un total de 1, 491,309 casos reportados por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Secretaría de Salud, 2006). Mientras que para el Distrito Federal en el periodo comprendido entre 2001-2006, la úlcera gástrica ocupó el lugar 18 como causa de muerte (Secretaría de Salud del Gobierno del D.F., 2005).

2.6. Tratamientos

El objetivo de los tratamientos de la úlcera gástrica son el alivio del dolor, promoción de la cicatrización y prevención de las recurrencias. Las estrategias terapéuticas tienen como finalidad equilibrar los factores agresivos contra los factores de defensa o citoprotectores (Brunton, 1996). Las alternativas farmacológicas empleadas en la úlcera péptica se clasifican en tres grandes grupos: antiácidos, antisecretores y citoprotectores.

2.6.1. Antiácidos

La función de un antiácido consiste en neutralizar al ácido clorhídrico (HCl) secretado por las células de la pared gástrica. Desde el punto de vista cuantitativo, todos los antiácidos son similares en términos de su capacidad para neutralizar al ácido (Page *et al.*, 1998). Los antiácidos se clasifican en absorbibles y no absorbibles.

Los antiácidos absorbibles no son recomendables en clínica, pero son de uso popular de manera importante. Tienen un intenso y rápido poder neutralizante que a dosis convencionales eleva con gran rapidez el pH intragástrico a valores de 7-8, lo que explica el inmediato alivio tras su ingesta (Cabrera, 2007). Los antiácidos utilizados con mayor frecuencia son el bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y el carbonato de calcio (CaCO_3), el cual neutraliza con rapidez y eficacia al HCl, sin embargo el Ca^{+2} puede activar de manera adversa los procesos dependientes de este ión, lo que causará la secreción de gastrina y HCl. Los principales problemas de los antiácidos se relacionan con su tiempo de acción corto, siendo los efectos colaterales, la alcalinización de la orina, el síndrome de leche o álcali (debido a la administración conjunta de leche o crema), hipercalcemia, nefrolitiasis, diarrea y bloqueo intestinal para la adsorción de fósforo (Brunton, 1996).

Los hidróxidos de aluminio y de magnesio constituyen los antiácidos no absorbibles. Las combinaciones de Al^{+3} y Mg^{+2} brindan una capacidad neutralizante rápida y sostenida. El magaldrato es un complejo de aluminato de hidroximagnesio que en presencia de ácido gástrico se convierten rápidamente en Mg^{+2} y $\text{Al}(\text{OH})_3$, los cuales se absorben mal y por lo tanto, tienen un efecto antiácido sostenido y con efectos secundarios mínimos (Bruntom, 1996).

2.6.2. Antisecretores

Dentro de este grupo de fármacos se encuentran, los antagonistas de los receptores para histamina tipo H₂, los antimuscarínicos, los inhibidores de la bomba de protones y los bloqueadores de los receptores para la gastrina.

2.6.2.1. Antagonista de los receptores para histamina tipo H₂

En el mercado existen cuatro antagonistas de los receptores para histamina tipo H₂: cimetidina, ranitidina, famotidina y nizatidina, los cuales compiten con la histamina de forma específica y reversible por el receptor H₂ encargado de estimular la producción de ácido por la célula parietal, disminuyendo la producción de ácido clorhídrico estimulada por la histamina, y en menor medida, por acetilcolina. Estos fármacos no sólo disminuyen la secreción ácida (basal y nocturna) sino también, la estimulada por la ingestión de alimentos en un 90 % y además favorecen la curación de las úlceras duodenales (Rang, 2000). La incidencia de efectos adversos al consumir este tipo de fármacos es <3%. Los efectos secundarios más frecuentes incluyen diarrea, dolor de cabeza, somnolencia, fatiga, dolor muscular, constipación y pérdida de libido. Entre los factores adversos presentados raramente se encuentran confusión, delirio y alucinación, los cuales pueden ocurrir principalmente por la administración intravenosa. La cimetidina, en algunos casos, produce ginecomastia en hombres y galactorrea en mujeres. Esto probablemente se debe a una afinidad con receptores androgénicos y por la inhibición del citocromo P450 que cataliza la hidroxilación del estradiol (Hoogerwerf *et al.*, 2001; Rang, 2000).

2.6.2.2. Antimuscarínicos

Este tipo de compuestos como la pirenzepina bloquean los receptores muscarínicos del tipo M₁ inhibiendo la secreción gástrica estimulada por acetilcolina (Bays y Finch, 1990). El uso de la pirenzepina está limitado por sus efectos adversos entre los que se encuentran resequedad de boca, visión borrosa, estreñimiento, midriasis la cual puede ser peligrosa en enfermos con glaucoma, retención urinaria y retardo del vaciamiento gástrico. La reacción adversa más grave es el estado de confusión mental con pérdida de memoria reciente, el peligro de su aparición aumenta con la edad. (Flores y Espulgues, 1999). Entre otros antimuscarínicos se encuentran también la metantetalina, la propantetalina, la danrazepina y la telenzepina (Bertaccini y Coruzzi, 1985).

2.6.2.3. Inhibidores de la bomba de protones

Los inhibidores de la bomba de protones son profármacos inactivos que han de llegar a las células parietales a través de la circulación, previa absorción sistemática, para poder ejercer su efecto. En presencia de un pH ácido, se convierten dentro de los canalículos en sulfenamida, la cual establece un enlace covalente con los grupos SH que existen en la H⁺/K⁺ ATPasa (Page *et al.*, 1998). Debido a que esta bomba es exclusiva de las células parietales, se han diseñado inhibidores específicos como es el caso de la familia de los benzoimidazoles sustitutivos siendo los más representativos el omeprazol, lansoprazol, rabeprazol y pantoprazol.

Este tipo de fármacos promueven la cicatrización de las úlceras del estómago, duodeno y esófago. Tienen utilidad particular para tratar a pacientes que no reaccionan de manera

adecuada a los antagonistas de los receptores para histamina tipo H₂ y en especial a los que experimentan síndrome de Zollinger-Ellison.

Entre 1.5 y 3 % de los pacientes tratados con estos fármacos experimentan efectos gastrointestinales como náuseas, diarrea y cólicos; con menor frecuencia efectos sobre el sistema nervioso central siendo los síntomas más comunes cefalalgia, mareos y somnolencia. En ocasiones se observan erupciones cutáneas e incremento de la actividad de las aminotransferasas hepáticas (Bruntom, 1996).

2.6.2.4. Bloqueadores de los receptores para la gastrina.

Se ha descrito un gran número de sustancias que funcionan como antagonistas de la gastrina o por su gran similitud estructural, con la colecistocinina. Entre ellos se incluyen derivados del ácido glutarámico (proglumida), análogos del triptófano (benzotript), análogos de las benzodiazepinas. Todos estos compuestos inhiben en mayor o menor medida la interacción de la gastrina con su receptor. Sin embargo, no se han realizado estudios clínicos controlados que demuestren su eficacia en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el ácido, por lo que no pasan de representar una posibilidad teórica sin utilidad práctica, debido a que no rebasan en potencia a los antagonistas de los receptores para histamina tipo H₂ (Cabrera, 2007).

2.6.3. Citoprotectores

La citoprotección fue definida por Robert (1979) como la capacidad de agentes farmacológicos, originalmente las prostaglandinas, de prevenir el daño en la mucosa gastroduodenal producido por varios agentes ulcerogénicos (aspirina, indometacina,

sales de ácidos biliares) y agentes necrosantes (agua caliente, alcohol absoluto, HCl 0.6 N e NaOH 0.2 N). Se ha demostrado que la acción citoprotectora de las prostaglandinas está mediada por la estimulación de los mecanismos naturales de defensa de la mucosa gástrica, por lo que se incrementa la secreción de moco-bicarbonato en la superficie de las células epiteliales y preservación del flujo sanguíneo de la mucosa. (Atay *et al.*, 2000). Se afirma que las propiedades citoprotectoras de las prostaglandinas se deben a un efecto en la microvasculatura gástrica, previniendo la respuesta vascular ante un cambio nocivo y manteniendo el flujo sanguíneo en los niveles apropiados. Las prostaglandinas de la serie E e I protegen la mucosa gástrica en contra del daño nocivo, son secretadas en la mucosa gástrica y tienen un papel importante en la integridad de la mucosa debido a sus propiedades vasodilatadoras (Abdel-Salam *et al.*, 1999), por lo que la citoprotección se refuerza con otros mecanismos que reducen la secreción de ácido gástrico (Atay *et al.*, 2000). El fenómeno citoprotector ha sido estudiado principalmente en el tracto gastrointestinal, donde se han identificado dos tipos de citoprotección, una directa y otra adaptativa (Konturek, 1990).

Se conoce como citoprotección directa a la protección de la mucosa gástrica (gastroprotección) producida por la administración de prostaglandinas exógenas (Konturek, 1990; Tsukimi y Okabe, 2001). Mientras que la citoprotección adaptativa depende de la actividad de prostaglandinas endógenas generadas en la mucosa gástrica por la aplicación de irritantes suaves (etanol al 20 %, HCl 0.2-0.35 M, NaOH 0.05-0.075 M, NaCl 2-4 % y agua caliente a 70 ° C) para prevenir severos daños en la mucosa gástrica inducidos por agentes necrosantes como etanol al 100 %, HCl 0.6 M,

NaOH 0.2 M, solución de NaCl al 25 % o agua caliente (Brzozowski, 2003; Atay *et al.*, 2000).

2.6.3.1. Mecanismo de citoprotección

En general, los mecanismos de protección para la mucosa gástrica en contra de factores agresivos consisten en factores: funcionales, humorales y neuronales. La secreción de moco alcalino, la capa de fosfolípidos, microcirculación y motilidad actúan como factores funcionales, las prostaglandinas y óxido nítrico constituyen los factores humorales y las neuronas sensibles a capsaicina corresponden a los factores neuronales (Tsukimi y Okabe, 2001).

2.6.3.2. Factores funcionales

La capa de moco forma un continuo revestimiento sobre el epitelio gástrico. El moco es un factor de protección importante para la mucosa gástrica y consiste en un gel viscoso, elástico, adherente y transparente formado por un 95% de agua e incluye algunos electrolitos, lípidos, proteínas e inmunoglobulinas y un 5% de glicoproteínas llamadas mucinas, que cubren la mucosa gastrointestinal. El moco es capaz de actuar como un antioxidante y así reducir el daño en la mucosa. Las propiedades protectoras del moco dependen de la estructura del gel, de la cantidad o el grosor de la capa así como de la secreción de mucinas y del grado de erosión y degradación proteolítica de la mucosa gástrica (Phillipson, 2004; Repptto y Llesy, 2002). La secreción de moco es estimulada por agentes como prostaglandinas (PGE₂ y PGE) y el óxido nítrico (Takahashi, 1999).

La secreción de bicarbonato (HCO_3^-) en la mucosa gástrica forma una barrera conjuntamente con el moco, el cual neutraliza el ácido clorhídrico difundido, lo que hace que el pH sea neutro en la superficie celular cuando el pH luminal es bajo (Figura 1), siendo ésta la primera línea de protección de la mucosa contra del ácido. El HCO_3^- produce dióxido de carbono (CO_2) y agua en la superficie epitelial de la mucosa gástrica por acción de la anhidrasa carbónica y al elevar la presión parcial, $p\text{CO}_2$, puede estimular la secreción de bicarbonato.

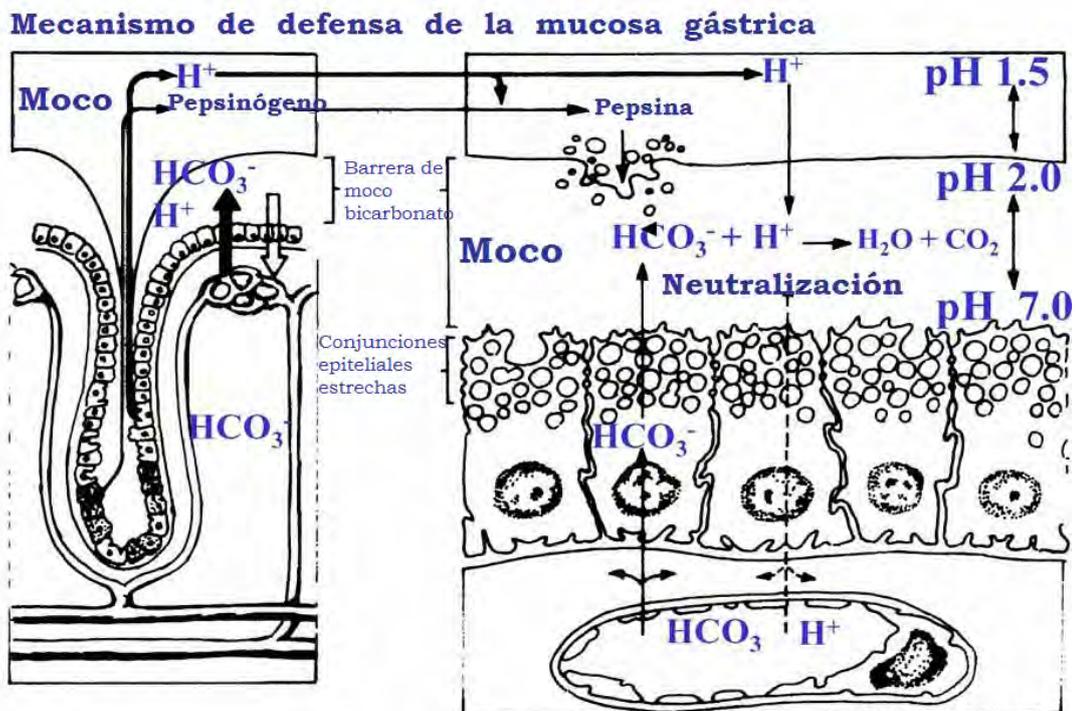


Figura 1. En el estómago, el ácido gástrico luminal no alcanza las células de la mucosa debido a una neutralización por la continua secreción de bicarbonato (HCO_3^-) en la superficie celular epitelial. Una pequeña porción de las moléculas de pepsina se filtran en la capa de moco, causando degradación sin alcanzar la superficie del epitelio gástrico (Konturek, 2004).

Se ha demostrado que por cada protón (H^+) secretado de la célula parietal, un HCO_3^- es secretado de la membrana basolateral de la célula parietal hacia los capilares de la mucosa. Así, durante la secreción ácida, el bicarbonato será transportado por la sangre a la superficie epitelial, donde estará disponible para el transporte a través de la superficie celular epitelial dentro del moco.

La estimulación vagal-colinérgica, motilidad, prostaglandinas, distensión gástrica y ácido clorhídrico en el lumen gástrico incrementan la secreción de bicarbonato. El óxido nítrico está involucrado en la secreción de bicarbonato debido a un aumento en la actividad de la sintasa de óxido nítrico constitutiva (cNOS). Se ha identificado que la vía de secreción de bicarbonato está relacionada con el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el AMPc y sustancias análogas como el polipéptido activador de la adenil ciclasa pituitaria (PACAP), los cuales estimulan la secreción de bicarbonato duodenal y hepato-biliaria. Recientemente se ha reportado que la melatonina, un neurotransmisor liberado en las células intestinales, es también un efectivo estimulante de la secreción alcalina duodenal en ratas anestesiadas (Figura 2) (Kounturek *et al.*, 2004; Phillipson, 2004; Tsukimi y Okabe, 2001).

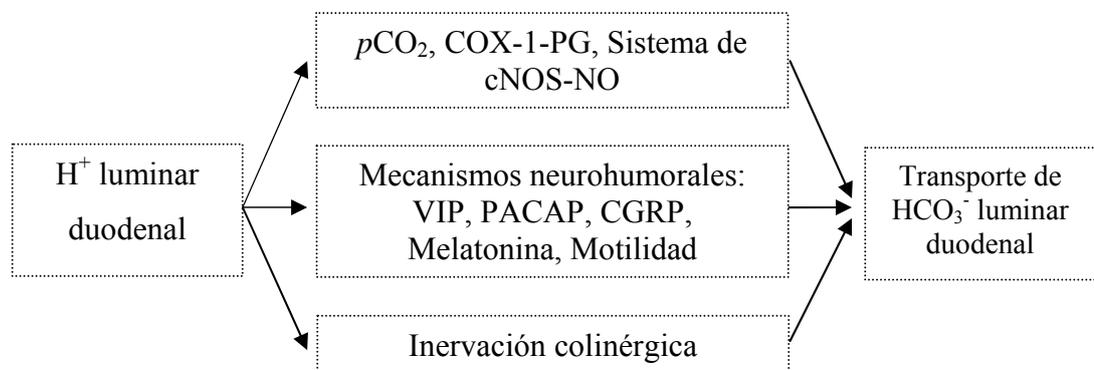


Figura 2. Mecanismo de HCO_3^- duodenal en respuesta al ácido clorhídrico.

Por lo que en condiciones fisiológicas normales, la capa de moco bicarbonato debe ser lo suficientemente adecuada para proteger a la mucosa gástrica en contra de ácido clorhídrico y pepsina (Allen y Flemström, 2004).

El flujo sanguíneo en la mucosa gástrica se ha reconocido como un componente en la barrera de protección gastrointestinal, debido a que la sangre circulante diluye, neutraliza y elimina las sustancias nocivas que han logrado vencer la barrera de moco-bicarbonato. Se conoce que mantiene la integridad de la mucosa por alguno de los siguientes mecanismos: (1) incremento del flujo sanguíneo manteniendo cantidades óptimas de oxígeno y nutrientes disponibles para las células, (2) promueve la eliminación y la difusión de los protones. El flujo sanguíneo de la mucosa gástrica está regulado a nivel de la submucosa arterial y está bajo control del sistema nervioso central, de la regulación autocrina y paracrina de hormonas, de factores de crecimiento y de la producción de eicosanoides en la mucosa gástrica (Phillipson, 2004; West, 2004). También se ha sugerido que la motilidad tiene un papel importante en la prevención de las lesiones gástricas provocadas por estrés o por los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, debido a que la inhibición de la motilidad induce a una reducción de la mucosa gástrica, disminuyendo la susceptibilidad de la mucosa a la acción corrosiva de los irritantes, lo que proporciona protección a la mucosa (Tsukimi y Okabe, 2001).

2.6.3.3. Factores humorales

La mayoría de los mecanismos de defensa son estimulados o facilitados por las prostaglandinas (endógenas o exógenas) y prostaciclina que mantienen la integridad de la mucosa gástrica.

Las prostaglandinas son sintetizadas a partir del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasas (COX) (Peskar, 2001). Actualmente se han identificado tres isoformas de ciclooxigenasas, siendo la COX-1 y COX-3 las isoformas constitutivas mientras que la COX-2 corresponde a la isoforma inducible. Por lo tanto, la COX-1 se expresa en estómago, riñón y plaquetas, involucrándose en la generación de las prostaglandinas que participan en el mantenimiento de las funciones fisiológicas esenciales. La COX-3, que deriva del gen que codifica a la COX-1, involucra mecanismos encefálicos y medulares en la producción de la fiebre y el dolor y no a nivel de la inflamación (Pradilla, 2004) en tanto que la COX-2 se caracteriza por expresarse en respuesta a varios estímulos inflamatorios y se piensa que es la responsable de la producción de prostaglandinas en condiciones patológicas en los sitios de inflamación (Takeuchi *et al.*, 2002). En el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica se postula que hay una participación tanto de la COX-1 como de la COX-2, lo anterior se sustenta en el hecho de que al administrar un inhibidor selectivo de la COX-1 (SC-5610) hay una marcada reducción en la síntesis de PG, pero no causa daño gástrico; lo mismo sucede con el inhibidor selectivo de la COX-2, celecoxib. Sin embargo, la combinación de los dos fármacos provocan erosiones hemorrágicas en la mucosa gástrica lo que indica que para producir daño gástrico a partir de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos es necesaria la inhibición de la COX-1 y la COX-2 (Gires, 2005). Este efecto explica que la supresión de la síntesis de prostaglandinas por fármacos anti-inflamatorios no esteroideos resulta en un incremento de la susceptibilidad de la mucosa al daño, especialmente durante la disminución de la síntesis de óxido nítrico. La formación continua de prostaglandinas en la mucosa gástrica representa un proceso fisiológico

necesario para mantener la integridad celular estimulando procesos como la secreción de moco-bicarbonato, incremento del flujo sanguíneo así como la inhibición de la secreción ácida y la motilidad gástrica (Atay *et al.*, 2000). Las prostaglandinas de la serie PGE₂ y PGI₂ protegen la mucosa gástrica por mantenimiento de una hidrofobicidad de la superficie del epitelio, estimulando la producción de moco epitelial y la secreción de bicarbonato, incrementando el flujo sanguíneo local y promoviendo la rápida proliferación y diferenciación celular después del daño en la mucosa (Giercksky *et al.*, 2000).

Se ha reportado que el óxido nítrico (NO) tiene una influencia marcada en diferentes componentes de la mucosa gástrica, como flujo sanguíneo, secreción de moco y permeabilidad celular. El NO o factor relajante derivado del endotelio se produce a partir de la L- citrulina derivado del aminoácido L-arginina y oxígeno molecular, catalizada por la sintasa de óxido nítrico (NOS). Existen dos isoformas de sintasa de óxido nítrico que han sido identificadas de acuerdo a su origen celular. Inicialmente fue identificada la isoforma constitutiva (cNOS) dependiente de Ca⁺²/calmodulina, la cual se subdivide en: NOS neuronal (nNOS) y la NOS endotelial (eNOS), en neuronas y endotelio respectivamente, expresándose en condiciones normales. La segunda que es una forma inducible (iNOS) e independiente de Ca⁺²/calmodulina y que es inducida por la exposición a citocininas, lipopolisacáridos y factor α de necrosis tumoral en varias células, incluyendo las inflamatorias (Mendoza, 2003). El NO al ser un activador endógeno que modula actividades fisiológicas a partir de la estimulación de la guanilato ciclasa soluble, conduce a la formación de GMPc, que funciona como un segundo mensajero en la mucosa gástrica, produciendo una vasodilatación (Rang, 2000; Gires,

2005) y secreción de moco-bicarbonato con lo cual se contribuye a la inhibición de la secreción de ácido clorhídrico en el estómago (Ekblad *et al.*, 2000; Cho, 2001).

Los agentes donadores de NO exógeno tales como la nitroglicerina o nitroprusiato de sodio, inhiben el daño hemorrágico de la mucosa gástrica inducidas por HCl 50 mM o etanol al 70 %, pero si estos compuestos se administran a dosis altas, producen daño en la mucosa gástrica, sugiriendo que la formación fisiológica de NO juega un papel importante en la modulación del flujo sanguíneo e integridad de los tejidos. Por lo tanto, una inadecuada liberación de NO puede producir daños en la mucosa gástrica debido a la citotoxicidad directa de NO o del radical pentoxinitrito (Tsukimi y Okabe, 2001; Gires, 2005).

La inhibición de la sintasa de óxido nítrico se logra con análogos estructurales de la L-arginina tales como N^G-nitro-L-arginina (L-NA) y éster metílico de la N^G-nitro-L-arginina (L-NAME), considerados análogos no selectivos para una isoforma específica ya que inhiben la acción citoprotectora de los irritantes suaves.

Por lo tanto, el NO y la interacción con neuropéptidos y prostaglandinas, juegan un papel importante para mantener la integridad de la mucosa gástrica (Tsukimi y Okabe, 2001).

2.6.3.4. Factores neuronales

En la fase de daño gástrico, las neuronas aferentes sensibles a capsaicina incrementan el flujo sanguíneo en la mucosa gástrica al liberar neuropéptidos como la sustancia P, calcitonina (CGRP) y neuroquinina en la terminación de la fibra nerviosa. Bajas dosis de capsaicina estimulan las neuronas sensibles primarias abriendo los canales catiónicos

no selectivos que interaccionan con los receptores de vainillina provocando la liberación local de la calcitonina y la sustancia P. A dosis altas, la capsaicina es neurotóxica, debido a que destruye los nervios sensibles con una disminución en los niveles de la calcitonina en plasma y tejido. La administración exógena de calcitonina estimula las fibras nerviosas y ejerce un efecto protector en diferentes modelos experimentales de úlcera gástrica, considerando que la destrucción de las neuronas sensibles agravan las lesiones de la mucosa gástrica inducida por varios agentes nocivos, inhibiendo el crecimiento de la mucosa gástrica y prolongando el tiempo de curación de la úlcera (Dembiński *et al.*, 2005).

2.6.4. Fármacos citoprotectores

Aunque las prostaglandinas fueron las primeras en clasificarse como citoprotectoras, actualmente se incluyen dentro de ese grupo a ciertas sustancias que tienen una actividad semejante al de las prostaglandinas. Entre otros compuestos citoprotectores se incluye al sulfacrato, sales de bismuto y carbenoxolona.

2.6.4.1. Sulfacrato

El sulfacrato es un polímero de aluminio y sacarosa. Tras su ingestión oral y en contacto con un pH gástrico bajo, se polimeriza y origina una pasta pegajosa, formando una barrera protectora que impide que el ácido clorhídrico y pepsina sigan dañando la zona lesionada, por lo cual es efectivo en la prevención y tratamiento de la úlcera gástrica y duodenal en humanos. Presenta efectos favorables sobre el flujo sanguíneo en la mucosa gástrica, la secreción de moco, prostaglandinas y bicarbonato (Cabrera, 2007; Page *et al.*, 1998). Los mecanismos de acción que se han propuestos para el sulfacrato, incluyen

la secreción de moco gástrico, estimulación de la síntesis de prostaglandinas, adsorción de la pepsina y estimulación local del factor de crecimiento epidérmico. Se ha demostrado experimentalmente que este fármaco incrementa la producción de moco gástrico *in vivo* e *in vitro* por estimulación de la fosfolipasa C. El efecto colateral de este fármaco es que al contener aluminio produce estreñimiento (Mojžiš *et al.*, 2000; Brunton, 1996).

2.6.4.2. Sales de bismuto

Las sales de bismuto (subsalicilato de bismuto, el subcitrato de bismuto coloidal y dicitratobismuto tripotásico) se usan para tratar la infección por *Helicobacter pylori* asociadas con la úlcera péptica. Poseen efectos tóxicos sobre el bacilo y también puede prevenir su adherencia a la mucosa o inhibir sus enzimas proteolíticas. Se piensa que estos compuestos cubren la base de la úlcera, adsorbe la pepsina, aumenta la síntesis de prostaglandinas locales y estimula la secreción de bicarbonato. Los efectos indeseados incluyen náuseas, vómitos y tiñen de negro la lengua y las heces (Rang, 2000).

2.6.4.3. Carbenoxolona

La carbenoxolona es un triterpeno pentacíclico derivado de la hidrólisis del ácido glicirrízico. Los mecanismos de acción que se han propuesto para explicar su actividad farmacológica sugieren que el carácter lipófilo de la molécula permite fijarse a las membranas y tener la capacidad de inhibir la actividad de la pepsina, estimular la síntesis de glicoproteínas, alterar la composición y cantidad del moco (Brunton, 1996), modular e incrementar la liberación de prostaglandinas E₂ y reducir la formación de

tromboxanos. Recientemente se ha relacionado el NO como un factor que contribuye al efecto antiulceroso de la carbenoxolona (Borrelli e Izzo, 2000).

El uso de la carbenoxolona ha sido limitado por manifestar actividad mineralocorticoide importante, provocando retención de Na⁺ y líquidos, hipertensión, hipopotasemia, edema, enfermedades cardiacas y trastornos de la tolerancia a la glucosa (Borrelli e Izzo, 2000; Bruntom, 1996).

2.6.5. Mecanismo de defensa de la mucosa gástrica independiente de prostaglandinas

2.6.5.1. Grupos sulfhidrilo

Los grupos sulfhidrilo no proteicos en el epitelio son muy importantes en el mantenimiento de la integridad de la mucosa, ya que estos compuestos tienen la capacidad de atrapar los radicales libres (Gires, 2005) y de esta forma brindan una protección celular. Se ha reportado que las prostaglandinas previenen la disminución de los niveles en la mucosa de los grupos sulfhidrilo cuando se inducen las lesiones gástricas con etanol (Gires, 2005)

2.6.5.2 Factor de crecimiento epidérmico

El factor de crecimiento es un polipéptido producido por las glándulas salivales y de Brunner, el cual estimula la síntesis del ácido ribonucleico (RNA) y del ácido desoxirribonucleico (DNA) en la mucosa, favoreciendo el crecimiento y la diferenciación celular, de tal forma, que se acelera la reparación de la mucosa gástrica así como la formación de una barrera diluida que restringe el daño a partir de agentes

necrosantes, atrapando radicales libres e incrementando el flujo sanguíneo. El factor de crecimiento es un poderoso inhibidor de la secreción ácido gástrica, además, a dosis no antsecretoras protege al estómago de las erosiones agudas producidas por aspirina. Se ha demostrado que es tan efectivo como la cimetidina en la curación de las úlceras duodenales crónicas en ratas, además previene la formación de las úlceras producidas por estrés en ratas. Dicho efecto puede estar mediado por la somatostatina endógena. Sin embargo, el papel del factor de crecimiento epidérmico en la defensa gastroduodenal humana no ha sido del todo definida (Lanas, 1997; Terrones, 2006).

2.6.5.3. Sulglicótido

Es un polipéptido en forma de sal y se comporta como un agente que cubre la mucosa y su acción citoprotectora parece estar relacionada con la estimulación de la producción de prostaglandinas gastrointestinales e interviene en el mecanismo de estabilización de la estructura lisosomal en las células de la mucosa (Hoogerwef y Pasrichia, 2001).

III. PLANTAS MEDICINALES CON ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA

Es posible enlistar cerca de 58 especies de plantas medicinales estudiadas con actividad gastroprotectora. Estas especies están distribuidas en 37 familias, de las cuales las más estudiadas son: Asteraceae, Fabaceae, Celastraceae y Turneraceae con trece, seis, tres y dos especies respectivamente. De los nueve países que han desarrollado investigación en esta área, Brasil contabiliza el 67 % en la investigación de nuevos principios activos obtenidos de fuentes naturales (Falcão, 2008).

Baccaris illita, encontrada en la región subtropical de Brasil, es popularmente conocida como “chá-ventura” o “ervamilagrosa”, es utilizada popularmente por presentar

actividad anti-inflamatoria, en contra de enfermedades infecciosas y por ejercer una acción gastroprotectora en el estómago al activar los mecanismos de defensa y reducir la secreción ácida. *Quassia amara*, es probablemente la fuente de un nuevo medicamento para el tratamiento de las úlceras gástricas, su mecanismo de acción está relacionado con los factores de citoprotección como son la secreción de moco y prostaglandinas. *Syngonanthus arthrotrichus*, popularmente conocida como “semprevivas-mini-saia”, nativa de Brasil. Los extractos de esta especie contienen flavonoides, a los cuales se les ha reportado actividad gastroprotectora. En los extractos polares de *Brysonima crassa*, se han logrado aislar flavonas y quercetinas, sugiriendo que estas sustancias son las responsables de la protección de la mucosa gástrica (Falcão, 2008).

3.1. Estudios de plantas mexicanas con actividad gastroprotectora

En México, se tiene el registro de 56 plantas medicinales con actividad antiulcerosa, de las cuales, las más estudiadas son *Hippocratea excelsa* (cancerina) (Navarrete *et al.*, 2002) y *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) (Arrieta, 2006). Pero cada año, las exploraciones etnobotánicas registran nuevas especies con uso para este padecimiento, siendo una de ellas *Croton reflexifolius* una planta medicinal con actividad gastroprotectora, utilizada en la Huasteca Hidalguense para tratar este padecimiento, a pesar de su uso, no cuenta con ningún estudio fitoquímico o farmacológico que avale su acción terapéutica.

3.1.1. *Hippocratea excelsa*

Hippocratea excelsa es una planta conocida como cancerina, planta nativa de México y América Central (Falcão *et al.*, 2008). Se aislaron de la corteza de la raíz al β -sitosterol, β -D-glucósido de β -sitosterol, a la (-) epicatequina y la mezcla de α - y β - amirinas como los metabolitos responsables de la actividad gastroprotectora en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol.

3.1.2. *Amphipterygium adstringens*

De *Amphipterygium adstringens* espécimen conocido como cuachalalate, se aisló el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, β -sitosterol y ácido 3-*epi*-oleanólico, todos ellos responsables de la actividad gastroprotectora de esta planta (Arrieta *et al.*, 2005).

3.1.3. *Croton*

El género *Croton* pertenece a la familia *Euphorbiaceae* y comprende alrededor de 1300 especies de árboles, arbustos y hierbas distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. Tan sólo en Río de Janeiro se han identificado 39 especies y algunas se utilizan en la medicina popular para el tratamiento del cáncer, el estreñimiento, la diabetes, problemas digestivos, la disentería, heridas externas, fiebre, hipercolesterolemia, hipertensión, inflamación, infecciones intestinales, paludismo, dolor, úlceras y pérdida de peso. Varias especies son aromáticas, lo que indica la presencia de componentes volátiles o bien, pueden contener látex, una característica generalmente asociada con las propiedades medicinales (Salatino, 2007). Este género es rico en componentes con actividad biológica, tales como: diterpenoides, alcaloides,

diferentes tipos de diterpenos como los ésteres de forbol, clerodano, labdano, kaurano, trachilobano y flavonoides (Block *et al*, 2004; González-Vázquez, 2006).

3.1.3.1. Especies de *Croton* con actividad gastrointestinal

La especie de *C. cajucara*, popularmente conocida como "sacaca", crece en la región amazónica brasileña. Sus hojas y corteza se utilizan en forma de té o de píldoras para el tratamiento de la diabetes, colesterol, alteraciones gastrointestinales y hepáticas así como pérdida de peso. *C. celtidifolius* Baill, comúnmente conocido como "Sangue-de-dave", es un árbol del bosque atlántico del sur de Brasil. Su corteza y hojas se utilizan como infusiones para el tratamiento de enfermedades tales como: inflamación, leucemia, reumatismo y úlcera (Salatino, 2007). *C. malambo*, un pequeño árbol que crece en el oeste de Venezuela y el norte de Colombia conocido como palomatias y torco. La infusión de la corteza se utiliza en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes, diarrea, reumatismo y úlcera gástrica. Especialmente *C. palanostigma* es una de las plantas medicinales más ampliamente utilizadas en el trópico de América del Sur. El látex de color rojo obtenido de la corteza se utiliza en el tratamiento de: heridas, úlcera gástrica e inflamación intestinal (Salatino, 2007). *C. zehntneri*, es una planta aromática nativa en el noreste de Brasil donde es popularmente llamada "canela-de-Cunha" y se utiliza principalmente como sedante, estimulante del apetito y para el alivio de los trastornos gastrointestinales. La corteza y sus hojas se utilizan como edulcorantes en los alimentos y bebidas (Salatino, 2007).

Las semillas de *Croton tiglium* son conocidas popularmente como Ba-Bou (o Badou) en China. Los chinos emplean la semilla en el tratamiento de enfermedades

gastrointestinales, inflamación intestinal, reumatismo, dolor de cabeza, úlcera péptica y dolor visceral. Se ha comprobado que en las semillas, las hojas, corteza y raíz de *C. tiglium* contienen terpenos siendo los sesquiterpenos y monoterpenos, los metabolitos de mayor proporción (Wang *et al.*, 2008).

Un árbol conocido como sangregado, *C. draco*, es un arbusto nativo de México y América Central, posee una savia de color rojo ampliamente utilizado en la medicina tradicional. Su empleo oral está indicado para la tos, gripe, diarrea y úlceras del estómago. La aplicación tópica ayuda en la cicatrización de heridas, llagas abiertas, herpes y como anti-séptico después de la extracción de dientes (Salatino, 2007). Finalmente *C. reflexifolius* es una planta medicinal que se encuentra en la Huasteca Hidalguense y es conocida localmente como “Huilocuahuitl”. Las hojas son usadas comúnmente como infusión para tratar la tos, diabetes y úlcera gástrica (Estrada, 1985).

IV. METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA

4.1. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de cerca de 4000 compuestos naturales con una gama amplia de efectos biológicos, incluyendo actividad antiulcerosa. Los flavonoides son constituyentes importantes en la dieta humana y también se encuentran en varias plantas medicinales en el mundo. Los mecanismos propuestos para explicar el efecto gastroprotector de los flavonoides incluyen un incremento en el contenido de prostaglandinas en la mucosa, disminución de la secreción de histamina por inhibición de la histidina descarboxilasa e inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori*;

además, de que atrapan radicales libres ejerciendo un papel importante en las lesiones ulcerosas y erosiones del tracto gastrointestinal. Debido a su baja toxicidad, los flavonoides pueden potencialmente ser ideales en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales asociado con infección de *Helicobacter pylori* (Borrelli e Izzo, 2000). Algunos de los flavonoides que muestran actividad gastroprotectora y que han sido los más estudiados son:

Quercetinas. Previene lesiones en la mucosa gástrica producidas por estrés, ligadura de píloro, reserpina y etanol, incrementando la cantidad de glicoproteínas neutras en la mucosa gástrica.

Naringina. Reduce significativamente el índice de úlcera e incrementa el contenido de hexosamina de la mucosa gástrica sin que se afecte la PGE₂ y el contenido total de proteínas, en ratas tratadas con etanol.

Sylamarina. El tratamiento con este flavonoide previene las úlceras inducidas por estrés y por la ligadura de píloro en ratas, pero no previene la formación de lesiones gástricas inducidas por etanol. Se sugiere que el efecto gastroprotector está relacionado con la inhibición de la vía de la lipoxigenasa, evitando la síntesis de leucotrienos.

Antocianósidos. Su actividad gastroprotectora se atribuye a un aumento de moco en la pared del estómago, influyendo en la biosíntesis de los mucopolisacáridos.

Solon. Un flavonoide sintético derivado de la soforadina, presenta efectos gastroprotectores debido a que interviene en la formación y metabolismo de prostaglandinas en la mucosa gástrica.

SU-840. Un nuevo flavonoide sintético derivado de *Sophora subprostrata* reduce el ácido gástrico y pepsina así como las lesiones gástricas inducidas por etanol, aspirina o estrés (Borrelli e Izzo, 2000).

4.2. Saponinas

Las saponinas se encuentran particularmente como glucósidos. Varias plantas que contienen altas cantidades de saponinas han mostrado tener actividad gastroprotectora en varios modelos experimentales de úlcera. Las saponinas aisladas de *Panax japonicus* y de *Kochia scoparia* han mostrado tener propiedades gastroprotectoras, las cuales probablemente se deban a la producción de moco y de factores protectores de la membrana. Mientras que la mezcla de saponinas aisladas de *Aesculus hippocastanum* también presentan actividad antiulcerosa en varios modelos de úlcera, en donde el efecto se debe, en parte, a la inhibición de la secreción de ácido gástrico y secreción de pepsinógeno (Borrelli e Izzo, 2000)

4.3. Taninos

Es conocido que los taninos modifican la capa exterior de la mucosa, haciéndola menos permeable y más resistente al daño químico, mecánico o irritación; sin embargo, la correlación entre la estructura molecular de los taninos y la actividad astringente/ulcerosa es desconocida.

La aplicación de concentraciones bajas de taninos en la mucosa, sólo modifica la capa exterior, haciéndola menos permeable por lo que se incrementa la protección de las capas subyacentes en contra de la acción de bacterias, irritación química y mecánica; en

tanto que a concentraciones altas, causan coagulación de las proteínas de la capa profunda de la mucosa, provocando inflamación, diarrea y vómito (Borrelli e Izzo, 2000).

4.4. Gomas y mucílagos

Las gomas y mucílagos son sustancias quebradizas, amorfas, transparentes o translúcidas, las cuales fácilmente absorben agua para formar masas gelatinosas y las soluciones resultantes son coloidales o viscosas. Los fármacos mucilaginosos tienen la propiedad de cubrir y proteger la mucosa del estómago por lo que son usados en el tratamiento de la úlcera gástrica. *Althaea officinalis*, *Cetraria islandica*, *Malva sylvestris*, *Matricaria chamomilla* y especies de *Aloe* son plantas que contienen mucílagos y que son usadas en varios países para el tratamiento de la úlcera gástrica (Borrelli e Izzo, 2000).

4.5. Alcaloides

Una gran variedad de alcaloides tales como escopolamina, anisodina, anisodanina, aislados de *Scopolia*, son efectivos agentes gastroprotectores en distintos modelos de úlcera. Dichos alcaloides pueden inhibir la secreción gástrica y la actividad de la pepsina e incrementar la barrera de la mucosa (Zhang *et al.*, 1990).

4.6. Aceites

El aceite volátil de *Hyptis mutabilis* previene o reduce la formación de úlceras en la mucosa gástrica de ratas, inducida por indometacina. (Arrieta, 2006). La emulsión

formada con el aceite de la semilla de *Brucea javanica*, inhibió significativamente las lesiones gástricas inducidas por la ligadura de píloro, aspirina, estrés y úlcera gástrica crónica por ácido acético en ratas. (Terrones, 2006).

4.7. Triterpenoides

El ácido oleanólico el cual está presente en especies vegetales es un triterpeno que presenta actividad gastroprotectora en úlceras inducidas por aspirina, indometacina, reserpina y tetragastrina. La aspirina e indometacina disminuyen los niveles de prostaglandinas, por lo que es probable que el ácido oleanólico estimule la producción de prostaglandinas.

Otros triterpenoides como el acetato de β -lupeol aislado de *Spilanthes ocyimifolia*, el taraxerol aislado de *Taraxacum officinale* y el ácido ursólico aislado de *Psychotria adenophylla*, inhiben o reducen las ulceraciones por estrés en ratas (Gupta *et al.*, 1981; Snykers y Fourie, 1989).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La úlcera gástrica está considerada dentro de las 20 causas de morbilidad a nivel nacional y con mayor recurrencia a nivel mundial. Varios productos farmacéuticos se emplean en el tratamiento de la úlcera gástrica; sin embargo, no se cuenta con un fármaco ideal, es decir, que cure la úlcera y disminuya su recurrencia. Los inhibidores de la ATPasa H^+ / K^+ (omeprazol, lanzoprazol, pantoprazol, etc.) son los más prometedores en este sentido, pero su costo es elevado. En años recientes, se ha incrementado el interés por el uso de plantas medicinales, las cuales son una fuente atractiva para la obtención de nuevos fármacos que pudieran utilizarse para el tratamiento de la úlcera gástrica (Falcão, 2008).

En este sentido, una planta mexicana utilizada para tratar la úlcera gástrica es *Croton reflexifolius* (Huilocuahuitl), a pesar de su uso común en la Huasteca Hidalguense para tratar la úlcera gástrica y enfermedades respiratorias, no existe ningún estudio fitoquímico o farmacológico que avale su efecto terapéutico. Se sabe que el género *Croton* posee diterpenoides, y para algunos de ellos se les ha reportado actividad gastroprotectora. Por lo que el presente trabajo estuvo orientado a aislar e identificar, mediante un estudio biodirigido utilizando el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto en ratas Wistar, el o los metabolitos responsables de la actividad de *Croton reflexifolius* así como explorar la participación del óxido nítrico, las prostaglandinas y los grupos sulfhidrilo en su mecanismo de acción gastroprotector.

VI. HIPÓTESIS

Del género *Croton*, se han aislado diterpenoides y para algunos de estos se ha reportado actividad gastroprotectora, por lo que se espera que alguna de estas moléculas sean las responsables de la actividad gastroprotectora de *Croton reflexifolius*.

VII. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Evaluar la actividad gastroprotectora, mediante un estudio biodirigido, de *Croton reflexifolius* en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto en ratas Wistar.

7.2. Objetivos específicos

- a) Evaluar la actividad gastroprotectora de los extractos de hexano, diclorometano y metanol de *C. reflexifolius* en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas Wistar, utilizando dosis que permitan encontrar la ventana de actividad biológica.
- b) Aislar e identificar el o los metabolitos responsables de la actividad gastroprotectora de *C. reflexifolius*.
- c) Determinar la participación de las prostaglandinas endógenas administrando indometacina; la implicación del óxido nítrico empleando el éster metílico de la N^G-nitro-L-arginina (L-NAME) y los grupos sulfhidrilo utilizando N-Etilmaleimida (NEM) en el mecanismo de acción gastroprotector del o los metabolitos activos de *C. reflexifolius*.

VIII. METODOLOGÍA

8.1. Material vegetal

Las hojas de *Croton reflexifolius* se colectaron en Tehuetlan, en el estado de Hidalgo, México en mayo del 2007. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo con el número CHAP60955.

8.2. Aparatos

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN-¹H, 500 MHz) y de Carbono 13 (RMN-¹³C, 125 MHz) se realizaron en espectrómetro Bruker AVANCE-DMX 500 en una solución de CDCl₃, empleando un TMS como referencia interna.

8.3. Extracción y fraccionamiento de las hojas de *C. reflexifolius*

5.2 kg de hojas secas y molidas de *C. reflexifolius* fueron extraídas primeramente con hexano (32 L tres días/tres veces), posteriormente con diclorometano (32 L tres días/tres veces) y finalmente con metanol (32 L tres días/tres veces) por maceración a temperatura ambiente (22° C ± 2° C). Cada disolvente fue evaporado en un rota evaporador a presión reducida, obteniéndose 142, 128 y 401 g de extracto hexano, diclorometano y metanol, respectivamente, siendo el extracto hexánico el de mayor actividad gastroprotectora. Por lo que 40 g de este extracto se sometió a una cromatografía en columna empacada con gel de sílice (0.063-0.200 mm, 250 g), resultando seis fracciones al eluirse con: 1.7 L de hexano 100 % (F1), 1.7 L de hexano/acetato de etilo 9:1 (F2), 1.7 L de hexano/acetato de etilo 7:3 (F3), 1.7 L de

hexano/acetato de etilo 5:5 (F4), 1.7 L de acetato de etilo 100 % (F5) y 1.7 L de metanol 100 % (F6). Estas fracciones fueron evaluadas en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol, siendo la fracción F3 la de mayor actividad gastroprotectora, la cual fue recromatografiada en una segunda columna empacada con 300 g de gel de sílice, eluyéndola sucesivamente con hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo, acetato de etilo y metanol, obteniéndose 50 fracciones de 20 mL cada uno (Figura 3). De la fracción 17-40 (eluida con hexano/acetato de etilo, 95:5) se obtuvo un sólido blanco (1g), con punto de fusión de 97-100° C, identificándose como ácido poliáltico (Figura 4). La pureza del ácido poliáltico fue del 91 %, determinado por Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectroscopia de masas (LC-MS). De esta misma fracción, también se aislaron e identificaron β -sitosterol y β -lupeol, en cantidades relativamente pequeñas.

8.4. Datos espectroscópicos

Se realizaron los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y de Carbono 13. Los datos experimentales se compararon con los datos reportados por Carreras *et al*, (1999).

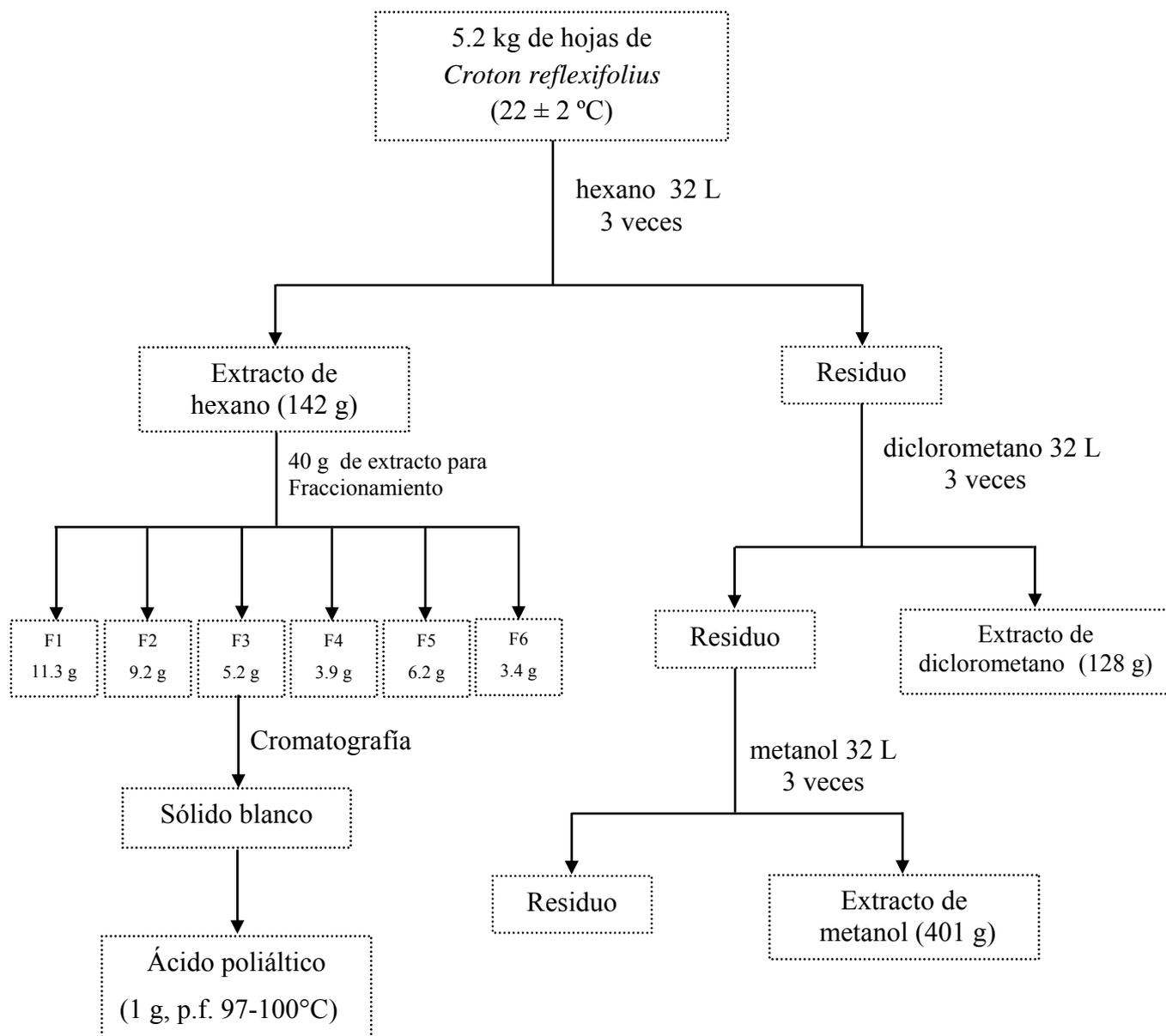


Figura 3. Obtención y fraccionamiento de los extractos de *C. reflexifolius*

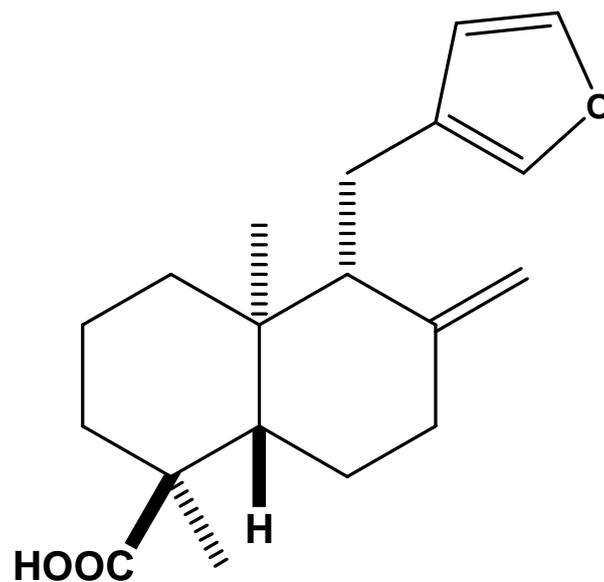


Figura 4. Estructura del ácido poliáltico

8.5. Animales

Los experimentos se realizaron con ratas machos Wistar de 55 - 60 días de edad, con un peso promedio de 180-220 g, obtenidos del Bioterio de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. Los animales fueron tratados conforme a la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manejo de Animales (NOM-062-ZOO-1999) y de acuerdo a las normas internacionales para el uso de animales de laboratorio. Los animales fueron colocados de manera individual en cajas con un piso de malla de alambre, privándose de alimento 24 horas antes del experimento, con libre acceso al agua. En todos los experimentos se utilizaron de siete a diez animales por grupo.

8.6. Fármacos y dosificación

Los extractos y fracciones fueron suspendidos en Tween 80 al 0.5 % minutos antes de cada experimento, administrados por vía oral. El grupo control recibió únicamente el vehículo (Tween 80 al 0.5 %) en el mismo volumen (0.5 mL /100g) y por la misma vía de administración. La carbenoxolona (95 % de pureza) se utilizó como fármaco de referencia. Para investigar la participación de las prostaglandinas, se administró por vía subcutánea 10 mg/kg de indometacina disuelta en solución salina al 0.9 % conteniendo 5% de NaHCO₃ (Wan y Gofffried, 1985). Para evaluar la participación del óxido nítrico, se administró 70 mg/kg de L-NAME (98% de pureza) por vía intraperitoneal, disuelto en agua. Para analizar la participación de los grupos sulfhidrilo, se empleó 10 mg/kg de NEM (98 % de pureza) disuelto en solución salina al 0.9 %, administrándose por vía subcutánea (Matsuda *et al.*, 1999). Todos los fármacos se adquirieron en Sigma Aldrich Corporation.

8.7. Lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto

Las úlceras fueron inducidas de acuerdo al método descrito por Robert (1979), por la administración intragástrica de etanol absoluto. Los extractos, fracciones y fármacos se administraron a los diferentes grupos de animales y 30 minutos después, se administró 1 mL de etanol a cada rata. 2 horas después de administrar el agente necrosante, las ratas fueron sacrificadas en una cámara de CO₂. De forma inmediata se realizó la disección del estómago y duodeno, llenándose con 10 mL de formaldehído al 2 % y se colocaron en un recipiente con formaldehído durante 5 minutos, para lograr la fijación de la capa interna y externa del estómago. El duodeno fue abierto a lo largo de su lado anti-mesentérico y el estómago a lo largo de su curvatura mayor. El área dañada (mm²) fue medida con un microscopio estereoscópico (x 10) provisto de un micrómetro ocular. Se calculó la suma del área de todas las lesiones en el corpus de cada estómago y se utilizó como índice de úlcera. El % de gastroprotección se calculó de acuerdo a la relación:

$$\% \text{ de gastroprotección} = (\text{UIC} - \text{UIT}) \times 100/\text{UIC}$$

Donde:

UIC es el índice de úlcera control

UIT es el índice de úlcera de los animales tratados (Arrieta *et al.*, 2005).

8.8. Lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con indometacina

Para investigar la participación de las prostaglandinas endógenas en la gastroprotección del ácido poliáltico, se administró 10 mg/kg de indometacina. 75 minutos después se administró 30 mg/kg de ácido poliáltico, 30 minutos más tarde se administró 1 mL de etanol absoluto a cada rata, pasados 120 minutos después fueron sacrificadas las ratas y se

determinó el índice de úlcera (Arrieta *et al.*, 2005). Al grupo control se le administró el vehículo más etanol (Control de vehículos) y a un segundo grupo, indometacina más etanol (Control de indometacina) (Diagrama 1).

8.9. Lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con L-NAME

Para evaluar la participación del óxido nítrico endógeno en la gastroprotección del ácido poliáltico, se administró 70 mg/kg de L-NAME. 30 minutos después se administró 30 mg/kg de ácido poliáltico, transcurridos 30 minutos se administró por vía oral 1 mL de etanol absoluto a cada rata, 120 minutos después fueron sacrificadas las ratas y se determinó el índice de úlcera (Arrieta *et al.*, 2005) Al grupo control se le administró el vehículo más etanol (Control de vehículos) y a un segundo grupo, L-NAME más etanol (Control de L-NAME) (Diagrama 2).

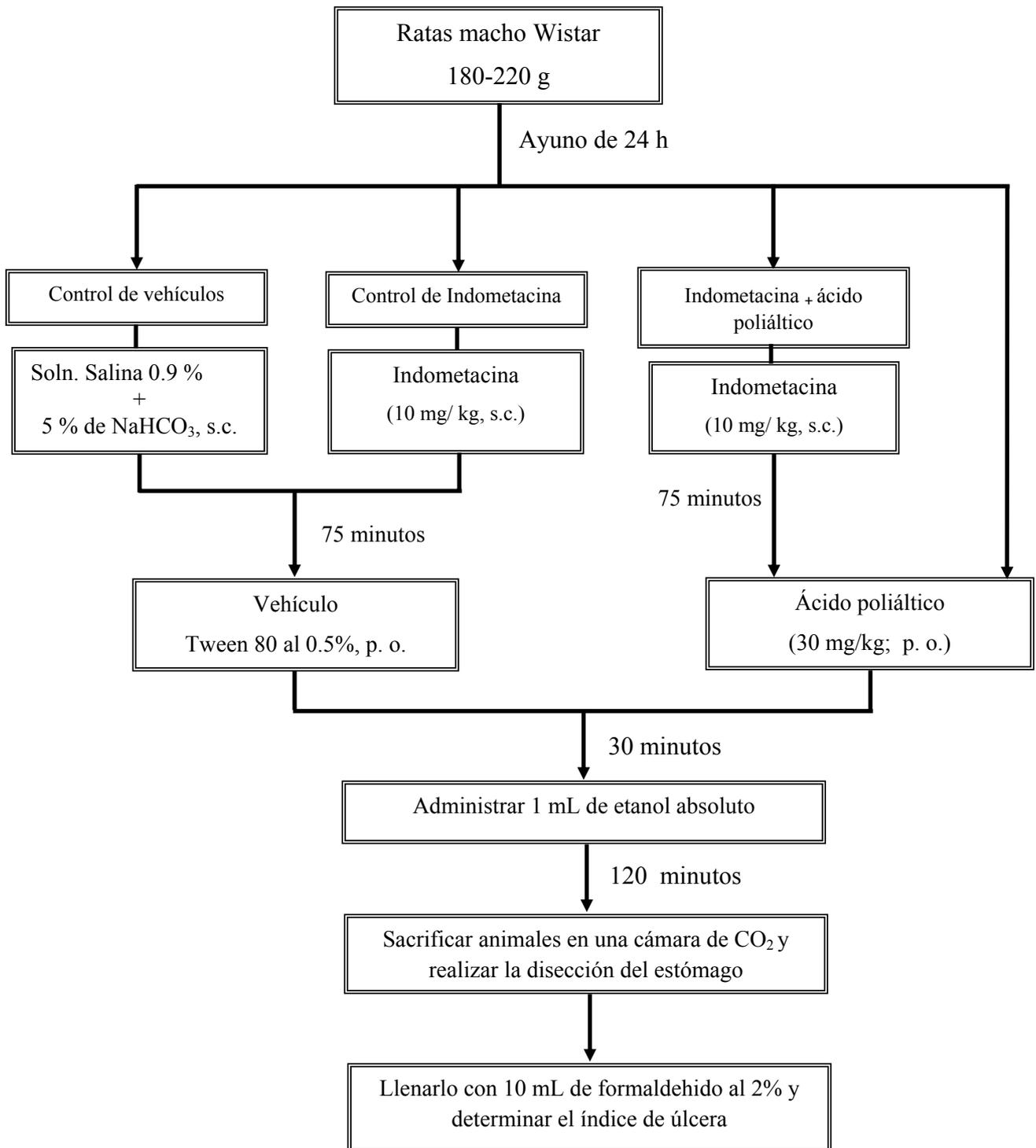


Diagrama 1. Evaluación de la participación de las prostaglandinas endógenas en la gastroprotección del ácido poliáltico aislado de *C. reflexifolius* en ratas pretratadas con indometacina

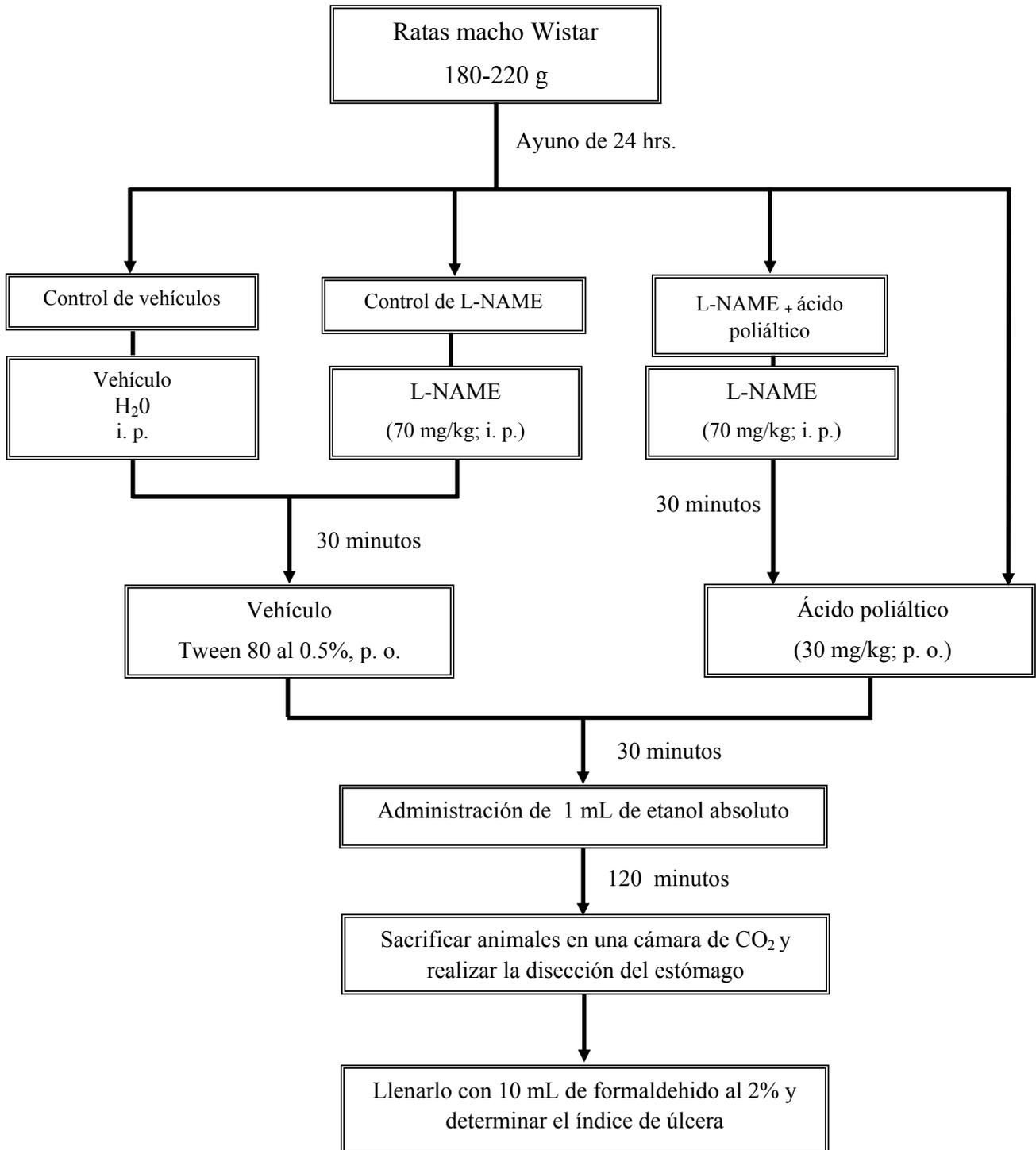


Diagrama 2. Evaluación de la participación del óxido nítrico endógeno en la gastroprotección del ácido poliáltico aislado de *C. reflexifolius* en ratas pretratadas con L-NAME.

8.10. Lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con NEM

Para analizar la participación de los grupos sulfhidrilo en la gastroprotección del ácido poliálgico, se administró 10 mg/kg de NEM, 30 minutos después se administró 30 mg/kg de ácido poliálgico, 30 minutos más tarde se administró 1 mL de etanol absoluto a cada rata, trascurridos 120 minutos se sacrificaron las ratas y se determinó el índice de úlcera (Arrieta *et al.*, 2005). Al grupo control se le administró el vehículo más etanol (Control de vehículos) y a un segundo grupo, NEM más etanol (Control de NEM) (Diagrama 3).

8.11. Análisis Estadístico

Los datos se presentan como el promedio \pm EEM de siete a diez ratas por grupo. Para determinar las diferencias significativas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn's. Se consideraron diferencias significativas para un valor de $p < 0.05$.

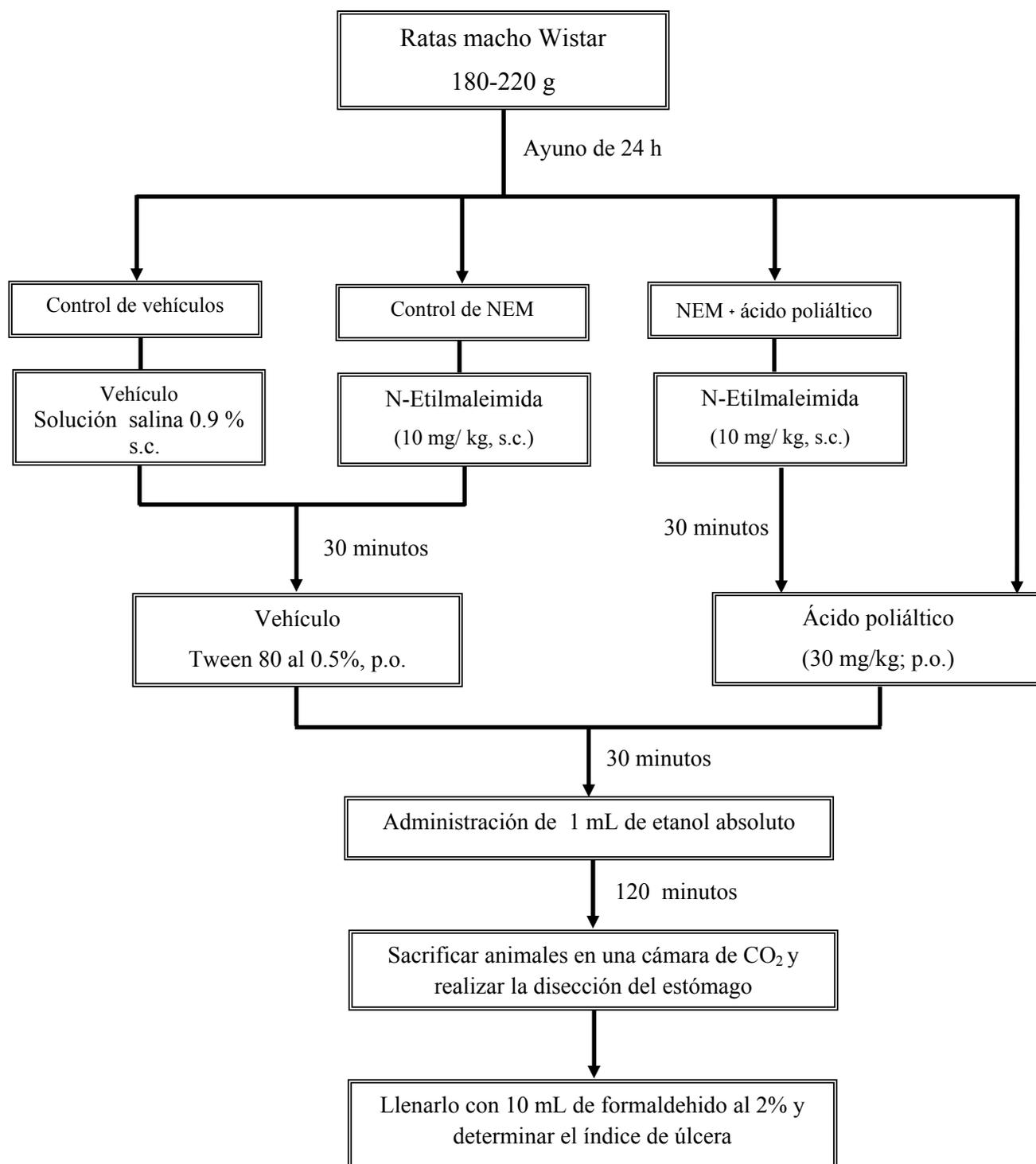


Diagrama 3. Evaluación de la participación de los grupos sulfhidrido en la gastroprotección del ácido poliáltico aislado de *C. reflexifolius* en ratas pretratadas con NEM.

IX. RESULTADOS

Los resultados de la evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos de hexano, diclorometano y metanol de *C. reflexifolius* se presentan en el cuadro 1, los cuales fueron evaluados en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas Wistar. El extracto hexánico mostró un efecto gastroprotector dependiente de la dosis, obteniéndose el máximo efecto con la dosis de 100 mg/kg (64.38 ± 7.72 % de gastroprotección), siendo más activo que los extractos de diclorometano y metanol. De las seis fracciones (F1-F6) obtenidas de la cromatografía en columna del extracto de hexano, resultó que F3 fue la fracción con mayor actividad gastroprotectora (83.28 ± 4.52 %, 100 mg/kg) como se puede observar en el cuadro 2. Del fraccionamiento de F3, se aisló un compuesto puro, identificado como ácido poliáltico, el cual presentó un efecto gastroprotector dependiente de la dosis, alcanzándose el máximo efecto con la dosis de 30 mg/kg (65.26 ± 7.71 % de gastroprotección (Figura 5). Además del ácido poliáltico, en esta misma fracción también se aisló al β -sitosterol (50 mg) y β -lupeol (60 mg). Dichos metabolitos no se consideraron en este trabajo debido a la escasa cantidad obtenida y al hecho de que sus efectos gastroprotectores ya son bien conocidos (Lewis y Hanson, 1991; Arrieta *et al.*, 2005).

Como se mencionó previamente, por razones de comparación, se evaluó la carbenoxolona. Los resultados sugieren que este triterpeno provoca una inhibición dosis dependiente sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol (Figura 6), los cuales no mostraron diferencia significativa en relación con la inhibición producida por el ácido poliáltico. El máximo efecto gastroprotector inducido por la carbenoxolona fue de 66.78 ± 7.81 % con la dosis de 30 mg/kg.

Cuadro 1. Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos de *Croton reflexifolius* en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	GP (%)
Extracto de hexano	1	8	22.57 ± 10.71*
	3	8	32.83 ± 7.02*
	10	8	49.50 ± 7.80*
	30	8	57.22 ± 7.01*
	100	8	64.38 ± 7.72*
Extracto de diclorometano	10	8	44.24 ± 9.90*
	30	8	40.49 ± 6.83*
	100	8	53.83 ± 5.15*
Extracto de metanol	10	7	4.82 ± 9.67
	30	7	23.64 ± 8.81*
	100	7	35.74 ± 7.75*

*P < 0.05 versus grupo control. El índice de úlcera del grupo control para esta evaluación fue 63.48 ± 8.64.

GP, Gastroprotección

Cuadro 2. Efecto gastroprotector de las fracciones F1 a F6 del extracto de hexano sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	GP (%)
F1	100	10	52.12 ± 7.54*
F2	100	10	65.59 ± 8.70 *
F3	100	10	83.28 ± 4.52*
F4	100	10	52.73 ± 9.69*
F5	100	10	56.30 ± 8.61*
F6	100	10	52.96 ± 8.96*

*P < 0.05 versus grupo control. El índice de úlcera del grupo control para esta evaluación fue 76.10 ± 8.61.

GP, Gastroprotección.

9.1. Efecto de la indometacina, L-NAME y NEM en la actividad gastroprotectora.

Los índices de úlcera obtenidos de las ratas tratadas con L-NAME (71.11 ± 9.11 mm², Figura 7), indometacina (64.90 ± 6.72 mm², Figura 8) ó NEM (73.62 ± 9.94 mm², Figura 9) no presentan diferencias significativas (P < 0,05) cuando se comparan con sus correspondientes controles (79.11 ± 9.88, 71.71 ± 9.94 y 67.50 ± 9.53 mm²,

respectivamente). La dosis utilizada para cada inhibidor es la óptima para bloquear la síntesis de prostaglandinas, la sintasa de óxido nítrico y los grupos sulfhidrilo endógenos, sin producir úlceras o agravar aquellas que estén presentes con anterioridad (Arrieta *et al.*, 2005).

Con respecto a la evaluación de la posible participación del óxido nítrico, al administrar previamente L-NAME, se inhibió el efecto gastroprotector del ácido poliáltico y de la carbenoxolona como se muestra en la Figura 7 por lo que no existe una diferencia estadísticamente significativa cuando se comparan con el control de L-NAME.

La administración previa de indometacina (10 mg/kg), no modificó el efecto gastroprotector del ácido poliáltico (30 mg/kg), el máximo índice de úlcera alcanzado fue de $37.17 \pm 7.92 \text{ mm}^2$ y para el cual, existe diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó con el control de indometacina ($64.90 \pm 6.72 \text{ mm}^2$). Por otra parte, el pretratamiento con indometacina revirtió el efecto gastroprotector de la carbenoxolona (Figura 8), en donde el índice de úlcera fue de $74.65 \pm 9.47 \text{ mm}^2$, este valor no es estadísticamente diferente al valor obtenido del control de indometacina.

La administración oral de ácido poliáltico y carbenoxolona en ratas pretratadas con NEM (10 mg/kg) agravó las lesiones gástricas inducidas por etanol. Para este caso, el índice de úlcera obtenido después de la administración de ácido poliáltico fue $67.70 \pm 8.75 \text{ mm}^2$ y 59.45 ± 7.18 para la carbenoxolona, valores que no presentan diferencia significativa cuando son comparados con el control de NEM (Figura 9).

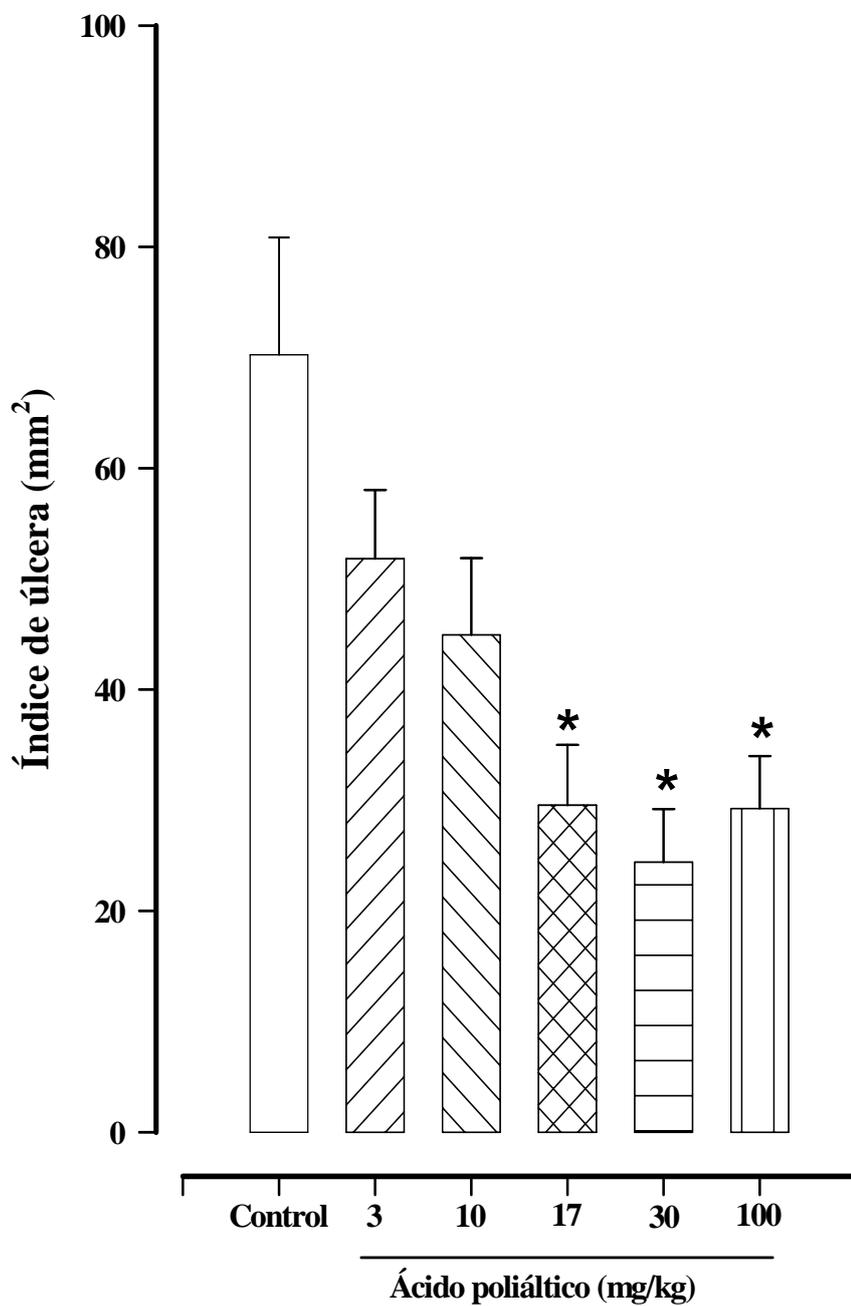


Figura 5. Efecto gastroprotector de las diferentes dosis de ácido poliáltico sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas. Cada barra representa el promedio \pm EEM (n = 7-10). *P < 0.05 comparado con respectivo control.

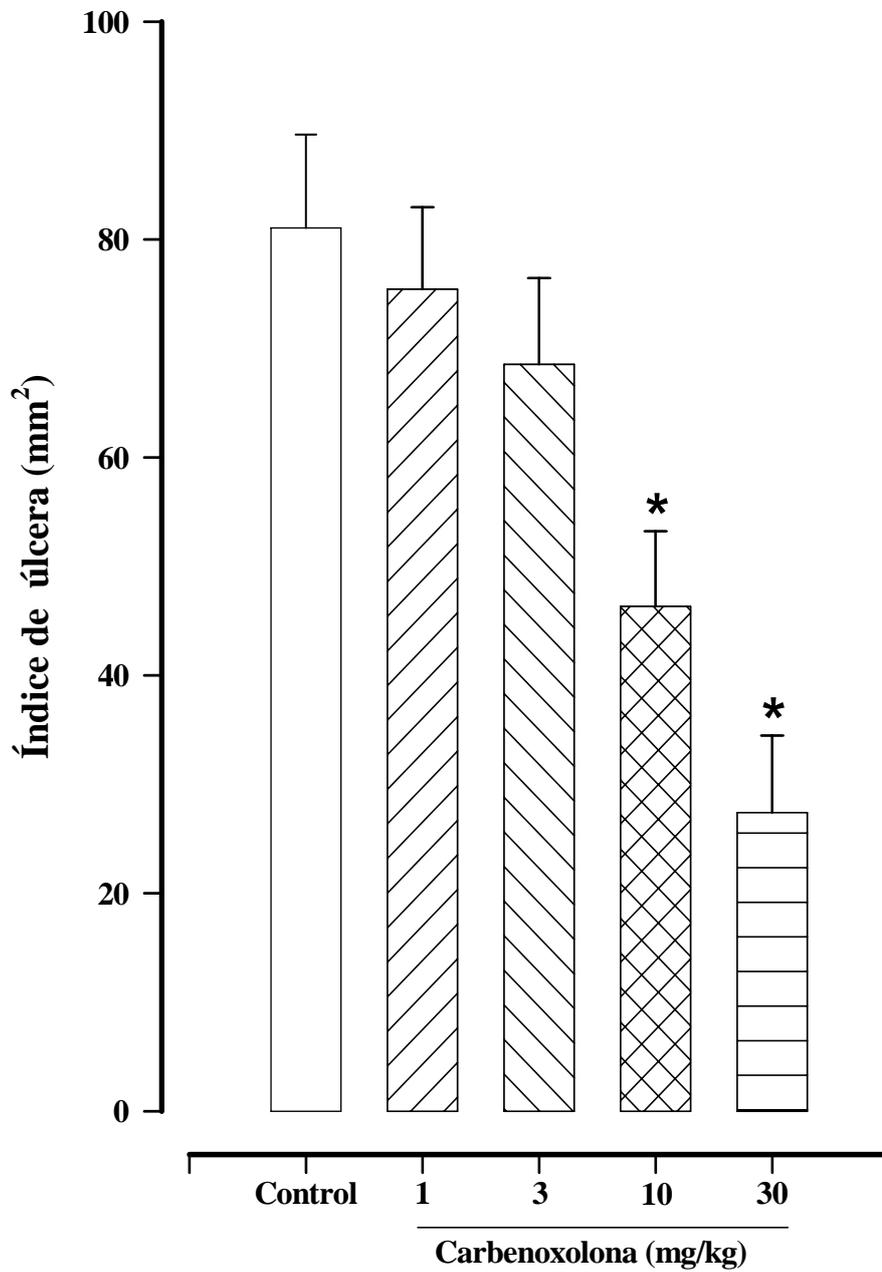


Figura 6. Efecto gastroprotector de las diferentes dosis de carbenoxolona sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas. Cada barra representa el promedio \pm EEM (n = 7-10). *P < 0.05 comparado con respectivo control.

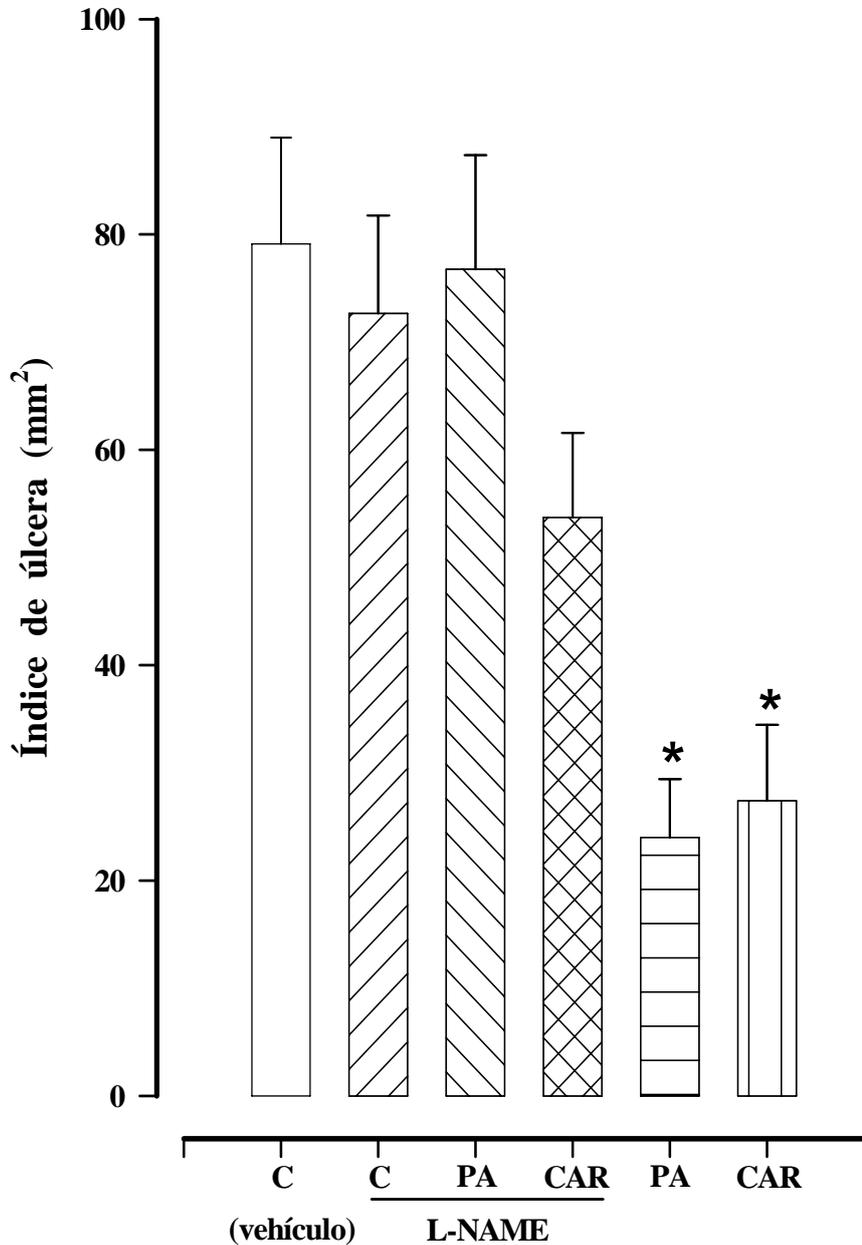


Figura 7. Efecto gastroprotector del ácido poliáltico (PA) y carbenoxolona (CAR) con la dosis de 30 mg/kg sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con L-NAME (70 mg/kg). Cada barra representa el promedio \pm EEM (n = 7-10). *P < 0.05 comparado con respectivo control.

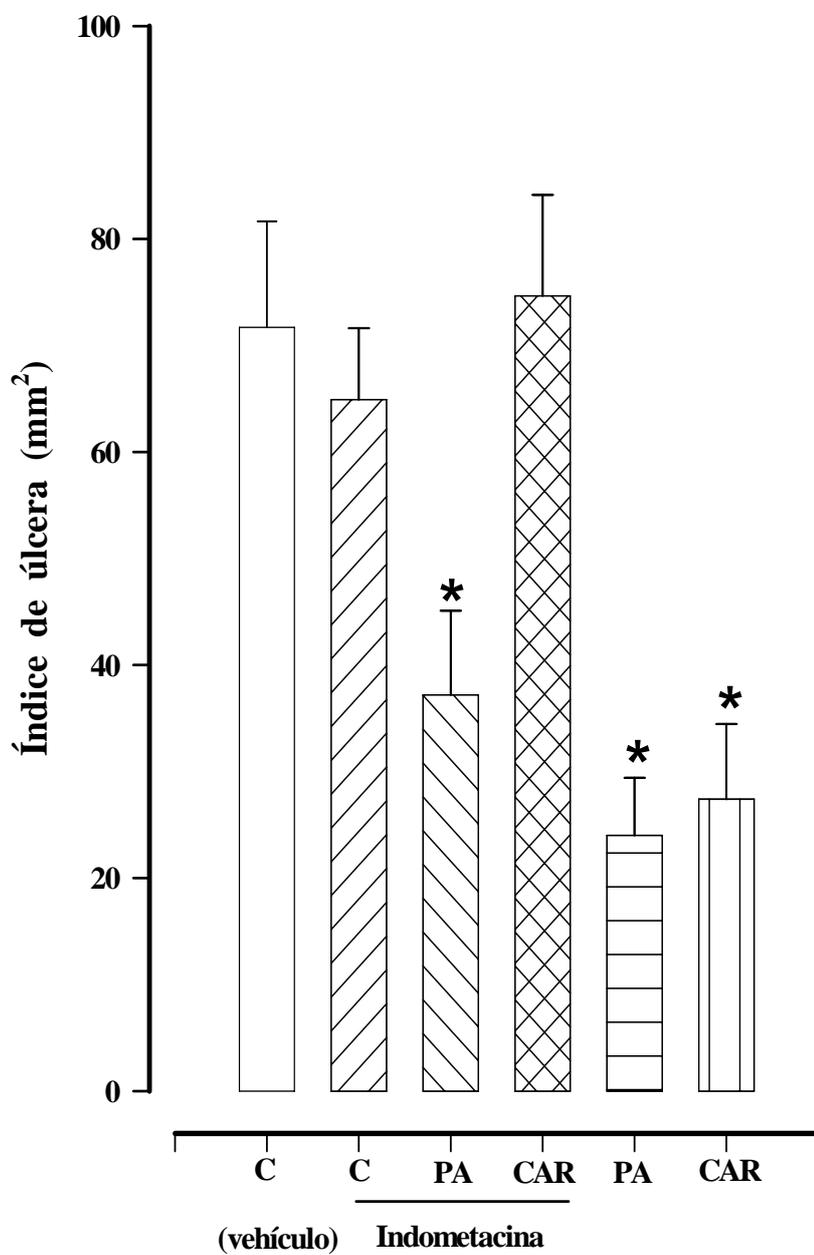


Figura 8. Efecto gastroprotector del ácido poliáltico (PA) y carbenoxolona (CAR) con la dosis de 30 mg/kg sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con indometacina (10 mg/kg). Cada barra representa el promedio \pm EEM (n = 7-10). *P < 0.05 comparado con respectivo control.

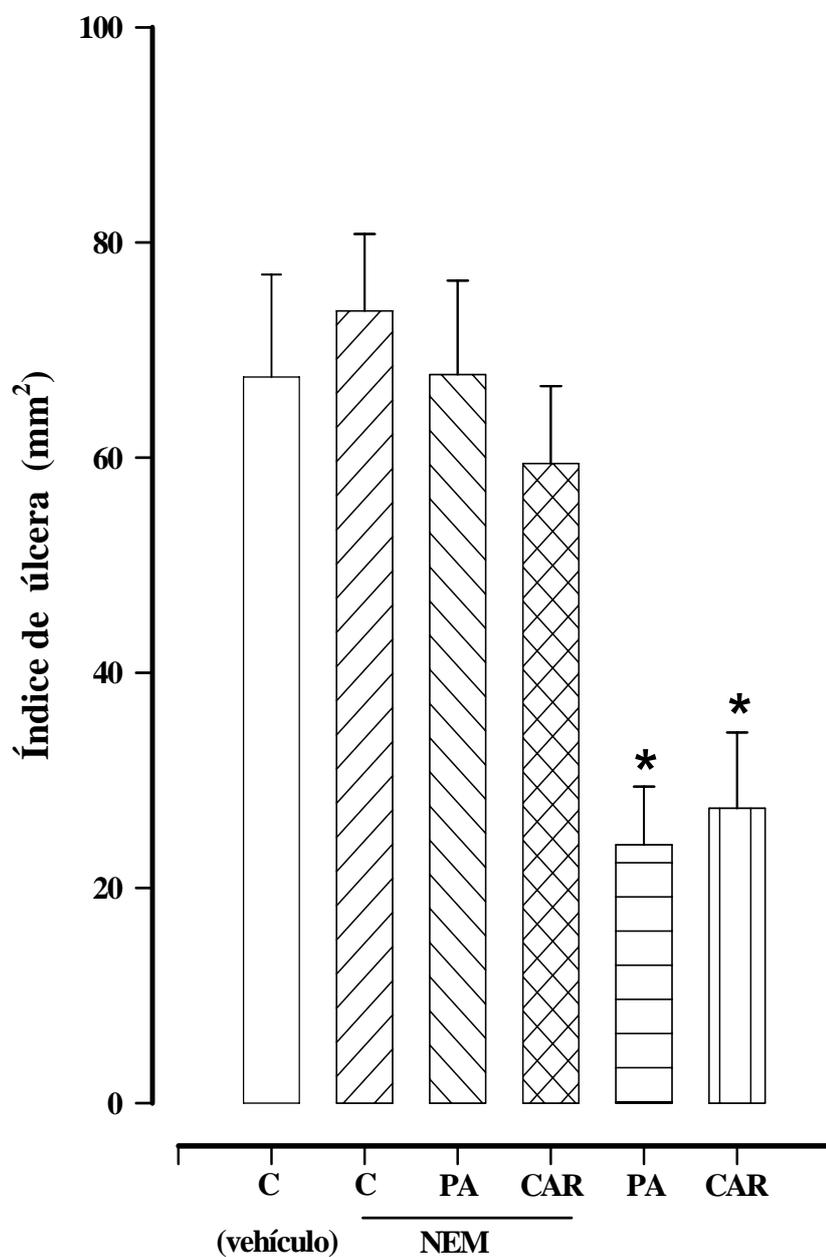


Figura 9. Efecto del ácido poliáltico (PA) y carbenoxolona (CAR) con la dosis de 30 mg/kg sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con NEM (10 mg/kg). Cada barra representa el promedio \pm EEM (n = 7-10). *P < 0.05 comparado con respectivo control.

X. DISCUSIÓN

El presente trabajo es un estudio preliminar, el cual proporciona un apoyo científico al uso de *Croton reflexifolius* en el tratamiento de las úlceras gástricas (Estrada, 1985). De los extractos obtenidos a partir de las hojas de esta planta, se encontró que el extracto hexánico presentó la mayor actividad gastroprotectora, alcanzándose el mayor efecto con la dosis de 100 mg/kg ($64.38 \pm 7.72\%$ de gastroprotección) en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas. A partir de la F3, obtenida del fraccionamiento de este extracto, se aisló un compuesto puro identificado como ácido poliáltico, el cual es considerado uno de los principales metabolitos activos de *C. reflexifolius*, el cual presentó un efecto gastroprotector máximo de $65.26 \pm 7.71\%$ con la dosis de 30 mg/kg. Curiosamente, el efecto máximo del ácido poliáltico como compuesto puro fue inferior a la obtenida con F3 ($83.28 \pm 4.52\%$), esto se puede atribuir a que en esta fracción también se aislaron al β -lupeol y β -sitosterol, a los que se les conocen ya bien su actividad gastroprotectora (Arrieta *et al.*, 2005; Lewis & Hanson, 1991).

Se ha demostrado que el género *Croton* posee un alto contenido de diterpenoides, siendo el ácido poliáltico también un diterpenoide. (Block *et al.*, 2004). Plantas que contienen diterpenoides han demostrado actividad antiulcerosa en varios modelos experimentales de la úlcera (Melo *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006). Por lo que el efecto gastroprotector del ácido poliáltico es una nueva propiedad farmacológica e independiente a los efectos biológicos reportados, los cuales consisten en actuar como un repelente del caracol marino monodonta (Ohta y Nawamaki, 1978) y de la actividad anti-mutagénica (Miyazawa *et al.*, 1995).

10.1. Determinación de la participación del óxido nítrico en el efecto gastroprotector del ácido poliáltico

Se conoce que el óxido nítrico está implicado en la modulación de la integridad de la mucosa gástrica por medio de la regulación de ácido, secreción de moco bicarbonato y flujo sanguíneo (Calatayud *et al.*, 2001). En un intento de proporcionar información sobre la participación del óxido nítrico en la gastroprotección del ácido poliáltico, se utilizaron ratas tratadas previamente con L-NAME (un inhibidor no selectivo de la sintasa de óxido nítrico). Los resultados de este estudio mostraron que la administración previa de L-NAME inhibió el efecto gastroprotector del ácido poliáltico y de la carbenoxolona (Figura 7). Lo cual sugiere que el óxido nítrico está involucrado en la gastroprotección del ácido poliáltico y de la carbenoxolona, siendo este último, un fármaco obtenido a partir de una fuente natural.

10.2. Determinación de las prostaglandinas en el efecto gastroprotector del ácido poliáltico.

La integridad de la mucosa gástrica necesita de una regeneración continua de la prostaglandina E₂ y la prostaciclina PGI₂. La mayoría de los mecanismos de defensa de la mucosa son estimulados o facilitados por las prostaglandinas endógenas o exógenas, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en el sistema digestivo y están involucradas en cierto número de procesos fisiológicos incluyendo la motilidad, flujo sanguíneo, secreción de moco-bicarbonato y reducción de la secreción de ácido (Atay *et al.*, 2000). De acuerdo a los resultados obtenidos, se muestra que las prostaglandinas no participan en el mecanismo de gastroprotección del ácido poliáltico, debido a que el

efecto de este diterpenoide no fue alterado por el tratamiento previo con indometacina, un inhibidor no específico de la ciclooxigenasa (Wan y Gottfried, 1985). En cambio, la acción gastroprotectora de la carbenoxolona si fue inhibida por el pretratamiento con indometacina, el cual inhibe la síntesis de prostaglandinas provocando un incremento en la susceptibilidad del daño en la mucosa gástrica (Atay *et al.*, 2000; Arrieta *et al.*, 2005).

10.3. Determinación de la participación de los grupos sulfhidrilo en la gastroprotección del ácido poliáltico

Se ha demostrado que durante el desarrollo del daño gástrico inducido por el etanol existe una disminución en los grupos sulfhidrilo de la mucosa gástrica. Estos compuestos neutralizan los radicales libres producidos durante el daño al tejido por agentes nocivos. Además, los grupos sulfhidrilo producen subunidades de moco mediante la formación de puentes de disulfuro y así reducen los radicales libres los cuales son eliminados por el moco, donde se vuelven solubles en agua (Ávila *et al.*, 1996; Maity *et al.*, 1998). Para investigar la implicación de estos grupos en el efecto gastroprotector del ácido poliáltico, se administró previamente N-etilmaleimida, un bloqueador de los grupos sulfhidrilo. Los resultados muestran una inhibición en el efecto gastroprotector del ácido poliáltico y el de la carbenoxolona. Esto sugiere que los grupos sulfhidrilo endógenos participan en la gastroprotección del diterpenoide así como del compuesto de referencia.

XI. CONCLUSIONES

1.- Se demostró que *Croton reflexifolius* presenta actividad gastroprotectora contra las lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas Wistar, de tal manera que con los resultados de este trabajo se proporciona una evidencia científica sobre la eficacia de esta planta en el tratamiento de la úlcera gástrica.

2.- El ácido poliáltico, aislado del fraccionamiento del extracto hexánico, es uno de los metabolitos responsables de la actividad gastroprotectora de *C. reflexifolius*.

3.- En el mecanismo de acción gastroprotector del ácido poliáltico están implicados de manera importante el óxido nítrico endógeno y los grupos sulfhidrilo, pero no las prostaglandinas.

XII. PERSPECTIVAS

- 1.- Realizar los estudios de toxicidad, DE₅₀.
- 2.- Cuantificar los niveles de nitratos y grupos sulfhidrilo en el jugo gástrico de ratas al administrar ácido poliáltico en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol.
- 3.- Determinar si las neuronas sensibles a capsaicina están implicadas en el mecanismo de acción gastroprotector del ácido poliáltico.
- 4.- Evaluar la actividad gastroprotectora de *C. reflexifolius* en el modelo de úlcera gástrica inducida con ácido acético.
- 5.- Estudiar otros posibles mecanismos de acción del ácido poliáltico, en donde se involucre la vía antisecretora.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Salam, O.M.E., Czimmer, J., Debreceeni, A., Szolcsányi, J., Mózsik, G. (2001). Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *J of Physiology Paris* **95**:105-127.
- Abdel-Salam, O.M.E., Decrecen, A., Mózsik, G., Szolcsányi, J. (1999). Capsaicin-sensitive afferent sensory nerves in modulating gastric mucosal defense against noxious agents. *J of Physiology Paris* **93**:443-454.
- Allen, A. y Flemström, G. (2004). Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **288**:1-19.
- Arrieta, J. (2006) Participación del Óxido Nítrico, las Prostaglandinas, las Neuronas Sensibles a Capsaicina y los Grupos Sulfhidrilos en el Mecanismo de Acción Gastroprotector de los Metabolitos Activos de *Amphipterygium adstringens* y los Productos Naturales Estigmasterol, Astralósido IV y β -Lupeol. Tesis de doctorado. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional.
- Arrieta, J., Benitez, J., Flores, E., Castillo, C. y Navarrete, A. (2005). Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med.* **69**:905-909.
- Atay, S., Tarnawski, A. y Dubois, A. (2000). Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins Other. Lipid.Mediat.* **61**:105-124.
- Ávila, J.R., De la Lastra, C.A., Martín, M.J., Motilva, V., Luque, I., Delgado, D., Esteban, J. y Herrerías, J. (1996). Role of endogenous sulfhydryls and neutrophils infiltration in the

pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflamm. Res.* **45**: 83-88.

Bays, D. y Finch, H. (1990). Inhibitors of gastric acid secretion. *Nat. Prod. Rep.* 409-445.

Bertaccini, G. y Coruzzi, G. (1985). Pharmacology of the treatment of peptic ulcer disease. *Dig. Dis. Sci.* **30** (suppl. 11): 435.

Blecker, U. (1999). Gastritis and peptic ulcer disease in childhood. *Eur. J. Pediatr.* **158**:541-546.

Block, S., Baccelli, C., Tinant, B., Meervelt, L., Rozenberg, R., Habib, J., Llabres, G., Pauw-Gillet, M. y Quetin-Leclercq, J. (2004). Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. *Phytochem.* **65**:1165-1171.

Borrelli, F. e Izzo, A. (2000). The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother. Res.* **14**: 581-591.

Bruntom, L. (1996). Agents control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers. J. Hardman, P. Molinoff, Ruddon y A. Goodman (eds). Goodman and Gilman The pharmacological basis of therapeutics. 9th USA: Mc Graw Hill: 901-917.

Brzozowski, T. (2003). Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – polish achievements. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**: (S3) 99-126.

Cabrera, M.J, (2007). Farmacología de los medicamentos más utilizados para inhibir los efectos de la acidez a nivel esofagoduodenal. Gastroenterología, Farmacología, Cursos de Medicina.

Calatayud, S., Borrachina, M.D., Espulgues, J.V. (2001). Nitric oxide: relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa. *Microsc. Res. Tech.* **53**: 325-335.

- Carreras, C.R., Rossomondo, P.C., Giordano, O.S. (1998). Entlabdanes in *Eupatorium buniifolium*. *Phytochemistry* **48**:1031-1034.
- Cho, C.H. (2001). Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. *J of Physiology Paris* **95**:253-256.
- Dembiński, A., Warzecha, Z., Ceranowicz, P., Brzozowski, T., Dembiński, M., Konturek, S., Pawlik, W. (2005). Role of capsaicin-sensitive nerves and histamine H₁, H₂ and H₃ receptors in the gastroprotective effect of histamine against stress ulcers in rats. *European Journal of Pharmacology* **508**: 211-221.
- Ekblad, E., Mei, Q., Sudler, F. (2000). Innervation of the Gastric Mucosa. *Microscopy Research and Technique* **48**: 241-257.
- Estrada, E. (1985). Jardín Botánico de Plantas Medicinales Maximino Martínez. Universidad Autónoma Chapingo, México, p. 12.
- Falcão, H.S., Mariath, I.R., Diniz, M.F.M., Batista, L.M., Barbosa-Filho, J.M. (2008). Plants of the American continent with antiulcer activity. *Phytomed.* **15**:138-146.
- Feldman, M., Richardson, C., Lam, S., Samloff, M. (1988). Comparison of gastric acid secretion rates and serum pepsinogen I and II concentrations in occidental and oriental duodenal ulcer patients. *Gastroenterol.* **95**: 630-635.
- Flórez, J., Espulgues, V. (1999). Farmacología de la secreción ácida y de la ulceración de la mucosa digestiva en J. Flórez, J. Armijo y Mediavilla A. *Farmacología Humana*. 3ª, Masson: 756-784.
- Giercksky, K., Haglund, U., Rask-Madsen, J. (2000). Selective Inhibitors of COX-2-Are They Safe fo the Stomach? *Scand. J. Gastroenterol.* **11**: 1121-1124.

- Gires, K. (2005) Gastric Mucosal Protection: From Prostaglandins to Gene-Therapy. *Current Medicinal Chemistry* **12**: 203-215.
- González-Vázquez, R., King, B., Aguilar, M., Diego, N., Lotina-Hennsen, B. (2006). Pachypodol from *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. as Water-Splitting Enzyme Inhibitor on Thylakoids. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 1217-1221.
- Gupta, M., Nath, R., Bhargava, K. (1981). *Ind. J. Res.* **73**:649-652.
- Guth, P. (1973). Experimental production of peptic ulcer. *Gastroenterol.* **64**: 1187-88.
- Hoogerwerf, W., Pasricha, P.J. (2001). Agents used for control of gastric and treatment of peptic ulcers and gastroesophageal reflux disease. In J.G. Hardman, L.L.Limbird y A.G. Gilman (eds). Goodman and Gilman. The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. Ed. Mc Graw Hill. USA.1005-1020.
- Jones, M.P. (2006). The role of psychosocial factors in peptic ulcer disease: Beyond *Helicobacter pylori* and NSAIDs. *Journal of Psychosomatic Research* **60**: 407-412.
- Konturek, P.C., Konturek, S.J., Hahn, E.G. (2004). Duodenal alkaline secretion: its mechanisms and role in mucosal protection against gastric acid. *Digestive and Liver Disease* **36**: 505-512.
- Konturek, S.J. (1990). Mechanism of gastroprotection growth factor in gastroprotection and ulcer healing. *Scand. J. Gastroenterol.* **23**:129-133.
- Kulich, W., Wallner, H., Klein, G. (1994). Detección de la Concentración de Pepsinógeno Sérico I y II en la Tolerancia Gastroduodenal al S(+)-Ibuprofeno. *Wien Klin Wochenschr* **106**:208-211.
- La Casa, C., Villegas, I., Alarcón de la Lastra, C., Motilva, V. y Martín-Calero, M.J. (2000). Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol.* **71**: 45-53.

- Lanas, A.I., Blas, J.M., Ortego, J., Soria, J., Sáinz, R. (1997). Adaptation of Esophageal Mucosa to Acid- and Pepsin-Induced Damage. Role of Nitric Oxide and Epidermal Growth Factor. *Digestive Disease and Science* **42** (5):1003-1012.
- Lewis, D., Hanson, P. J. (1991). Anti-ulcer drugs of plant origin. *Prog. Med. Chem.* **28**: 203-234
- Ma, L., Chow, J.Y. y Chow, C.H. (1999) Cigarette smoking delays ulcer healing: role of constitutive nitric oxide synthase in rat stomach. *Am. J. Physiol.* **276**: G238-G248.
- Maity, S., Rajan, J., Kumar, D. (1998). Role of glutation in the antiulcer effect of hot water extracto f black tea (*Camellia sinensis*). *Jpn. J. Pharmacol.* **78**:285-292.
- Melo, P.S., Duran, N., Hiruma-Lima, C.A., Souza-Brito, A.R., Haun, M. (2003). Comparison of the gastroprotective effect of a diterpene lactone isolated from *Croton cajucara* with its synthetic derivatives. *J Ethnopharmacol.* **87**:169-174.
- Mendoza-Sánchez, M.E. (2003). Actividad Gastroprotectora de Estigmasterol sobre las Lesiones Gástricas Inducidas por Etanol en Ratas Wistar. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S., Kameoka, H. (1995). Antimutagenic activity of (+)-polyalthic acid from *Vitex rotundifolia*. *J. Agric. Food Chem.* **43**:3012-3015.
- Mojžiš, J., Hegedúšová, R., Mirossay, L. (2000). Role of Mucus in Ischemia/Reperfusion-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. *Physiol. Res.* **49**: 441-446.
- Navarrete, A., Trejo-Miranda, J. y Reyes-Trejo, L. (2002). Principles of root bark *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *J. Ethnophya.* **79**:383-388.

- Norma Oficial Mexicana sobre el Cuidado y Manejo de Animales NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Estados Unidos Mexicanos. SAGARPA.
- Ohta, K., Nawamaki, T. (1978). (+)-Polyalthic acid, a repellent against a sea snail *Monodonta neritoides*. *Agric. Bio Chem.* **42**:1957-1958.
- Page, C., Curtis, M., Sutter, M., Walker, M., Hoffman, B. (1998). Farmacología integrada. España: Harcourt, pág. 305-309.
- Peskar, B.M. (2001). Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense. *Journal of Physiology and Pharmacology* **52**(4): 555-568.
- Phillipson, M. (2004). Acid Transport through Gastric Mucus. *Upsala J. Med. Sci.* **109**: 1-24.
- Pradilla-Vesga, O.E. (2004). Ciclooxigenasa 3: La nueva iso-enzima en la familia. *Med UNAB* **7**(21): 181-183.
- Ramakrishnan, K., Salinas, R. (2007). Peptic Ulcer Disease. *American Family Physician* **76**(7):1005-1012.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. (2000). Farmacología. 4ª ed. España: Harcourt.
- Repetto, M.G., Llesy, S.F. (2002). Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcer. *Brazilian J. Med. Res.* **35**(5): 523-534.
- Robert, A. (1979). Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterol.* **77**: 761-767.
- Ruíz-Chávez, R. (1996). El ácido gástrico. *Revista de Gastroenterología del Perú* **16**(3).
- Salatino, A., Salatino, M.L., Negri, G. (2007). Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species. *J.Braz. Chem. Soc.* **18**(1): 11-33.
- Secretaría de Salud (2006): <http://www.secretariadesalud.org.mx>

- Secretaría de Salud del Gobierno del Distrito Federal (2005). Principales causas de mortalidad en el Distrito Federal en el periodo de 2001-2005. [http://www. Secretariadesalud.org.mx](http://www.Secretariadesalud.org.mx)
- Smith, H., Their, O. (1989). Fisiopatología. Principios biológicos de la enfermedad. 2ª ed. Argentina: Panamericana.
- Snykers, F., Fourie, T. (1989). *Eur. Patent*. EP 93520. EN. 100:39613.
- Takahashi, S., Takeuchi, K., Okabe, S. (1999). EP₄ Receptor Mediation of Prostaglandin E₂-Stimulated Mucus Secretion by Rabbit Gastric Epithelial Cell. *Biochemical Pharmacology* **58**: 1997-2002.
- Takeuchi, K., Kagawa, S., Mimaki, H., Aoi, M., Kawauchi, S. (2002). COX and NOS Isoform Involved in Acid-Induced Duodenal Bicarbonate Secretion in Rats. *Digestive Diseases and Sciences* **47**: 2116-2124.
- Terrones, L. (2006). Efecto Gastroprotector de Astragalósido IV: Rol de Prostaglandinas, Grupos Sulfhidrilos y Oxido Nítrico. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Tsukimi, Y., Okabe, S. (2001). Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat store proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biolo. Pharm. Bull.* **24**: 1-9.
- Wan, B., Gottfried, S. (1985). Cytoprotective action of carbenoxolone sodium on ethanol-induced gastric lesions in rats and its inhibition by indometacin. *J. Pharm. Pharmacol.* **37**:739-741.
- West, S.D., Mercer, D.W. (2004). Cholecystokinin-Induced Gastroprotection: A Review of Current Protective Mechanisms. *Digestive Disease and Science* **49** (3):361-369.
- Wyngaarde, S. (1985). Tratado de medicina interna. Vol. 1. 16ª ed. Ed. Interamericana México D. F.

- Zhang, B., He, X.L., Ding, Y., Du, GH. (2006). Gaultherin, a natural salicylate derivative from *Gaultheria yunnanensis*: towards a better non-steroidal anti-inflammatory drug. *Eur. J. Pharmacol.* **530**:166-171.
- Zhang, J., Yan, C., Zhan, Y., Gao, W., Zhai, X. (1990). Effect of Scopolia drugs on the gastric mucosal lesions in rats. *Yaoxue Xuebao. Chem. Abstr.* **25**(2):90-4.

XIV. ANEXOS

14.1. Datos espectroscópicos

Ácido poliáltico, $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): $\delta = 7.35$ (1H, t, $J = 1.7$ Hz, H-15), 7.19 (1H, s, H-16), 6.26 (1H, s, H-14), 4.88 (1H, s, H-17), 4.59 (1H, s, H-17'), 1.15 (3H, s, H-19), 0.72 (3H, s, H-20), $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3): $\delta = 185.2$ (C-18), 147.7 (C-8), 142.7 (C-15), 138.6 (C-16), 125.4 (C-13), 110.9 (C-14), 107.0 (C-17), 56.0 (C-9), 49.4 (C-5), 47.5 (C-4), 38.8 (C-10), 37.9 (C-1), 37.7 (C-7), 37.0 (C-3), 26.8 (C-6), 23.9 (C-12), 23.4 (C-11), 18.4 (C-2), 16.2 (C-19), 14.7 (C-20). Estos datos corresponden con los reportados en la literatura (Carreras *et al.*, 1998).

14.2. Publicación

La presente investigación generó la siguiente publicación:

Reyes-Trejo, B., Sánchez-Mendoza, M.E., **Becerra-García, A.A.**, Cedillo-Portugal, E., Castillo-Henkel, C., Arrieta, J. (2008). Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer diterpenoid from *Croton reflexifolius*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **60**: 931-936.



Escuela Superior de Medicina,
Instituto Politécnico Nacional,
Plan de San Luis y Díaz Mirón,
Colonia Santo Tomás,
Delegación Miguel Hidalgo
11340, México D. F., México

María Elena Sánchez-Mendoza,
Anabel Ariana Becerra-García,
Carlos Castillo-Henkel,
Jesús Arrieta

Laboratorio de Productos
Naturales, Área de Química,
Universidad Autónoma
Chapingo, Apartado 74 Oficina
de Correos Chapingo, Texcoco,
México, 56230, México

Benito Reyes-Trejo,
Ernestina Cedillo-Portugal

Correspondence: J. Arrieta,
Escuela Superior de Medicina,
Instituto Politécnico Nacional,
Plan de San Luis y Díaz Mirón,
Colonia Santo Tomás,
Delegación Miguel Hidalgo
11340, México D.F., México.
E-mail: maestrojesus@
hotmail.com

**Funding and
acknowledgements:** This work
was supported by a grant from
the Escuela Superior de Medicina
del Instituto Politécnico Nacional
(México) (Proyecto 20070451).
We thank Bruce Allan Larsen for
his advice.

Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer diterpenoid from *Croton reflexifolius*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls

Benito Reyes-Trejo, María Elena Sánchez-Mendoza, Anabel Ariana Becerra-García, Ernestina Cedillo-Portugal, Carlos Castillo-Henkel and Jesús Arrieta

Abstract

Croton reflexifolius H. B. K. (Euphorbiaceae) is a very common medicinal plant in the Huastecan region of Mexico that, according to local folk medicine, is considered useful in the treatment of gastritis and gastric ulcer. We have aimed to test the validity of this practice by using the experimental model of an ethanol-induced gastric ulcer in male Wistar rats. The results showed that *C. reflexifolius* had gastroprotector activity, that the hexane extract had the highest protective activity ($64.38 \pm 7.72\%$), and that polyalthic acid isolated from this extract was the main active gastroprotector agent. Rats treated orally with polyalthic acid showed a gastroprotective effect similar to that elicited by carbenoxolone. As with carbenoxolone, the effect elicited by polyalthic acid was attenuated by pretreatment with either N^G-nitro-L-arginine methyl ester (70 mg kg^{-1} , i.p.), a nitric oxide (NO) synthase inhibitor, or N-ethylmaleimide (10 mg kg^{-1} , s.c.), a blocker of sulfhydryl groups. This suggested that the gastroprotective mechanism of this diterpenoid involved the participation of both NO and endogenous sulfhydryl groups. Contrary to carbenoxolone, the gastroprotective effect of polyalthic acid was not affected by the inhibition of prostaglandin synthesis with indomethacin (10 mg kg^{-1} , s.c.). In conclusion, *Croton reflexifolius* contains compounds with gastroprotector activity. Polyalthic acid, which was isolated from this plant, was the main compound with gastroprotector activity, having effectiveness similar to that found with the use of carbenoxolone. Whereas NO and sulfhydryl groups were involved in the mechanisms of gastroprotective action of polyalthic acid, prostaglandins were not.

Introduction

It is generally accepted that gastric ulcers are caused by a lack of balance between gastric aggressive factors and mucosal defensive mechanisms. The gastric mucosa is continuously exposed to potentially injurious agents such as gastric acid, pepsin, bile acid, food ingredients, bacterial products, and drugs. These agents increase gastric acid and pepsin secretion, decrease the gastric blood flow, suppress the endogenous generation of prostaglandins, inhibit mucosal growth and cell proliferation, and modify the gastric motility (Toma et al 2002). On the other hand, defensive mechanisms of the gastric mucosa consist mainly of functional, humoral and neural factors. Mucus-alkaline secretions, microcirculation and motility act as functional factors, prostaglandins (PGs) and nitric oxide (NO) as humoral factors, and capsaicin-sensitive sensory neurons (CPSN) as neuronal factors (Calatayud et al 2001; Tsukimi & Okabe 2001). Although many drugs have been effectively employed in the treatment of gastroduodenal ulcer and peptic diseases, all of these compounds have shown major shortcomings, such as the therapeutic failures observed in certain cases, adverse effects or high cost (Toma et al 2002). In the search for new therapeutic options, traditional medicinal plants are one source of natural products, such as triterpenes, diterpenes and flavonoids, among others with gastroprotective activity (Borrelli & Izzo 2000). The genus *Croton*, which comprises 700 species (Catalán et al 2003), is well known for its diterpenoid content, and many different types of diterpenes, such as phorbol esters, clerodane, labdane, kaurane, trachylobane etc. have been isolated from it (Block et al 2004). Some of

these substances have anti-hypertensive (Bacelli et al 2005), antifeedant (Nihei et al 2006) or anti-ulcerogenic (Rodriguez et al 2004) activity.

Croton reflexifolius H.B.K. (Euphorbiaceae) is a Huastecan medicinal plant called 'huilocuahuitl', and its leaves are commonly used as an infusion to treat cough, diabetes and gastric ulcers (Estrada 1985). Although this plant is commonly used by the healers and shamans of the Huasteca (Hidalgo State, Mexico) to cure gastric ulcers, there is no scientific report either validating or invalidating this therapeutic practice. Therefore, we decided to test the gastroprotector activity of *C. reflexifolius* and, upon validating such protective action, proceeded to identify the active compound or compounds. A bioassay-guided fractionation was performed and the compounds obtained were tested using the absolute ethanol-induced gastric ulcer experimental model in Wistar rats. The role of endogenous NO, sulfhydryl groups and prostaglandins in the gastroprotective effect was evaluated to provide information about the mechanism of action of these compounds. The results were compared with the effect of carbenoxolone.

Materials and Methods

General procedures

The ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in a CDCl_3 solution on a Bruker AVANCE-DMX 500 spectrometer, working at 500 and 125 MHz, respectively.

Plant material

Leaves of *C. reflexifolius* H.B.K were collected at Tehuetlan, in the state of Hidalgo, Mexico, during May of 2007. A specimen of the original collection can be found in the Herbarium of the Division de Ciencias Forestales, at the Universidad Autónoma Chapingo, with the voucher number CHAP60955.

Extraction and preliminary fraction

The leaves of *C. reflexifolius* were dried at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) in the shade. After grinding 5.2 kg leaves, compounds were successively extracted from them by maceration at room temperature ($22^\circ\text{C} \pm 2$) for three days, first with hexane ($32\text{L} \times 3$), then dichloromethane ($32\text{L} \times 3$) and finally methanol ($32\text{L} \times 3$). Evaporation of the solvents in vacuum gave 142, 128 and 401 g of syrupy residues, respectively. The hexane extract obtained from the leaves of *C. reflexifolius* showed the most active gastroprotective effect (Table 1). Thus 40 g of this extract was subjected to percolation over a silica gel column (0.063–0.200 mm, 250 g) by using a step gradient of hexane (1.7 L, fraction 1 (F1)), hexane/EtOAc (9:1, 1.7 L, F2), hexane/EtOAc (7:3, 1.7 L, F3), hexane/EtOAc (1:1, 1.7 L, F4), EtOAc (1.7 L, F5) and MeOH (1.7 L, F6). Fraction 3 (F3), which was the most active, was chromatographed on a silica gel column (300 g). Elution with hexane, hexane/EtOAc mixtures, EtOAc and MeOH afforded 50 fractions of 20 mL each. Fractions 17–40 (hexane/EtOAc, 95:5) yielded a white solid (1.0 g, mp $97\text{--}100^\circ\text{C}$) identified as polyalthic acid (Figure 1); its LC-MS spectrum showed a

Table 1 Gastroprotective effect of the extracts of *Croton reflexifolius* on ethanol-induced ulceration in rats

Treatment	Dose (mg kg ⁻¹)	n	Gastroprotection (%)
Hexane extract	1	8	22.57 ± 10.71*
	3	8	32.83 ± 7.02*
	10	8	49.50 ± 7.80*
	30	8	57.22 ± 7.01*
	100	8	64.38 ± 7.72*
Dichloromethane extract	10	8	44.24 ± 9.90*
	30	8	40.49 ± 6.83*
	100	8	53.83 ± 5.15*
Methanol extract	10	7	4.82 ± 9.67
	30	7	23.64 ± 8.81*
	100	7	35.74 ± 7.75*

* $P < 0.05$ compared with control group. The ulcer index in the control group for this evaluation was 63.48 ± 8.64 .

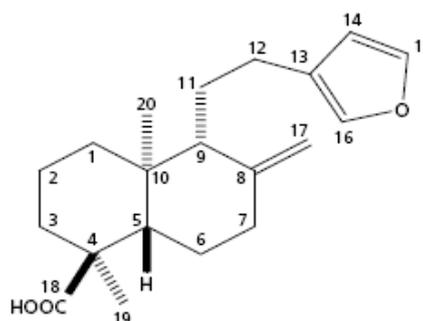


Figure 1 The structure of polyalthic acid.

purity of 91% (Carreras et al 1998), as well as yielding β -sitosterol and β -lupeol.

Phytochemical data

Polyalthic acid, ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 7.35$ (1H, t, $J = 1.7$ Hz, H-15), 7.19 (1H, s, H-16), 6.26 (1H, s, H-14), 4.88 (1H, s, H-17), 4.59 (1H, s, H-17'), 1.15 (3H, s, H-19), 0.72 (3H, s, H-20), ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 185.2$ (C-18), 147.7 (C-8), 142.7 (C-15), 138.6 (C-16), 125.4 (C-13), 110.9 (C-14), 107.0 (C-17), 56.0 (C-9), 49.4 (C-5), 47.5 (C-4), 38.8 (C-10), 37.9 (C-1), 37.7 (C-7), 37.0 (C-3), 26.8 (C-6), 23.9 (C-12), 23.4 (C-11), 18.4 (C-2), 16.2 (C-19), 14.7 (C-20). These data corresponded with those in the literature (Carreras et al 1998).

Animals

All the experiments were performed with male Wistar rats (180–220 g; from the animal house of the Universidad Autónoma Chapingo). Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and in compliance with international rules on care and use of laboratory animals. Unless otherwise

specified, the rats were placed in single cages with wire-net floors and deprived of food 24 h before experimentation, but were allowed free access to tap water throughout. All experiments were carried out using 7–10 animals per group.

Drugs and dosage

Carbenoxolone (Sigma-Aldrich Co.) was used as the gastro-protective reference drug. The drugs were prepared freshly each time, suspended in 0.5% Tween 80 and administered by the intragastric route. Control rats received the vehicle (0.5% Tween 80) in the same volume (0.5 mL/100 g) and by the same route. N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), N-ethylmaleimide (NEM) and indometacin were purchased from Sigma Chemical Co. (USA).

Acute gastric ulcer induced by absolute ethanol

Gastric ulcer was induced by administering absolute ethanol orally (1 mL) as described by Robert (1979). The extracts or drugs were administered to different groups 30 min before ethanol administration. Two hours after ethanol administration, the animals were killed in a CO₂ chamber. The stomach and duodenum were dissected out, inflated with 10 mL formalin, and then placed in 2% formalin for 5 min to fix both the inner and outer layers. The duodenum was opened along its anti-mesenteric side and the stomach along the greater curvature. The damaged area (mm²) was measured under a dissection microscope (×10) with an ocular micrometer. The sum of the area of all the lesions in the corpus of each animal was calculated and served as the ulcer index. Gastroprotection (%) was calculated according to: % gastroprotection = (UIC–UIT) × 100/UIC, where UIC is the ulcer index in control and UIT is the test animal's index (Matsuda et al 1999; Arrieta et al 2003).

Ethanol-induced gastric mucosal lesions in L-NAME pretreated rats

To investigate the involvement of endogenous NO in the gastroprotective effects of the compounds, L-NAME (70 mg kg⁻¹ dissolved in saline solution) was intraperitoneally injected in the three experimental groups 30 min before the administration of either the vehicle, polyalthic acid (30 mg kg⁻¹) or carbenoxolone (30 mg kg⁻¹) by the oral route (Matsuda et al 1999). Absolute ethanol was given to each rat in these groups 30 min later, and the animals were killed 2 h after the administration of ethanol to measure the ulcer index. Two control groups (L-NAME-treated and non-L-NAME-treated) were included in this evaluation.

Ethanol-induced gastric mucosal lesions in indometacin-pretreated rats

To investigate the involvement of endogenous prostaglandins in the gastroprotective effect of the compounds, a control group received a subcutaneous injection of NaHCO₃ 5 mM in saline solution and another group an injection of indometacin (10 mg kg⁻¹, dissolved in NaHCO₃ 5 mM) by the same route (Wan & Gottfried 1985). After 75 min, the animals in each of

these two groups received one of three oral treatments (saline solution, 30 mg kg⁻¹ polyalthic acid or 30 mg kg⁻¹ carbenoxolone). Absolute ethanol was given to each rat 30 min after polyalthic acid or carbenoxolone administration and the rats were killed 2 h later in a CO₂ chamber. The stomachs were subsequently removed to measure the ulcer index, as mentioned previously.

Ethanol-induced gastric mucosal lesions in NEM pretreated rats

To investigate the involvement of endogenous sulfhydryls in the protective effects of polyalthic acid and carbenoxolone, NEM (10 mg kg⁻¹, dissolved in saline solution) was subcutaneously injected in the three experimental groups of animals 30 min before the oral administration of either the vehicle, polyalthic acid (30 mg kg⁻¹) or carbenoxolone (30 mg kg⁻¹) (Matsuda et al 1999). Absolute ethanol was given to each rat 30 min later and rats were killed 2 h after the administration of ethanol to measure the intensity of the gastric ulcer. Two control groups (NEM-treated and non-NEM-treated) were included in this experiment.

Statistics

Data were presented as the mean ± s.e.m. from seven to ten rats per group. Statistically significant differences between the treatments were tested by the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. Probability (*P*) values less than 0.05 were considered significant.

Results

Gastroprotective effect

The gastroprotective activity of different extracts of *C. reflexifolius* on ethanol-induced ulcerations in rats are given in Table 1. The hexane extract elicited a dose-dependent gastroprotective effect (maximum 64.38 ± 7.72% gastroprotective effect with 100 mg kg⁻¹) and was more active than the dichloromethane or methanol extracts. Of the six fractions (F1–F6) obtained from the silica gel percolation of the hexane extract, F3 was found to be the most active (maximal 83.28 ± 4.52% gastroprotective effect; see Table 2). A pure

Table 2 Gastroprotective effect of the fractions of hexane extract (F1–F6) on ethanol-induced ulceration in rats

Treatment	Dose (mg kg ⁻¹)	n	Gastroprotection (%)
F1	100	10	52.12 ± 7.54*
F2	100	10	65.59 ± 8.70*
F3	100	10	83.28 ± 4.52*
F4	100	10	52.73 ± 9.69*
F5	100	10	56.30 ± 8.61*
F6	100	10	52.96 ± 8.96*

**P* < 0.05 compared with control group. The ulcer index in the control group for this evaluation was 76.10 ± 8.61.

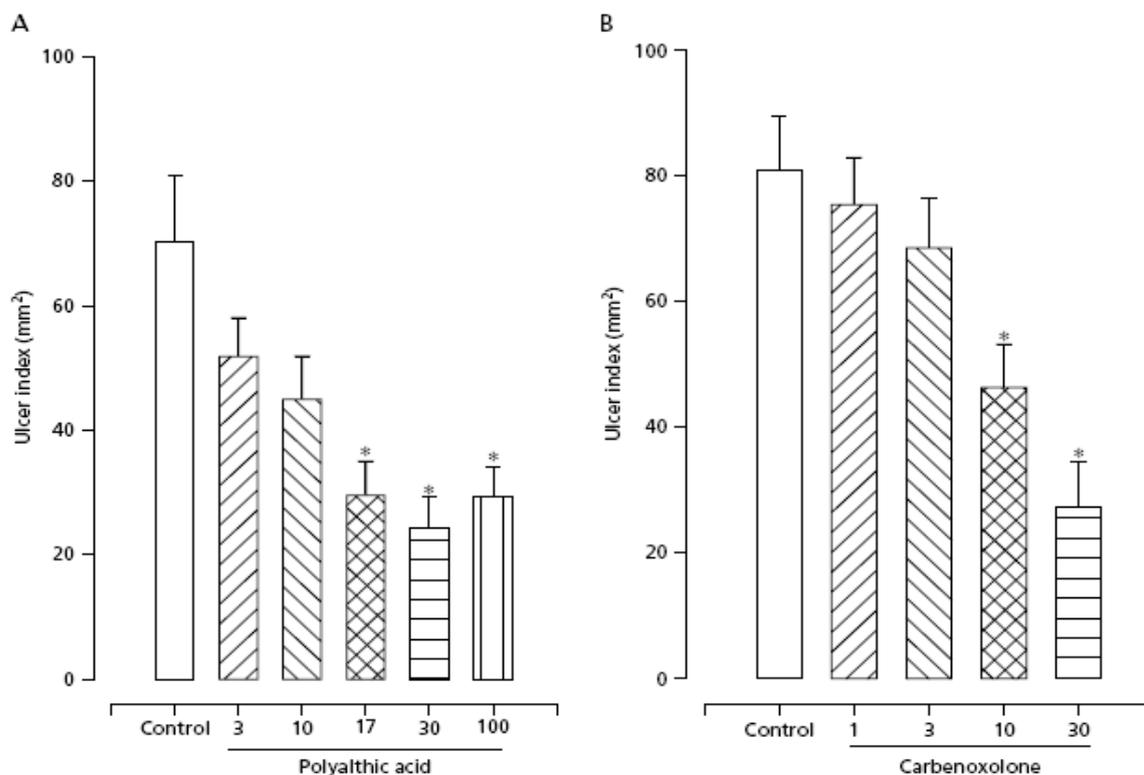


Figure 2 Effect of different doses of (A) polyalthic acid (3–10 mg kg⁻¹) and (B) carbenoxolone (1–30 mg kg⁻¹) on gastric lesions induced in rats by absolute ethanol. Bars represent the mean \pm s.e.m., n = 7–10. * $P < 0.05$ compared with the respective control; Dunn's multiple comparison test after Kruskal–Wallis test.

compound identified as polyalthic acid, which showed a dose-dependent gastroprotective effect, was obtained from F3. The maximal gastroprotective effect, obtained with 30 mg kg⁻¹ polyalthic acid, was 65.26 \pm 7.71% (Figure 2A). It is worth mentioning that in addition to polyalthic acid, β -sitosterol (50 mg) and β -lupeol (60.52 mg) were isolated from the F3 fraction. They were not considered in this work because of the scarce quantity obtained and the fact that their gastroprotective effect is already very well known (Lewis & Hanson 1991; Arrieta et al 2003).

As previously mentioned, for comparative reasons the effect of carbenoxolone was studied. The results showed that this compound elicited a dose-dependent inhibition of gastric ulcers (Figure 2B) that represented no statistically significant difference in relation to that inhibition produced by polyalthic acid. The maximal gastroprotective effect induced by carbenoxolone was 66.7871 \pm 7.8152% at 30 mg kg⁻¹.

Effect of indometacin, L-NAME and NEM on the gastroprotective effect

The ulcer index of the rats treated with 70 mg kg⁻¹ L-NAME (72.11 \pm 9.11 mm², Figure 3A), 10 mg kg⁻¹ indometacin (64.90 \pm 6.72 mm², Figure 3B), or 10 mg kg⁻¹ NEM (73.62 \pm 9.94 mm², Figure 3C) was not significantly different

($P < 0.05$) compared with controls treated with saline solution only (79.11 \pm 9.88, 71.71 \pm 9.94 and 67.50 \pm 9.53 mm², respectively). Previously, it was reported that these doses of inhibitors were high enough to block prostaglandin synthesis, NO synthase and endogenous sulfhydryls, respectively, without producing ulcers or aggravating those previously present (Arrieta et al 2003).

Pretreatment with L-NAME (70 mg kg⁻¹, s.c.) attenuated the gastroprotective effect of both polyalthic acid (30 mg kg⁻¹) and carbenoxolone (30 mg kg⁻¹) (Figure 3A). The ulcer index obtained in the rats treated with polyalthic acid (76.7727 \pm 10.6027 mm²) or carbenoxolone (53.7188 \pm 7.8411 mm²) was not significantly different ($P < 0.05$) from the L-NAME-pretreated controls (72.6563 \pm 9.1146 mm²).

Polyalthic acid (30 mg kg⁻¹) produced inhibition of an ethanol-induced gastric ulcer in indometacin-pretreated animals (10 mg kg⁻¹). The maximum ulcer index obtained for polyalthic acid in this case was 37.17 \pm 7.92 mm², which was significantly different ($P < 0.05$) from that of the indometacin-pretreated control (64.90 \pm 6.72 mm²). On the other hand, the value of the ulcer index obtained with 30 mg kg⁻¹ carbenoxolone (74.65 \pm 9.47 mm²) was not significantly different ($P < 0.05$) from that of the control (Figure 3B).

Oral administration of polyalthic acid to NEM-pretreated (10 mg kg⁻¹) rats did not inhibit the ethanol-induced gastric

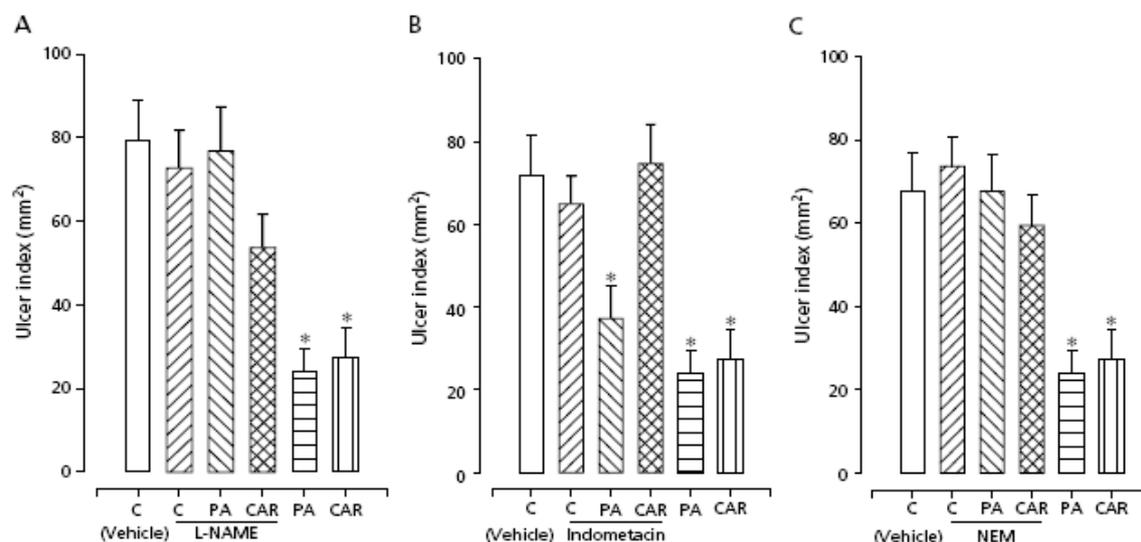


Figure 3 Effect of polyalthic acid (PA) and carbenoxolone (CAR) at 30 mgkg⁻¹ on gastric lesions induced by ethanol in rats pretreated with (A) L-NAME (70 mgkg⁻¹), (B) indometacin (10 mgkg⁻¹) or (C) NEM (10 mgkg⁻¹). Bars represent the mean \pm s.e.m., n = 7–10. *P < 0.05 compared with the respective control; Dunn's multiple comparison test after Kruskal–Wallis test.

lesions. In this case, the ulcer index obtained following the administration of polyalthic acid was 67.70 ± 8.75 mm², a value not significantly different ($P < 0.05$) from that of the NEM-pretreated control (Figure 3C). Carbenoxolone also showed no statistically significant difference in the inhibition of ethanol induced gastric lesions after pretreatment with NEM when compared with the control (Figure 3C).

Discussion

We have provided preliminary scientific support to the popular practice of administering *C. reflexifolius* in the treatment of gastric ulcers (Estrada 1985). It was found that extracts obtained from the leaves of this plant had gastroprotective activity in the experimental rat model of ethanol-induced gastric ulcers. The hexane extract was the most potent, with a maximal $64.38 \pm 7.72\%$ gastroprotective effect. The bioassay-guided fractionation showed that polyalthic acid isolated from F3 was one of the main active ingredients, with a maximal gastroprotective effect of $65.26 \pm 7.71\%$. Interestingly, the maximal effect of polyalthic acid, a pure compound, was lower than that produced by F3 ($83.28 \pm 4.52\%$). This was probably due to the fact that relatively small amounts of two compounds, β -sitosterol and β -lupeol, both with well-known gastroprotective activity (Lewis & Hanson 1991; Arrieta et al 2003), were also isolated from F3.

Polyalthic acid is a diterpenoid and the genus *Croton* is well known for its diterpenoid content (Block et al 2004). Other plants containing diterpenoids have also demonstrated their anti-ulcer activity in several experimental ulcer models (Melo et al 2003; Zhang et al 2006). Therefore, the anti-ulcer effect of polyalthic acid presented in this study was another

property of this substance, apart from the previously published biological effects as a repellent against the monodonta sea snail (Ohta & Nawamaki 1978) and an antimutagenic agent (Miyazawa et al 1995).

In an attempt to provide information about the mechanism of the gastroprotective action of polyalthic acid, the participation of NO was evaluated by pretreating the rats with L-NAME (a nitric oxide synthase inhibitor). It is well known that NO is involved in the modulation of gastric mucosal integrity and is important in the regulation of acid and alkaline secretion, mucus secretion and gastric mucosal blood flow (Calatayud et al 2001). The results of this study showed that in the presence of L-NAME the gastroprotective effect of polyalthic acid was inhibited (76.77 ± 10.60 mm²), as was the protective effect of carbenoxolone (Figure 3A). Thus NO was involved in the gastroprotection elicited by polyalthic acid and carbenoxolone, the latter being an anti-ulcer drug derived from a natural source used as a comparator drug in the study of the mechanism of action of the former.

Further evidence was provided about the mechanism of action of polyalthic acid by investigating the role of endogenous sulfhydryl compounds. It has been demonstrated that the development of ethanol-induced gastric damage is accompanied by a decrease in mucosal sulfhydryl compounds. These compounds are neutralized when they bind to the free radicals that are produced following tissue injury by noxious agents. In addition, sulfhydryl compounds cause mucus subunits to be joined by disulfide bridges with the reduction of free radicals, the latter of which are eliminated since the mucus is rendered water-soluble (Ávila et al 1996; Maity et al 1998). Thus we pretreated animals with NEM, a blocker of sulfhydryl compounds (Figure 3C), to investigate the possible involvement of these compounds in the gastroprotective

effect of polyalthic acid. The results indicated that pretreatment with NEM inhibited the gastroprotective effect of polyalthic acid ($67.70 \pm 8.75 \text{ mm}^2$) and carbenoxolone ($59.45 \pm 7.18 \text{ mm}^2$). This indicated that the endogenous sulfhydryls may have been involved in the gastroprotection of the diterpenoid and the reference compound.

Prostaglandins, especially PGE₂ and PGI₂, which are responsible for mucus production and the maintenance of cellular integrity in the gastric mucosa (Rujjanawate et al 2005), are also involved in the protection of the gastric mucus. The results obtained in this study showed that prostaglandins did not participate in the mechanism of gastroprotection of polyalthic acid, as the effect of this compound was not changed by pretreatment with indometacin, a cyclooxygenase inhibitor (Wan & Gottfried 1985). In contrast, the gastroprotective action elicited by carbenoxolone was inhibited by pretreatment with indometacin (Arrieta et al 2003).

Conclusion

Scientific evidence for the effectiveness of *C. reflexifolius* in the treatment of gastric ulcer have been provided with this study. Polyalthic acid was identified as the main active gastroprotective agent in this traditional medicinal plant. The mechanism of the gastroprotective action of polyalthic acid was related to endogenous NO and sulfhydryl groups, but not to prostaglandins.

References

- Arrieta, J., Benitez, J., Flores, E., Castillo, C., Navarrete, A. (2003) Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphiterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med.* **69**: 905–909
- Ávila, J. R., de la Lastra, C. A., Martín, M. J., Motilva, V., Luque, I., Delgado, D., Esteban, J., Herrerías, J. (1996) Role of endogenous sulfhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflamm. Res.* **45**: 83–88
- Bacelli, C., Block, S., Van-Holle, B., Schanck, A., Chapon, D., Tinant, B., Meervelt, L.V., Morel, N., Quetin-Leclercq, J. (2005) Diterpenes isolated from *Croton zambesicus* inhibit KCl-induced contraction. *Planta Med.* **71**: 1036–1039
- Block, S., Bacelli, C., Tinant, B., Meervelt, L., Rozenberg, R., Habib, J., Llabres, G., Pauw-Gillet, M., Quetin-Leclercq, J. (2004) Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry* **65**: 1165–1171
- Borrelli, F., Izzo, A. (2000) The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother. Res.* **14**: 581–591
- Calatayud, S., Borrachina, M. D., Espulgues, J. V. (2001) Nitric oxide: relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa. *Microsc. Res. Tech.* **53**: 325–335
- Carreras, C. R., Rossomando, P. C., Giordano, O. S. (1998) Ent-labdanes in *Eupatorium buniiifolium*. *Phytochemistry* **48**: 1031–1034
- Catalán, C. A. N., de Heluani, C. S., Kotowicz, C., Gedris, T. E., Herz, W. (2003) A linear sesterterpene, two squalene derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. *Phytochemistry* **64**: 625–629
- Estrada, E. (1985) *Jardín botánico de plantas medicinales Maximino Martínez (1888–1964)*. Universidad Autónoma Chapingo, México, p. 12
- Lewis, D., Hanson, P. J. (1991) Anti-ulcer drugs of plant origin. *Prog. Med. Chem.* **28**: 203–234
- Maity, S., Vedasiromoni, J. R., Ganguly, D. K. (1998) Role of glutathione in the antiulcer effect of hot water extract of black tea (*Camellia sinensis*). *Jpn. J. Pharmacol.* **78**: 285–292
- Matsuda, H., Li, Y., Yosikawa, M. (1999) Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci.* **65**: PL27–PL32
- Melo, P. S., Duran, N., Hiruma-Lima, C. A., Souza-Brito, A. R., Haun, M. (2003) Comparison of the gastroprotective effect of a diterpene lactone isolated from *Croton cajucara* with its synthetic derivatives. *J. Ethnopharmacol.* **87**: 169–174
- Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S., Kameoka, H. (1995) Antimutagenic activity of (+)-polyalthic acid from *Vitex rotundifolia*. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 3012–3015
- Nihei, K., Asaka, Y., Mine, Y., Yamada, Y., Iigo, M., Yanagisawa, T., Kubo, I. (2006) Musidunin and musiduol, insect antifeedants from *Croton jatrophioides*. *J. Nat. Prod.* **69**: 975–977
- Ohta, K., Nawamaki, T. (1978) (+)-Polyalthic acid, a repellent against a sea snail *Monodonta neritoides*. *Agric. Biochem.* **42**: 1957–1958
- Robert, A. (1979) Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* **77**: 761–767
- Rodríguez, J. A., Hiruma-Lima, C. A., Souza-Brito, A. R., Alba, R. M. (2004) Antiulcer activity and subacute toxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Human Exp. Toxicol.* **23**: 455–461
- Rujjanawate, C., Kanjanapothi, D., Amomlerdpison, D., Pojanagaron, S. (2005) Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *J. Ethnopharmacol.* **102**: 120–122
- Toma, W., Gracioso, J., De Andrade, F. D., Hiruma-Lima, C. A., Vilegas, W., Souza-Brito, A. R. (2002) Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the bark wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 1151–1155
- Tsukimi, Y., Okabe, S. (2001) Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biol. Pharm. Bull.* **24**: 1–9
- Wan, B., Gottfried, S. (1985) Cytoprotective action of carbenoxolone sodium on ethanol-induced gastric lesions in rats and its inhibition by indometacin. *J. Pharm. Pharmacol.* **37**: 739–741
- Zhang, B., He, X. L., Ding, Y., Du, G. H. (2006) Gaultherin, a natural salicylate derivative from *Gaultheria yunnanensis*: towards a better non-steroidal anti-inflammatory drug. *Eur. J. Pharmacol.* **530**: 166–171