



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DEL
ACEITE ESENCIAL DE *LIGUSTICUM PORTERI* EN EL MODELO DE
INDUCCIÓN DE DAÑO GÁSTRICO CON INDOMETACINA EN
RATA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
*QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA***

PRESENTA

ITZEL KARINA VEGA AGUILAR

CDMX

MAYO 2019





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Andrés Navarrete Castro

VOCAL: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

SECRETARIO: M. en C. Alejandro Alfaro Romero

1er. SUPLENTE: Dr. Alberto Hernández León

2° SUPLENTE: Dra. Elizabeth Arlen Pineda Peña

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química,
Departamento de Farmacia, Conjunto E, Laboratorio 126.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Andrés Navarrete Castro _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Elizabeth Arlen Pineda Peña _____

SUSTENTANTE:

Itzel Karina Vega Aguilar _____

Agradecimientos.

Al financiamiento otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Facultad de Química a través del proyecto DGAPA-UNAM IN213418 y al Programa de Apoyo a la investigación y Posgrado a través del Proyecto PAIP5000-9143.

Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Marco teórico.....	3
3.1 Úlcera gástrica.....	3
3.2 Mecanismos de gastroprotección.....	4
3.2.1 Barrera de moco-bicarbonato-fosfolípidos.....	4
3.2.2 Células epiteliales.....	5
3.2.3 Microcirculación gástrica.....	6
3.2.4 Factores neuronales.....	6
3.2.5 Factores humorales.....	7
3.3 Daño gástrico inducido por AINEs.....	10
3.4 Tratamiento para el daño gástrico inducido por AINEs.....	11
3.5 <i>Ligusticum porteri</i>	12
4. Planteamiento del problema.....	14
5. Hipótesis.....	14
6. Objetivos.....	15
6.1 Objetivo general.....	15
6.2 Objetivos particulares.....	15
7. Material y métodos.....	16
7.1 Material vegetal.....	16
7.2 Fármacos y reactivos.....	16
7.3 Equipo e instrumentos.....	16
7.4 Animales.....	16
7.5 Obtención de aceite esencial.....	17
7.6 Análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	17
7.7 Obtención del extracto acuoso.....	18
7.8 Preparación de las nanoemulsiones del aceite esencial (NEAE).....	18
7.9 Inducción y evaluación del daño gástrico.....	18
7.10 Determinación de los niveles endógenos de sulfuro de hidrógeno.....	18
7.11 Determinación de los niveles endógenos de óxido nítrico.....	19
7.12 Análisis estadístico.....	20
8. Resultados.....	21

9. Discusión de resultados.	28
10. Conclusiones.	32
11. Perspectivas.....	33
12. Referencias.	34

Índice de figuras.

Figura 1. Mecanismos de gastroprotección de la mucosa gástrica	4
Figura 2. Reacciones generadoras de H ₂ S	9
Figura 3. Hojas de <i>Ligusticum porteri</i>	12
Figura 4. Raíz de <i>Ligusticum porteri</i>	12
Figura 5. Estructura de la Z, Z'- diligustílida.....	13
Figura 6. Cromatograma del aceite esencial y estructuras de 4-fenil-3-buten-2-ol y (Z)- 3-butilidenftálida	21
Figura 7. Distribución del tamaño de partícula de la NEAE y del vehículo.....	23
Figura 8. Imagen representativa de las lesiones gástricas con los diferentes tratamientos.....	24
Gráfica 1. Área de daño gástrico con los diferentes tratamientos	24
Gráfica 2. Curva Dosis-Respuesta de la NEAE.....	25
Gráfica 3. Efecto de los tratamientos en los niveles de NO ₂ ⁻	26
Gráfica 4. Efecto de los tratamientos en los niveles de H ₂ S.....	27

Índice de tablas.

Tabla 1. Composición química del aceite esencial	21
Tabla 2 Porcentajes de gastroprotección de la NEAE.....	25

Abreviaturas utilizadas.

3-MST	3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa
5-HT	5-hidroxitriptamina
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AAT	Aspartato aminotransferasa
AE	Aceite esencial
ARH2	Antagonistas del receptor H ₂
ATC	Ácido tricloroacético
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CSE	Cistationina γ -liasa
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
COX	Enzima ciclooxigenasa
IBP	Inhibidor de la bomba de protones
EA	Extracto acuoso
EGF-R	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FeCl₃	Cloruro de hierro (III)
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
H₂S	Sulfuro de hidrógeno
H₂S-AINE	AINE liberador de sulfuro de hidrogeno
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
IL-1	Interleucina-1
IL-8	Interleucina-8
LTB₄	Leucotrieno B ₄

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaHS	Hidrosulfuro de sodio
NaNO₂	Nitrato de sodio
NEAE	Nanoemulsión de aceite esencial
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
eNOS	Sintasa endotelial de óxido nítrico
iNOS	Sintasa inducible de óxido nítrico
nNOS	Sintasa neuronal de óxido nítrico
Nrf2	Factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar al 2
PG	Prostaglandinas
PGI₂	Prostaglandina I ₂
PGE₂	Prostaglandina E ₂
TGF-α	Factor de crecimiento transformante α
TFFs	Familia de factores trefoil
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

1. Resumen.

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), entre los que se encuentra la indometacina, inducen daño gástrico por medio de mecanismos locales y sistémicos. Los tratamientos actuales para contrarrestar los daños gástricos ocasionados por los AINEs, como los inhibidores de bomba de protones (IBP), están asociados a efectos adversos importantes. Por otra parte, *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) es usado en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de trastornos gastrointestinales. Se ha descrito que las propiedades gastroprotectoras del extracto hexánico de las raíces de *L. porteri* se deben a su compuesto mayoritario Z, Z'-diligustílida. Sin embargo, las propiedades gastroprotectoras y los principales compuestos bioactivos del aceite esencial (AE) de *L. porteri* aún no se han investigado. En este trabajo se obtuvo el AE de las raíces de la planta y se evaluó la acción gastroprotectora de la nanoemulsión del aceite esencial (NEAE), el AE no emulsionado y el extracto acuoso en un modelo de daño gástrico inducido por indometacina en ratas Wistar. Por otra parte, se analizó la participación de los gasotransmisores óxido nítrico (NO) y sulfuro de hidrógeno (H₂S) en el efecto de gastroprotección.

Se administró a las ratas por vía oral la NEAE (1, 3, 10 y 30 mg/kg), el aceite esencial no emulsionado (10 mg/kg) y el extracto acuoso (10 mg/kg) de *L. porteri* 30 minutos antes de la generación de lesiones de la mucosa gástrica con indometacina a la dosis de 30 mg/kg, *p.o.*; tres horas después, se determinó el área de lesión gástrica (mm²). Los resultados revelaron que la NEAE tiene un efecto gastroprotector significativo en comparación con el grupo de daño. Además, se evidenció que en este efecto gastroprotector se modula el gasotransmisor H₂S, pero no tiene efecto sobre el NO. El análisis por CG-EM del AE permitió identificar 37 componentes, siendo los principales el 4-fenil-3-buten-2-ol y la (Z)-3-butilidénftálida. A partir de estos hallazgos se puede concluir que la NEAE de *L. porteri* promueve la acción gastroprotectora y puede ser utilizada para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la gastropatía inducida por los AINEs.

2. Introducción.

La úlcera gástrica es una patología del tracto gastrointestinal caracterizada por una lesión en las capas más profundas de la mucosa del estómago generando hemorragia, perforación o penetración a otros órganos.¹ Este padecimiento es el resultado del desequilibrio entre los factores gastroprotectores y los factores agresores. Uno de los factores agresores de mayor relevancia son los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), cuyo efecto adverso gastrointestinal se llega a observar con una frecuencia del 30-40%.² Estos fármacos inducen daño gástrico de forma local y sistémica. El daño local ocurre por una lisis del tejido gástrico resultado de un atrapamiento iónico que genera un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en la mitocondria ocasionando la lisis osmótica. El daño sistémico se da por la capacidad de los AINEs de inhibir las ciclooxigenasas y, por lo tanto, la síntesis de las prostaglandinas, que juegan un papel importante en la modulación de la gastroprotección. Recientemente se ha descrito que existen otras moléculas que participan activamente en la gastroprotección, los gasotransmisores como el óxido nítrico (NO) y el sulfuro de hidrógeno (H₂S), quienes intervienen de manera indirecta mejorando el flujo sanguíneo y reduciendo el estrés oxidativo en el tejido.³

Por otra parte, en la medicina tradicional mexicana se utilizan diversas plantas para tratar la úlcera péptica; una de ellas es la raíz de *Ligusticum porteri*, conocida como chuchupate, que se utiliza en forma de infusión de la raíz seca o fresca. Se ha demostrado que los extractos de etanol, hexano y diclorometano de esta planta tienen un efecto gastroprotector en modelos de daño gástrico inducido con etanol, donde se identificó al compuesto mayoritario diligustílida como el responsable del efecto,⁴ sin embargo, de manera general, el efecto de una planta medicinal se debe al efecto sinérgico de varios componentes. En este contexto, en el presente trabajo se evaluó el efecto gastroprotector del AE de *L. porteri* en el modelo de daño gástrico inducido por indometacina, con la finalidad de saber si el aceite esencial presenta un efecto gastroprotector, además de evidenciar si el óxido nítrico y el sulfuro de hidrógeno participan en este efecto.

3. Marco teórico.

3.1 Úlcera gástrica.

Se define como una patología del tracto gastrointestinal caracterizado por daño o lesión en la pared gástrica que puede extenderse a la submucosa e incluso a la capa muscular.¹ El daño generalmente se da como resultado de un desequilibrio entre los factores de gastroprotección y los agresores.³ Esta patología es una de las más comunes en México: en el año 2017 se detectaron más de 1.5 millones de casos nuevos de úlceras, gastritis y duodenitis.⁵

Existen diversos factores de riesgo, entre los que destacan la infección por *Helicobacter pylori* y el consumo de AINEs, que generalmente causan lesiones en la mucosa y complicaciones graves, como úlceras hemorrágicas a través de la inflamación y producción de citoquinas.⁶ Debido al éxito en las terapias contra *H. pylori*, se ha evidenciado que el daño gástrico que persiste es debido al consumo crónico de los AINEs. Otros factores de riesgo que han sido considerados para este padecimiento son el tabaco y el alcohol. Se ha observado en estudios epidemiológicos que los fumadores tienen doble prevalencia de úlceras frente aquellos que no fuman, puesto que el tabaco incrementa la producción de ácido gástrico y enlentece la cicatrización.⁷ El alcohol, por otra parte, puede dañar a la mucosa gástrica y generar erosiones al estimular la secreción de ácido e incrementa la permeabilidad de la mucosa gástrica favoreciendo la retrodifusión del ácido.⁸ Los alimentos irritantes también pueden producir daño en la mucosa gástrica.

Referente al uso de AINEs, las úlceras gástricas son de 3 a 6 veces más frecuentes en aquellas personas que utilizan estos fármacos. Este riesgo es mucho mayor en personas de edad superior a los 60 años, y varía según el tipo de AINE. También se ha observado que el efecto se incrementa en los 3 primeros meses de tratamiento y en pacientes con antecedentes digestivos previos. Alrededor del 30 al 50% de los usuarios de AINEs tienen lesiones endoscópicas como hemorragias, erosiones y ulceraciones subepiteliales, que se encuentran principalmente en el antro gástrico.²

3.2 Mecanismos de gastroprotección.

La mucosa gástrica se encuentra en constante exposición a sustancias y factores dañinos, por lo que requiere de diversos factores o componentes que le permitan permanecer intacta. Estos factores, el “mecanismo de gastroprotección” o la “defensa mucosal”. Consisten en una barrera de moco-bicarbonato-fosfolípidos, las células epiteliales, la microcirculación gástrica, los factores neuronales y los factores humorales.³

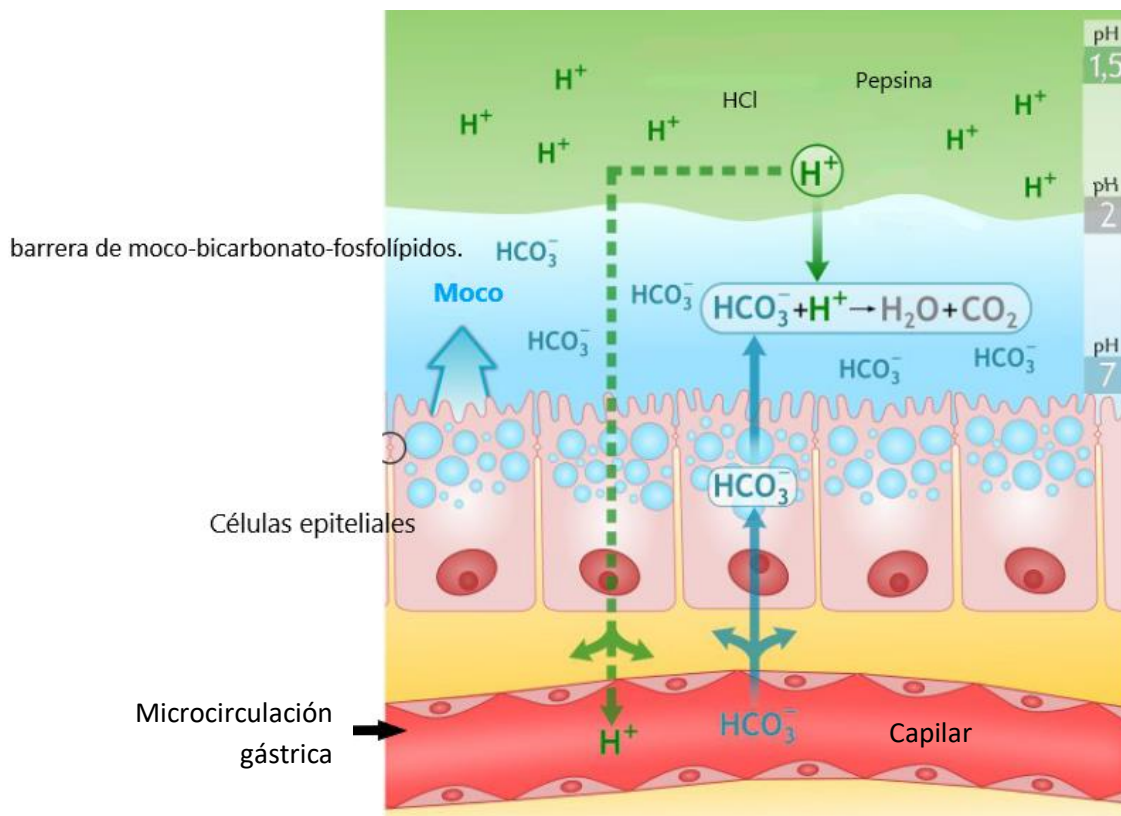


Figura 1. Mecanismos de gastroprotección de la mucosa gástrica

3.2.1 Barrera de moco-bicarbonato-fosfolípidos.

Esta barrera es una capa que mantiene un microentorno neutro de la mucosa gástrica, ya que el moco retiene el bicarbonato (HCO₃⁻) que es secretado por las células epiteliales superficiales. El moco contiene un aproximado de 95% de agua y 5% de glicoproteínas de mucina³ y forma una barrera hidrofóbica que evita la retrodifusión de ácido debido a la presencia de una capa de fosfolípidos surfactantes,⁹ lo que ayuda aún más a mantener un pH favorable en la superficie del epitelio apical. También funciona como un lubricante para reducir el daño físico en el epitelio por la ingesta y puede disminuir la capacidad de las

bacterias de acceder al epitelio.¹⁰ El moco es secretado junto con péptidos de bajo peso molecular de la familia de factores trefoil (TFFs). La secreción de moco es regulada por las hormonas gastrointestinales, gastrina y secretina, así como por agentes colinérgicos y prostaglandina E₂ (PGE₂).^{3,11}

3.2.2 Células epiteliales.

Esta línea de defensa consta de una capa continua de células epiteliales superficiales. Debido a la presencia de fosfolípidos en sus superficies, estas células son hidrófobas y repelen a los agentes dañinos solubles en agua y ácido, impidiendo su difusión. También secretan HCO₃⁻, moco y generan prostaglandinas (PGs), proteínas de choque térmico, TFFs y catelicidinas.³

Las proteínas de choque térmico previenen la desnaturalización de proteínas y protegen a las células de lesiones, se generan en respuesta al estrés, como el aumento de temperatura, el estrés oxidativo y los agentes citotóxicos. Las catelicidinas desempeñan un papel en el sistema de defensa innato de superficies mucosas previniendo la colonización bacteriana junto con las β-defensinas. También se ha demostrado que aceleran la cicatrización de las úlceras en células epiteliales gástricas. Los TFFs regulan la reepitelización y ejercen la acción protectora de la mucosa; específicamente, el TFF2 ayuda a estabilizar la red del moco mediante un aumento en la viscosidad de la mucina y la elasticidad, igualmente tiene un papel en la regulación de la inflamación gastrointestinal y en las respuestas de las citocinas.^{3,12}

El epitelio está en constante renovación gracias a la proliferación controlada y coordinada de células progenitoras; el reemplazo completo del epitelio de la superficie gástrica normalmente es de 3 a 7 días. En este proceso, en donde se reemplazan las células dañadas o viejas, es controlado por los factores de crecimiento. El principal receptor del factor de crecimiento expresado en las células progenitoras gástricas es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), y es activado por los factores de crecimiento transformante α (TGF-α) y el similar a la insulina tipo 1 (IGF-1).³

3.2.3 Microcirculación gástrica.

El flujo sanguíneo a través de los microvasos (capilares, arteriolas y vénulas colectoras) ayuda a mantener la estructura y las funciones de los tejidos, es esencial para la entrega de oxígeno y nutrientes y para eliminar sustancias tóxicas. La mucosa gástrica cuenta con una red capilar muy densa: a la altura de la *muscularis mucosae*, la mayoría de las arterias gástricas se ramifican en capilares, entran en la lámina propia y viajan hacia arriba cerca de las células epiteliales glandulares gástricas; y en la base de las células epiteliales de la superficie, los capilares convergen en vénulas colectoras.^{3,13}

Cuando la mucosa gástrica es expuesta a irritantes o hay una retrodifusión del ácido se genera un rápido aumento del flujo sanguíneo en la mucosa permitiendo la dilución del ácido o cualquier otro agente nocivo. Esta respuesta hiperémica está mediada por nervios aferentes sensoriales y, en parte, por el NO generado por la sintasa de óxido nítrico (NOS).¹³

Una de las primeras respuestas de defensa fisiológica en la gastroprotección de la mucosa es la inflamación, que comienza con cambios vasculares rápidos como la permeabilidad vascular y el flujo sanguíneo aumentados, seguido de eventos celulares por ejemplo, infiltración por células inflamatorias de forma aguda y crónica. Este aumento de la permeabilidad vascular crea un edema perivascular en la parte superior de la lámina propia gástrica, denominada por Szabo¹⁴ como "barrera histodilucional", que diluye los compuestos tóxicos intraluminales, retrasa su absorción y conserva la integridad de la vascularización subepitelial.

3.2.4 Factores neuronales.

El tracto gastrointestinal posee su propia red neuronal, el sistema nervioso entérico. Contiene una gran cantidad de neuronas que secretan acetilcolina, noradrenalina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), purinas, NO y diversos péptidos como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP).^{15,16} Estas sustancias participan en la regulación local de la circulación, la secreción, la motilidad, la homeostasis de la mucosa y la reparación de la mucosa.¹⁷

Por otra parte, la mucosa gástrica está innervada por neuronas sensoriales aferentes que forman un plexo denso en la base de la mucosa. Estas terminaciones nerviosas pueden detectar el pH del contenido luminal gástrico y la entrada de ácido en la mucosa a través de canales sensibles al ácido. La activación de estos nervios genera una respuesta en las arteriolas submucosas, regulando así el flujo sanguíneo de la mucosa. El CGRP también ejerce una acción protectora de la mucosa, generando NO, lo que incrementa el flujo sanguíneo y la secreción de bicarbonato.^{16, 17}

3.2.5 Factores humorales.

3.2.5.1 Prostaglandinas.

Las PGs son derivados de ácidos grasos de 20 carbonos de largo con un grupo hidrocarburo cíclico. Estos compuestos se forman a partir del ácido araquidónico, liberado a partir de fosfolípidos en la membrana plasmática; después, la enzima ciclooxigenasa (COX) se encarga de convertir el ácido en prostaglandina. Existen dos principales isoformas de esta enzima: la tipo I (COX-1) que se produce de modo constitutivo, y la tipo II (COX-2) que se induce en diversas células en respuesta a citocinas involucradas en la inflamación. Las PGs se producen en casi todos los órganos y desempeñan diversas funciones reguladoras.¹⁸

En la mucosa gástrica las prostaglandinas que más se producen son la PGE₂ y PGI₂, estimulan la secreción de bicarbonato y moco. En el epitelio estas PGs ayudan a reducir la retrodifusión del ácido disminuyendo la permeabilidad de este, incrementan el flujo sanguíneo lo que aumenta la resistencia de la mucosa a lesiones y promueven la formación de los fosfolípidos surfactantes. También se les asocia la regulación negativa de ciertos mediadores de inflamación, como la PGE₂ que inhibe la liberación de histamina, el TNF- α , la IL-1, el LTB₄ y la IL-8, que son mediadores de inflamación que aumentan la susceptibilidad del estómago al daño con AINEs.^{10,19}

3.2.5.2 Óxido nítrico.

El NO es un radical libre gaseoso, sintetizado en sistemas biológicos por la enzima NOS, a través de la conversión de L-arginina a L-citrulina. Existen tres

isoformas de la enzima: una inducible (iNOS) que se expresa en macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular y células endoteliales en respuesta a estímulos patológicos, y dos formas constitutivas, que están presentes en condiciones fisiológicas en las neuronas (nNOS) y en el endotelio (eNOS) aunque también puede estar presente en los miocitos cardiacos, las células mesangiales renales, los osteoblastos y osteoclastos y, en pequeñas cantidades, en las plaquetas.¹⁵

El NO interactúa en la mucosa gástrica con neuropéptidos y prostaglandinas para conservar la mucosa en sus condiciones basales; ayuda a mantener la integridad del epitelio gástrico y de la barrera de moco mediante la regulación del flujo sanguíneo en la mucosa gástrica, inhibe la adherencia de leucocitos al endotelio y estimula la liberación de moco gástrico y bicarbonato.²⁰

El posible mecanismo por el cual el NO ejerce su actividad gastoprotectora es mediante la activación de la enzima guanilato ciclasa, la cual induce un incremento en los niveles de guanosín monofosfato cíclico (GMPc). Recientemente, se ha descrito que la activación de los canales de potasio sensibles a ATP por esta vía, tiene una participación en la defensa de la mucosa.^{21, 22}

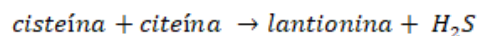
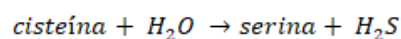
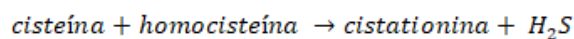
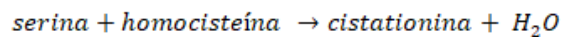
3.2.5.3 Sulfuro de hidrógeno.

El sulfuro de hidrógeno (H₂S) es un mediador gaseoso que es sintetizado por una gran variedad de tejidos (pulmón, corazón, hígado, riñón, tronco cerebral, estómago, intestino), y tiene actividad de vasodilatador endógeno, neuromodulador y mediador antiinflamatorio. Además tiene funciones importantes en la citoprotección, la función vascular, los sistemas neurológicos, la reparación y curación de tejidos, la apoptosis y el ciclo celular, la función mitocondrial, el metabolismo energético y la biogénesis.^{23, 24}

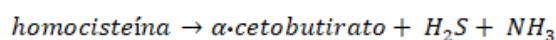
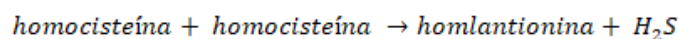
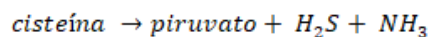
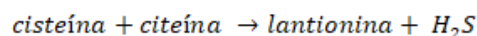
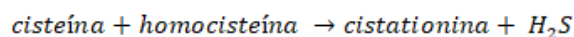
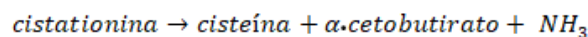
Una de las principales fuentes de azufre en los tejidos de los mamíferos es la cisteína. Este aminoácido sirve de sustrato para 2 enzimas dependientes de piridoxal-5'-fosfato: la cistationina β-sintasa (CBS) y la cistationina γ-liasa (CSE). Estas enzimas son responsables de la producción endógena de H₂S en tejidos junto a la 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST).²⁵

La CBS cataliza el primer paso en la vía de la transulfuración, que es la condensación de la serina con homocisteína para formar cistationina y agua, también puede llevarse a cabo otro mecanismo donde la cisteína reemplaza a la serina como un sustrato, en ese caso los productos de reacción son cistationina y H₂S. La CSE, en la vía de la transulfuración, se encarga de hidrolizar la cistationina formando cisteína, amoníaco y α-cetobutirato. Al igual que la CBS puede catalizar varias otras reacciones para generar H₂S a partir de la cisteína. Finalmente la 3-MST produce H₂S a partir de 3-mercaptopiruvato, que se forma por una reacción de transaminación entre cisteína y α-cetoglutarato catalizada por aspartato aminotransferasa (AAT) (Fig. 2).²⁶

Reacciones catalizadas por CBS



Reacciones catalizadas por CSE



Reacciones catalizadas por 3-MTS

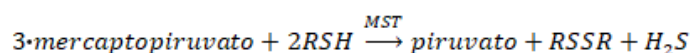
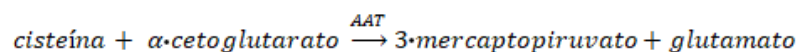


Figura 2. Reacciones generadoras de H₂S catalizadas por CBS, CSE y AAT / MST.

La mucosa gástrica expresa tanto CSE como CBS, por lo tanto tiene la capacidad de generar H₂S. Este gas ayuda en la regulación del flujo sanguíneo, además está involucrado en el mantenimiento de la integridad de la

mucosa gástrica y es un potente inhibidor de la adherencia de los leucocitos al endotelio vascular.²⁵

3.3 Daño gástrico inducido por AINEs.

Los AINEs son compuestos químicamente heterogéneos que poseen propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas;²⁷ sin embargo estos fármacos inducen lesiones gástricas como ulceración o hemorragia. El mecanismo por el cual los AINEs generan daño gástrico se puede dividir en daño local y sistémico.¹⁰

Los AINEs tienen varios mecanismos por los cuales generan el daño local. Algunos AINEs pueden destruir las células epiteliales, en particular aquellos de naturaleza ácida, ya que en el jugo gástrico se encuentran en mayor proporción no ionizados y lipofílicos, lo que les permite moverse a través de las membranas celulares hacia el interior de las células, una vez dentro de ellas el pH neutro causa la conversión a su forma ionizada ocasionando una lisis osmótica. Los AINEs también pueden alterar la capa de fosfolípidos tensioactivos en la superficie de la mucosa, independientemente de los efectos sobre la síntesis de prostaglandinas, facilitando la retrodifusión del ácido, lo que altera el pH de esta capa que protege al epitelio, además de que la secreción de moco y bicarbonato disminuyen igualmente.¹⁰ Finalmente se ha observado que los AINEs disminuyen la respuesta proliferativa de las células específicamente el factor de crecimiento epidérmico (EGF), alterando la reparación epitelial.²⁸

El daño sistémico de los AINEs consiste en la inhibición de las dos isoformas de la enzima COX.¹⁵ La supresión de la COX-1 genera una disminución en el flujo sanguíneo de la mucosa y aumenta la secreción de ácido, también promueve el sangrado gástrico debido a que al inhibirse se suprime la síntesis de tromboxano plaquetario y, por lo tanto, se reduce la capacidad de las plaquetas para agregarse. También se ha observado que la deficiencia de PGs sintetizadas por esta enzima generan una hipermotilidad gástrica.^{10, 29}

La COX-1 es la isoforma predominante que se expresa en una mucosa sana, pero la expresión de la COX-2 puede ser mayor cuando la mucosa se

encuentre expuesta a un irritante o cuando la actividad de COX-1 es inhibida por algún AINE. Esta regulación positiva de la COX-2 es una respuesta dirigida a mejorar la defensa de la mucosa, por lo que cuando la actividad de la COX-2 es inhibida, se puede observar la formación de erosiones de la mucosa ya que se promueve la adherencia de leucocitos al endotelio¹⁰ y estos producen especies reactivas de oxígeno conduciendo a la apoptosis.³⁰ Además, los inhibidores de la COX-2 retrasan la curación de las úlceras gástricas crónicas en modelos animales experimentales y disminuyen la proliferación de células epiteliales, la angiogénesis y la maduración del tejido de granulación.³¹ Se ha visto que la inhibición selectiva de COX-1 o de COX-2 no provoca daño gástrico en un modelo animal, sino que se requiere de la inhibición de ambas isoformas de COX para generar el daño.³²

3.4 Tratamiento para el daño gástrico inducido por AINEs.

Los tratamientos actuales para disminuir el daño gástrico por AINEs incluyen los antagonistas del receptor H₂ (ARH2s), los inhibidores de la bomba de protones (IBPs) y los análogos de prostaglandinas, cada uno de los cuales posee una eficacia variable como agente gastroprotector. Los ARH2s curan casi todas las úlceras por AINEs, sin embargo, la tasa de curación de la úlcera disminuye significativamente si el paciente no suspende los AINEs.³³ Por otra parte, los IBPs bloquean de forma irreversible a la bomba de protones, inhibiendo la secreción de ácido y a su vez disminuyen el efecto bactericida del jugo gástrico, por lo que las bacterias lábiles al ácido, como *Salmonella*, *Campylobacter* y *Clostridium difficile* pueden tener una mayor probabilidad de infectar y crecer en el tracto gastrointestinal.^{34,35} El misoprostol es un análogo de prostaglandina que aumenta la producción de moco gástrico, sin embargo, la frecuencia de los efectos secundarios son lo suficientemente graves como para provocar la interrupción del tratamiento.³³ Recientemente, se han sintetizado sustancias como el ATB-346, un AINE liberador de H₂S derivado de naproxeno y que actualmente se encuentran en fases clínicas de investigación.³⁶

3.5 *Ligusticum porteri*.

Ligusticum porteri Coult & Rose (Apiaceae), conocida popularmente como chuchupate u osha, es una planta herbácea perenne, que tiene una altura de 50 a 100 cm. Tiene segmentos de hojas elípticas en forma de lanza de un ancho de 5 a 40 mm y de 15 a 30 cm de largo con hojas basales más grandes (Fig. 3). Sus raíces están cubiertas de pelos reticulares fibrosos con un olor característico (Fig. 4). Las flores blancas aparecen a fines del verano y tienen un diámetro de aproximadamente 2 a 5 mm con cinco pétalos. Crece en suelos ricos y húmedos en hábitats boscosos, desde bosques de pinos hasta bosques de abetos, pero también se encuentra en laderas y en prados con suelos rocosos más secos. En nuestro país se encuentra en los estados de Sonora y Chihuahua, mientras que en E.U.A., en los estados de Wyoming, Arizona, Colorado, Idaho, Nuevo México, Nevada y Utah.³⁷



Figura 3. Hojas de *Ligusticum porteri*
(fuente <http://www.americansouthwest.net>)



Figura 4. Raíz de *Ligusticum porteri*

La raíz, seca o fresca, se consume en forma de infusión y es utilizada para dolores en general, trastornos gastrointestinales, fiebre, enfermedades respiratorias y problemas circulatorios. La infusión también se usa de manera tópica en heridas para prevenir infecciones.³⁸

La raíz ha sido la parte de la planta más estudiada y de la que se han reportado diferentes actividades biológicas, como propiedades antinociceptivas,³⁹ agente inmunomodulador con efectos protectores contra el daño oxidativo,⁴⁰ efecto antihiper glucémico⁴¹ y efecto gastroprotector del extracto hexánico, principalmente por la acción de la Z, Z'- diligustílica (DLG) (Fig 5).⁴ El aceite

esencial se compone principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos y algunas ftálicas, se ha reportado que el aceite esencial restaura la sensibilidad de la cepa MDR-*Staphylococcus aureus* a norfloxacino.⁴²

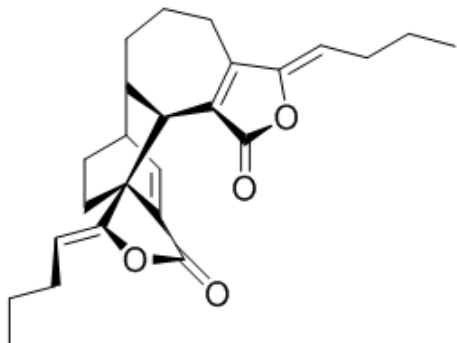


Figura 5. Estructura de la Z, Z'- diligustílida

4. Planteamiento del problema.

La gastropatía por AINEs es el efecto secundario farmacológico más frecuente de estas sustancias. Alrededor de 30 millones de personas en el mundo consumen AINEs diariamente y entre el 30 a 50% de los usuarios presentan lesiones gástricas.² Los medicamentos que comúnmente se utilizan para el tratamiento del daño gástrico inducido por AINEs incluyen los IBPs y los H2RAs, que se encargan de inhibir la secreción de ácido gástrico, sin embargo se ha observado que estos fármacos aumentan significativamente el daño intestinal causado por los AINEs.⁴³ Por lo que una alternativa para tratar el daño gástrico inducido por los AINEs, podrían ser compuestos que abarquen mecanismos de acción diferentes a la inhibición de la secreción del ácido gástrico, como la modulación de los factores gastroprotectores u otro mecanismo relacionado.

Estudios previos han demostrado que los extractos de etanol, hexano y diclorometano de *L. porteri* tienen efecto gastroprotector además, el compuesto mayoritario, la diligustílida, también presenta el efecto gastroprotector y regula la liberación de H₂S como probable mecanismo en modelos de daño gástrico inducido con etanol.⁴ Sin embargo, hasta el momento no se han evaluado las propiedades gastroprotectoras del AE y del extracto acuoso de *L. porteri*. Por ello, en el presente trabajo se planteó caracterizar el efecto gastroprotector de la nanoemulsión del aceite esencial aislado de las raíces de *L. porteri* y establecer su posible mecanismo de acción en un modelo murino de daño gástrico inducido por indometacina.

5. Hipótesis.

La nanoemulsión del aceite esencial de las raíces de *L. porteri* tiene un efecto gastroprotector en ratas Wistar en el modelo de daño inducido con indometacina. Dicho efecto está mediado por la regulación de los niveles gástricos de óxido nítrico y sulfuro de hidrógeno.

6. Objetivos.

6.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto gastroprotector del aceite esencial y del extracto acuoso de las raíces de *Ligusticum porteri* en el modelo de inducción de daño gástrico con indometacina en ratas.

6.2 Objetivos particulares.

- Obtener el aceite esencial y el extracto acuoso a partir de la raíz de *L. porteri*.
- Caracterizar mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas la composición del aceite esencial de *L. porteri*.
- Evaluar el efecto gastroprotector del aceite esencial y del extracto acuoso obtenidos de la raíz de *L. porteri* en el modelo de daño gástrico inducido con indometacina en ratas.
- Cuantificar los niveles de NO y H₂S en el tejido gástrico tratado con aceite esencial y con extracto acuoso obtenidos de la raíz de *L. porteri* en el modelo de daño gástrico inducido con indometacina en ratas.

7. Materiales y métodos.

7.1 Material vegetal.

Se adquirieron 1000 g de raíz de *L. porteri* en “Las plantas medicinales de América”. Su autenticidad fue verificada por un botánico del Herbario Nacional de México (voucher 31733).

7.2 Fármacos y reactivos.

El AE fue obtenido a partir de la raíz de *L. porteri*. La indometacina, el NaHS, el acetato de zinc, el ácido tricloroacético (ATC), el sulfato de N, N dimetil-p-fenilendiamina, el HCl, el FeCl₃, el NaNO₂, la sulfanilamida, y la N-naftiletildiamina se adquirieron de Sigma-Aldrich, el omeprazol se adquirió de J.T. Baker. Para la determinación de nitritos se adquirieron la enzima nitrato reductasa y el cofactor NADPH de Cayman Chemical Co. Todos los reactivos y fármacos fueron preparados momentos previos a su uso. La indometacina fue disuelta en una disolución de NaHCO₃ 5% (m/v) y el omeprazol en una disolución de NaCl 0.9% (m/v). El grupo basal recibió el vehículo (emulsión tween 80, span 20 en agua destilada, solución salina o NaHCO₃ al 5%) en el mismo volumen (0.1 mL/100 g) vía oral.

7.3 Equipo e instrumentos.

Las imágenes del estómago se obtuvieron con un microscopio digital CELESTRON 44302-A. Los tejidos se homogenizaron con un IKA Ultra-Turrax T8 y para obtener los sobrenadantes se utilizó una microcentrífuga refrigerada IEC Micromax RF. Aparato tipo Cleverger para obtener el aceite esencial. Para leer las placas de las técnicas analíticas se empleó un lector ELISA modelo 680 Microplate Reader de la marca BIO-RAD.

7.4 Animales.

Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron ratas macho Wistar con un peso entre 180 a 250 g. Todos los animales fueron tratados acorde a la Norma Oficial Mexicana de Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y las guías del Comité de Asesoramiento Nacional para la Investigación de Animales de Laboratorio (NACLAR). Además, se obtuvo la aprobación del protocolo por

parte del Comité Institucional para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química (OFICIO/FQ/CICUAL/259/18). El número de ratas por grupo fue de 5 y fueron acondicionadas en jaulas de policarbonato bajo condiciones de temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), con ciclos de luz obscuridad de 12 h, alimentada con pellets estándar y agua potable *ad libitum* durante 2 a 3 semanas previas al experimento. Antes de los experimentos fueron colocadas en un ayuno de 12 h en jaulas individuales con piso de malla y libre acceso a agua.

7.5 Obtención del aceite esencial.

Se pesaron y molieron 700 g de raíz, se colocaron en un matraz bola con agua destilada (1 L), llevando a cabo una hidrodestilación con un aparato tipo Cleverger durante 3 horas a presión atmosférica obteniendo 4.4 g de aceite (0.63% de rendimiento). El AE colectado se guardó en un vial ámbar y se conservó en refrigeración hasta su uso en los experimentos y análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

7.6 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

El análisis del AE se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases marca Agilent, modelo 6890N acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF) marca LECO modelo Pegasus 4D con las siguientes condiciones: columna capilar DB-5ms ($20\text{ m} \times 0.18\text{ mm}$, espesor de película $0.18\text{ }\mu\text{m}$); gas portador: helio (velocidad de flujo: 1 mL / min), inyección en modo split (1: 400); temperatura del inyector: 300°C , impacto electrónico (EI) 70 eV como método de ionización; temperatura de la cámara: 200°C ; modo de escaneo de masa: 20 barridos / segundo; intervalo de masas: 45-550 m/z . Se inyectaron $2\text{ }\mu\text{L}$ de la disolución (aceite al 5% m/v en hexano). La identificación de los compuestos individuales se realizó mediante el cálculo de sus índices de retención (RI) utilizando la mezcla homóloga de *n*-alcanos $\text{C}_8\text{-C}_{24}$ y por comparación con los datos espectrales de masas disponibles (NIST-2002) y se confirmó comparando sus índices de retención calculados con los reportados en la literatura.

7.7 Obtención del extracto acuoso.

Se pesaron 32 g de raíz de *L. porteri* y se colocaron en 1L de agua en ebullición durante 30 min. La infusión se filtró con algodón y se evaporó a temperatura ambiente ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) hasta sequedad bajo una corriente de aire continua obteniendo 2.6 g de extracto con un rendimiento de 8.12%.

7.8 Preparación de las nanoemulsiones del aceite esencial.

A 0.5 g de aceite se adicionaron 0.25 g de Span 20 y 0.25 g de Tween 80, se agitaron por 30 min a 11000 rpm con ayuda de un homogenizador (Ultra-Turrax® T-18). Después se fue adicionando agua destilada con un flujo de 0.5 mL/min hasta completar un volumen final de 10 mL dejando constante la agitación por 90 min. El vehículo se preparó de la misma manera reemplazando el aceite esencial por agua destilada.

El tamaño de la gota y el índice de polidispersibilidad se midieron mediante espectroscopia de correlación de fotones utilizando un ZETASIZER ZEN ZS 3600 (Malvern Instrument Co., Reino Unido). Cada nanoemulsión (por triplicado) se diluyó utilizando agua Milli-Q ultrapura (1:25) y el tamaño de gota promedio se expresó como el diámetro medio.

7.9 Inducción y evaluación del daño gástrico.

A ratas en ayuno de 12 h se les administró por vía oral la NEAE (1, 3, 10 y 30 mg/kg), el AE sin emulsionar (de 10 mg/kg), el extracto acuoso (10 mg/kg), el fármaco de referencia (omeprazol, 30 mg/kg) o el vehículo (Tween 80 y Span 20 en solución salina 0.9%). Treinta minutos después se les administró indometacina (30 mg/kg) para generar el daño gástrico. Tres horas después los animales se sacrificaron en cámara de CO_2 , se realizó la disección del estómago, se abrió por la curvatura mayor y se lavó con solución fisiológica. Se extendió el tejido y se tomó una fotografía utilizando un microscopio digital, luego se analizó la extensión del área de daño gástrico en mm^2 utilizando el software Image J (versión 1.45). Finalmente se realizó la suma del área de todas las lesiones en el cuerpo del estómago de cada animal.⁴

7.10 Determinación de los niveles endógenos de sulfuro de hidrógeno.

Curva patrón.

Se pesaron 13.6 mg de NaHS y se aforaron a un volumen final de 5 mL con acetato de zinc 0.5% (m/v). Esta solución sirvió como solución madre para preparar las soluciones de la curva: 16, 32, 48, 96, 144, 192 μM de H_2S .

Tratamiento de las muestras de tejido.

Se pesaron 200 mg de tejido gástrico y se realizó un combinado con las muestras homogeneizando en 2 mL de acetato de zinc al 0.5% con un homogenizador Ultra-Turrax[®] T-18. El homogeneizado se centrifugó a 14000 xg por 15 min a 4°C para obtener el sobrenadante.

Desarrollo del ensayo.

La concentración de H_2S se determinó mediante la reacción de formación de azul de metileno.⁴⁴ Para esto se tomaron 350 μL de sobrenadante que se mezclaron con 50 μL de ATC (10% v/v) para precipitar las proteínas, se centrifugó a 14000 xg por 20 min a 4°C. Se tomaron 120 μL del sobrenadante, se les agregó 50 μL de solución estándar de NaHS [48 μM] y 40 μL de sulfato de *N, N* dimetil-*p*-fenilendiamina (20 mmol/L en HCl 7.2 M), se agitaron en vortex 1 min. Posteriormente se agregaron 40 μL de FeCl_3 (30 mmol/L en HCl 1.2 M), y se dejaron reaccionar por 20 min. A continuación, se realizó la extracción del azul de metileno formado, para esto se adicionaron 500 μL de cloroformo y se agitó con vortex, se tomaron 450 μL de la fase de cloroformo y se secaron a 60°C en una estufa con vacío, el residuo se resuspendió con 220 μL de etanol, se tomaron 200 μL que se colocaron en la microplaca de 96 pozos y se leyó a una longitud de onda de 655 nm.

7.11 Determinación de los niveles endógenos de óxido nítrico.

Curva patrón.

Para preparar la curva patrón se preparó una solución madre de NaNO_2 10 mM y a partir de esta solución se prepararon las soluciones para la curva estándar que fueron de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 μM .

Tratamiento de las muestras.

Se pesaron aproximadamente 200 mg de cada muestra de tejido, se transfirieron a un tubo con 1 mL de buffer de fosfatos (10 mmol/L, pH 7.4). Las muestras se fragmentaron con tijeras por 30 s y después se homogeneizaron, se centrifugaron a 9000 xg por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró y se conservó para su posterior tratamiento.

Desarrollo de ensayo.

Para llevar a cabo la reacción colorimétrica de Griess⁴⁵ primero fue necesario convertir el nitrato a nitrito con ayuda de la enzima nitrato reductasa. Para ello se colocaron 80 µL de sobrenadante en la microplaca de 96 pozos, se agregaron 10 µL de enzima nitrato reductasa y 10 µL de cofactor (NADPH) y se dejó incubar por 3 h a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 50 µL del reactivo de Griess 1 (1% de sulfanilamida en ácido fosfórico al 5%) y 50 µL del reactivo de Griess 2 (*N*-naftiletildiamina al 2%) dejando reaccionar por 10 min. Se determinaron las absorbancias a una longitud de onda de 540 nm.²²

7.12 Análisis estadístico.

Los datos presentados son expresados como la media ± el error estándar de la media (EEM) (n=5). Los datos de dosis-respuesta fueron analizados mediante la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey para las comparaciones *post hoc*. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como una diferencia estadísticamente significativa entre las medias.

8. Resultados.

8.1 Caracterización del aceite esencial de *L. porteri*

De la hidrodestilación de la raíz de *L. porteri* se obtuvieron 4.4 g de aceite esencial correspondiente a un rendimiento del 0.63% con respecto a la raíz seca. En el análisis de CG-EM (Fig 6) se identificaron 37 compuestos químicos que incluyen monoterpenos (28.16%), ftálicas (22.4%) y sesquiterpenos (5.73%). Los compuestos mayoritarios fueron 4-fenil-3-buten-2-ol (35) (Fig 6) (20.543 %) y (Z)-3-butilidenftálica (36) (Fig 6) (20.544 %) (Tabla 1).

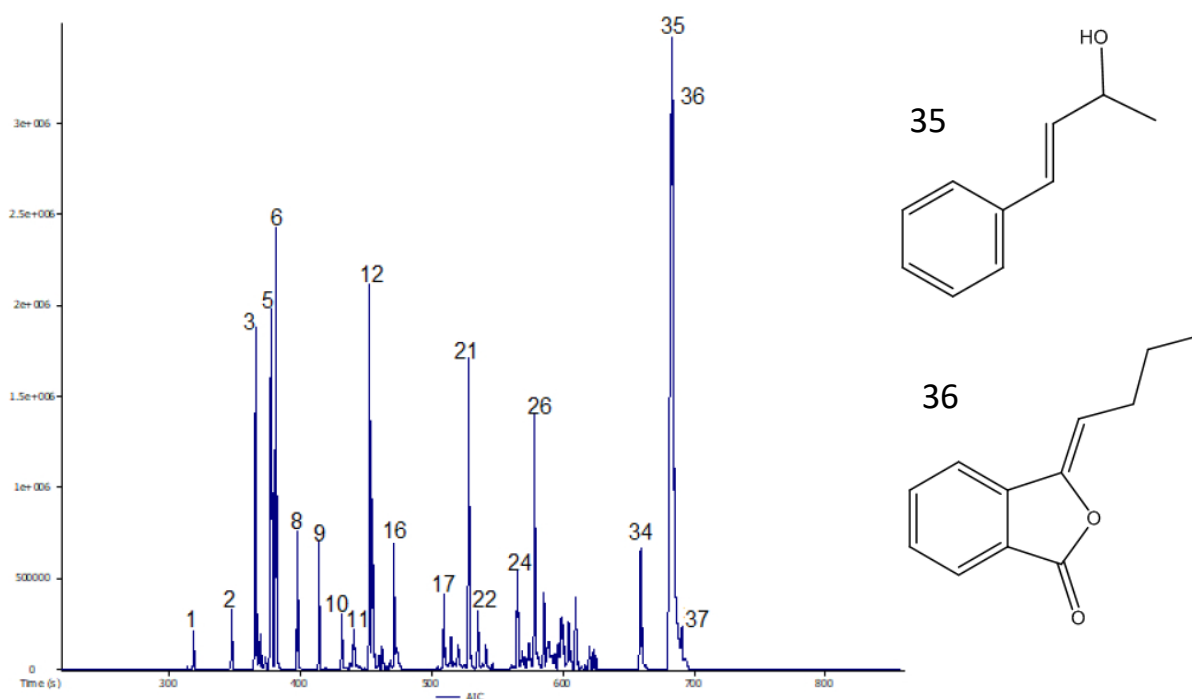


Figura 6. Cromatograma obtenido del aceite esencial de la raíz de *Ligusticum porteri* por CG-EM y estructuras de 4-fenil-3-buten-2-ol (35) y (Z)-3-Butilidenftálica (36)

Tabla 1. Composición química del aceite esencial de la raíz de *Ligusticum porteri*.

^aCompuestos enlistados en orden de elución. ^bIR = Índice de retención lineal relativo a los *n*-alcanos C₈-C₂₄ en la columna capilar DB-5MS. ^cTR = Tiempo de retención en segundos.

Pico	Compuesto ^a	IR ^b	TR (s) ^c	Fórmula molecular; Similaridad	CAS	Cont., %
1	α -pineno	931.08	318.981	C ₁₀ H ₁₆ ; 970	2437-95-8	0.80636
2	β -pineno	972.96	348.381	C ₁₀ H ₁₆ ; 971	127-91-3	0.80777
3	α -felandreno	998.6	366.381	C ₁₀ H ₁₆ ; 854	99-83-2	3.8335
4	3-careno	1004.6	369.781	C ₁₀ H ₁₆ ; 920	13466-78-9	0.49243
5	α -cimeno	1020.8	378.331	C ₁₀ H ₁₄ ; 963	527-84-4	4.4351
6	ciclobutanacetoniitrilo, 1-metil-2- (1-metiletenil)	1026.6	381.381	C ₁₀ H ₁₅ N; 834	55760-15-1	5.4543
7	sabineno	1027.2	381.681	C ₁₀ H ₁₆ ; 892	3387-41-5	5.5273
8	γ -terpineno	1058.4	398.131	C ₁₀ H ₁₆ ; 800	99-84-3	1.9547
9	terpinoleno	1089.5	414.531	C ₁₀ H ₁₆ ; 898	586-62-9	1.2823
10	4-careno, <i>cis</i> -(-)-	1122.5	431.931	C ₁₀ H ₁₆ ; 823	5208-49-1	0.82414
11	hidrato <i>trans</i> -sabineno	1139.6	440.931	C ₁₀ H ₁₈ O; 814	17699-16-0	0.88897
12	(<i>E,E,Z</i>)-undeca-1,3,5,8-tetraeno	1162.7	453.131	C ₁₁ H ₁₆ ; 803	50277-31-1	4.2783
13	pentenilbenzeno	1167.5	455.631	C ₁₁ H ₁₄ ; 912	826-18-6	1.9423
14	<i>p</i> - α -dimetil estireno	1181.1	462.781	C ₁₀ H ₁₂ ; 848	1195-32-0	0.45319
15	dihidrocarveol	1192.3	468.731	C ₁₀ H ₁₈ O; 740	619-01-2	0.1953
16	biciclo[3.1.0]hex-3-en-2-ol	1198.6	472.031	C ₁₀ H ₁₆ O; 852	97631-68-0	2.4798
17	formiato de bornilo	1285.3	509.481	C ₁₁ H ₁₈ O ₂ ; 886	1200-67-5	0.97094
18	timol	1297.3	514.631	C ₁₀ H ₁₄ O; 883	89-83-8	0.4369
19	<i>trans</i> -verbenol	1298.2	515.031	C ₁₀ H ₁₆ O; 829	1820-09-3	0.4369
20	<i>trans</i> -3-Caren-2-ol	1311.6	520.781	C ₁₀ H ₁₆ O; 820	93905-79-4	0.67621
21	acetato de mirtenilo	1329.1	528.331	C ₁₂ H ₁₈ O ₂ ; 841	1079-01-2	3.8613
22	silvestreno	1346.1	535.631	C ₁₀ H ₁₆ ; 861	1461-27-4	0.60661
23	acetato de carvilo	1360.3	541.731	C ₁₂ H ₁₈ O ₂ ; 803	97-42-7	0.76582
24	α -bulneseno	1417.5	565.431	C ₁₅ H ₂₄ ; 719	3570-04-5	1.2036
25	canfeno, (-)-	1441.7	574.531	C ₁₀ H ₁₆ ; 853	5794-04-7	0.6075
26	α -acoradieno	1471.5	585.781	C ₁₅ H ₂₄ ; 865	24048-44-0	0.82568
27	seicheleno	1501.8	597.231	C ₁₅ H ₂₄ ; 870	20085-93-2	0.38995
28	thujopseno	1506.9	599.131	C ₁₅ H ₂₄ ; 768	470-40-6	1.9416
29	2-hepten-1-ol, 2-metil-6-(4-metilfenil) -, (<i>E</i>) -	1511.6	600.931	C ₁₅ H ₂₂ O; 718	39599-18-3	1.9416
30	3-etenoxi-1-metilciclohexeno	1521	604.481	C ₉ H ₁₄ O; 785	100144-30-7	1.1308
31	carveol	1535.1	609.781	C ₁₀ H ₁₆ O; 813	99-48-9	0.90653
32	γ -elemene	1563.6	620.531	C ₁₅ H ₂₄ ; 896	339154-91-5	0.36031

33	epóxido de calareno	1570.6	623.181	C ₁₅ H ₂₄ O; 768	68926-75-0	0.48149
34	3-propilidenoftalida	1675.9	659.581	C ₁₁ H ₁₀ O ₂ ; 787	17369-59-4	1.8626
35	4-fenil-3-buten-2-ol	1748.2	683.681	C ₁₀ H ₁₂ O; 652	17488-65-2	20.543
36	3-butilidenftálida, (Z)-	1749.5	684.131	C ₁₂ H ₁₂ O ₂ ; 734	551-08-6	20.544
37	Aloaromadendreno	1769.2	690.681	C ₁₅ H ₂₄ ; 830	109119-91-7	0.27305
Total identificado, %						96.42

8.2 Obtención de la nanoemulsión del aceite esencial de *L. porteri*

La NEAE de *L. porteri* y su vehículo, presentaron las características viscoelásticas y el comportamiento no newtoniano propias de una nanoemulsión.⁴² El tamaño de la gota promedio fue de 178.9 ± 0.66 nm para la NEAE y de 271.3 ± 2.50 nm para el vehículo, con una polidispersibilidad de 0.338 ± 0.02 nm para la NEAE y de 0.369 ± 0.01 nm para el vehículo (Fig 7).

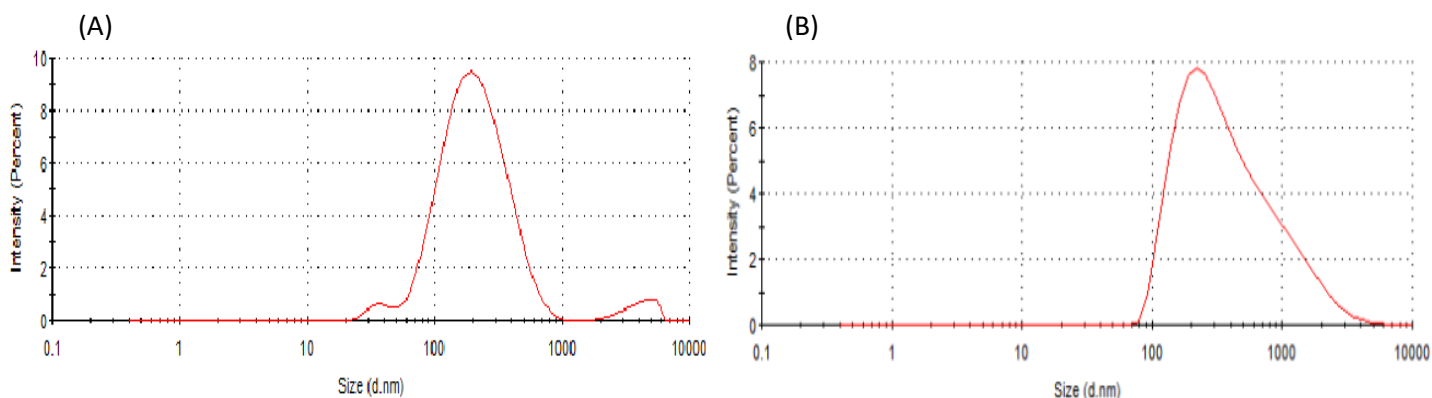
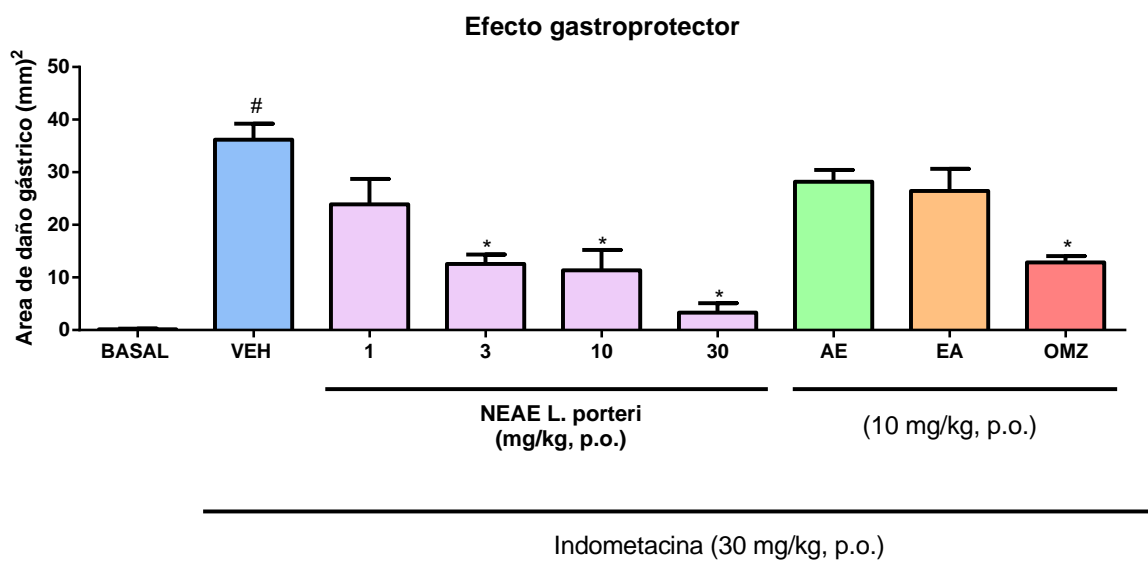


Figura 7. (A) Distribución del tamaño de partícula de la NEAE obtenida de *L. porteri* (gota promedio: $178.9 \text{ nm} \pm 0.66 \text{ nm}$; Pdl $0.338 \pm 0.02 \text{ nm}$). (B) Distribución del tamaño de partícula del vehículo (gota promedio: $271.3 \pm 2.50 \text{ nm}$; Pdl $0.369 \pm 0.01 \text{ nm}$)

8.3 Evaluación del efecto gastroprotector

La administración del AINE indometacina generó lesiones hemorrágicas puntuales que se extienden en todo el cuerpo y antro del estómago (Fig 8B), donde se observa un incremento en el área de daño en el grupo tratado con indometacina ($36.17 \pm 3.04 \text{ mm}^2$) con respecto al grupo basal (de $0.16 \pm 0.08 \text{ mm}^2$) (Gráfica 1; $p < 0.05$). Con el tratamiento previo de la NEAE en las dosis de 3, 10 y 30 mg/kg, p.o. se reducen significativamente las lesiones gástricas ($12.56 \pm 1.80 \text{ mm}^2$, $11.37 \pm 3.85 \text{ mm}^2$ y $3.32 \pm 1.78 \text{ mm}^2$, respectivamente),

siendo la dosis de 30 mg/kg la que mostró un efecto mayor (Gráfica 1; $p < 0.05$). Por otra parte, el AE no emulsionado a dosis de 10 mg/kg y el EA a dosis de 10 mg/kg no mostraron efecto gastroprotector (Fig 8D y E), ya que no hubo una diferencia estadísticamente significativa de sus áreas de daño ($28.20 \pm 2.23 \text{ mm}^2$ y $26.42 \pm 4.24 \text{ mm}^2$, respectivamente) con respecto al grupo de daño. Finalmente, el efecto gastroprotector de omeprazol (10 mg/kg) ($12.87 \pm 1.17 \text{ mm}^2$) no presentó diferencia significativa con respecto a los tratamientos con la nanoemulsión del aceite esencial (NEAE) pero si con respecto al grupo dañado con indometacina (Gráfica 1 y Fig 8; $p < 0,05$).



Gráfica 1. Área de daño gástrico con la NEAE (1, 3, 10, 30 mg/kg, p.o.), el AE sin emulsión (10 mg/kg p.o.), el EA (10 mg/kg p.o.) y el omeprazol (OMZ) (10 mg/kg p.o.) en el modelo de daño gástrico con indometacina. Vehículo (VEH) = Tween 80 + Span 20 Sol. salina 0.9%. Los datos son presentados como el promedio \pm error estándar (n=48) # $P < 0.05$ vs Basal * $P < 0.05$ vs Vehículo y vs AE y EA. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

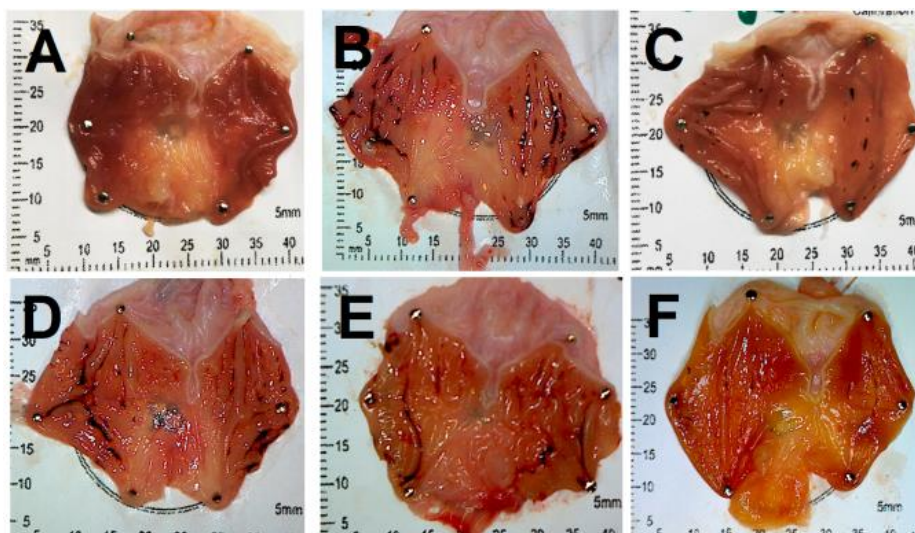


Figura 8. Imagen representativa de las lesiones gástricas con los diferentes tratamientos. A=basal, B=daño, C=NEAE 10 mg/kg D=AE 10 mg/kg, E=EA 10 mg/kg y F=omeprazol 10 mg/kg.

Con los resultados obtenidos del área de daño, se calculó el porcentaje de gastroprotección para las NEAE (Tabla 2), se graficó el porcentaje de gastroprotección vs el Log de la dosis. Obteniendo una dosis efectiva 50 (DE₅₀) de 2.030 ± 0.689 mg/kg.

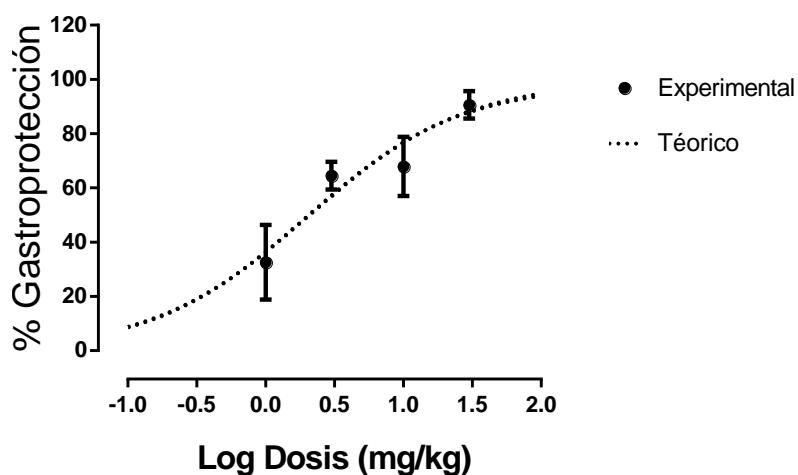


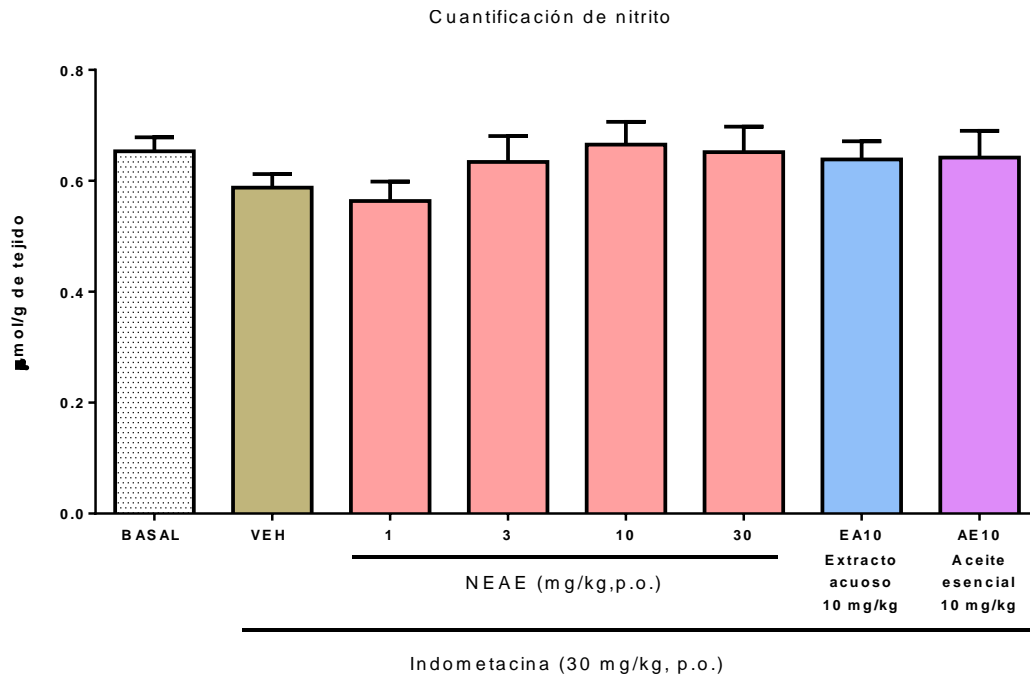
Tabla 1. Porcentajes de gastroprotección de la NEAE. ^aPromedio ± EEM

Dosis (mg/kg)	% gastroprotección ^a
1	32.59 ± 13.72
3	64.55 ± 5.106
10	67.91 ± 10.88
30	90.63 ± 5.031

Gráfica 2. Curva Dosis-Respuesta de las nanoemulsiones de aceite esencial. E_{MAX} = 98.55, h = 0.7616, DE₅₀ = 2.030 ± 0.689 mg/kg.

8.4 Evaluación de la participación de óxido nítrico en el efecto gastroprotector del aceite esencial de *L.porteri*

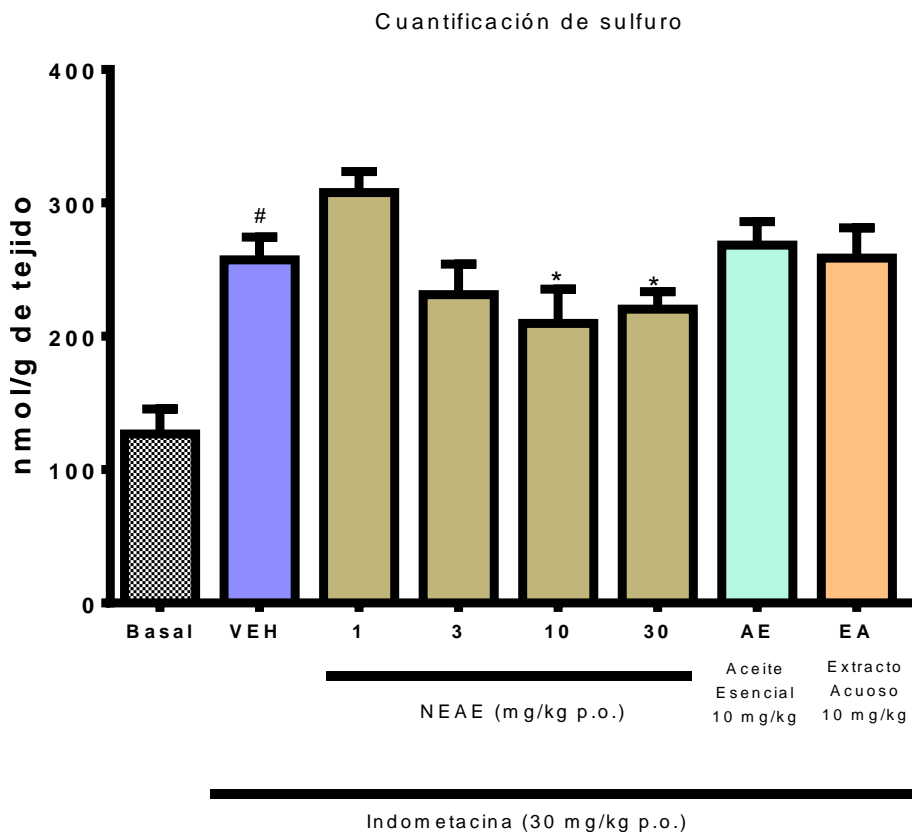
El pretratamiento con aceite esencial de *L. porteri* en cualquiera de sus formulaciones no modificó los niveles gástricos de NO de manera significativa, sin embargo se observa una ligera disminución en el grupo dañado con indometacina (0.587 ± 0.024 μmol/g tejido) con respecto al grupo basal (0.653 ± 0.03 μmol/g tejido) (Gráfica 3), aunque no es significativa.



Gráfica 3. Efecto de los tratamientos en los niveles de NO_2^- en el modelo de daño gástrico inducido con indometacina. Los datos son presentados como el promedio \pm EEM (n=5-10) vehículo= Tween 80 + Span 20 sol. salina 0.9%. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

8.5 Evaluación de la participación de sulfuro de hidrógeno (H_2S) en el efecto gastroprotector del aceite esencial de *L. porteri*.

La administración de indometacina generó un incremento en los niveles gástricos de H_2S (263.3 ± 6.04 nmol/g tejido) de manera significativa con respecto al grupo basal (126.8 ± 8.33 nmol/g tejido) (Gráfica 4; $p < 0,05$). La dosis de 10 mg/kg y 30 mg/kg de la NEAE (209.7 ± 11.50 nmol/g tejido y 222 ± 5.30 nmol/g de tejido, respectivamente) lograron revertir el incremento de H_2S de manera significativa con respecto al grupo dañado, pero no logran disminuirlo a niveles basales (Gráfica 4). Por otra parte, los tratamientos de AE 10 mg/kg y EA 10 mg/kg (268.4 ± 7.87 nmol/g tejido y 258.6 ± 10.16 nmol/g tejido respectivamente) no modificaron de manera significativa los valores de H_2S con respecto al grupo de daño (Gráfica 4; $p < 0,05$).



Gráfica 4. Efecto de los tratamientos en los niveles de H₂S en un modelo de daño gástrico inducido con indometacina. Los datos son presentados como el promedio ± EEM (n=5). Vehículo = Tween 80 + Span 20 sol. salina 0.9% # P<0.05 vs Basal * P<0.05 vs Vehículo., ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

9. Discusión de resultados.

Los resultados obtenidos del análisis de CG-EM del aceite esencial de *L. porteri*, coinciden con los de Rivero y colaboradores.⁴⁶ En ambos trabajos se lo establecer que la (Z)-3-butilidenftálida es uno de los principales compuestos en el AE. Por otra parte, Cégiela-Carlio y su equipo⁴² descubrieron que los componentes que se presentan en un mayor porcentaje en el AE obtenido por hidrodestilación son los terpenos (73.4%) y las ftálicas (14.4%). Mientras que Collin y colaboradores indica que el monómero (Z)-3-butilidenftálida representó solo un 0.05% del contenido del aceite esencial.⁴⁷ Estas variaciones en el contenido de los principales compuestos obtenidos en los diferentes estudios pueden estar relacionadas a las condiciones ambientales donde fueron cultivadas las plantas y al método de extracción del aceite.⁴⁸

Se considera que las nanoemulsiones son una clase de emulsiones con tamaños de gota en escala nanométrica, normalmente en un rango entre 50 y 500 nm⁴⁹, por lo tanto nuestras preparaciones con el AE de *L. porteri* están dentro del rango esperado para este tipo de formulación, ya que tuvieron un tamaño de gota promedio de 178.9 nm ± 0.66 nm.

Las NEAE en las dosis de 3, 10 y 30 mg/kg presentaron un efecto gastroprotector significativo en el modelo de daño gástrico inducido con indometacina. Trabajos previos en nuestro grupo de trabajo habían demostrado que el efecto gastroprotector del extracto hexánico de *L. porteri* sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol se debe al compuesto (Z, Z')-diligustílida (DLG). Sin embargo, es importante mencionar que en el análisis de CG-EM del aceite esencial de *L. porteri* no se logró identificar a este metabolito. Lo anterior deja en evidencia que la DLG no es el único responsable de las propiedades gastroprotectoras atribuidas a *L. porteri*. Por lo que puede haber otros metabolitos implicados en el efecto gastroprotector del aceite de esta planta. De uno de los compuestos mayoritarios del aceite, la (Z)-3-butilidenftálida, se han demostrado múltiples propiedades farmacológicas, como por ejemplo su efecto antihiper glucemiante al inhibir la α -glucosidasa,⁴¹ sus propiedades antinociceptivas,³⁹ también se ha observado que ejerce efectos antiproliferativos sobre células tumorales tanto *in vitro* como en ratas,⁵⁰

lo que hace a este compuesto un atractivo candidato para posteriores estudios sobre su probable responsabilidad en las propiedades farmacológicas del aceite.

Por otra parte, el EA y el AE no emulsionados no mostraron una disminución significativa de las lesiones gástricas en el modelo de daño por indometacina. Sin embargo, la NEAE tuvo un efecto dos veces mayor que el EA y el AE en las mismas dosis. Estas diferencias entre la NEAE y el AE no emulsionado se pueden deber a que en la nanoemulsión, el AE tiene una mayor área de contacto y se puede distribuir de mejor forma, favoreciendo la actividad de los principios activos.⁵¹ También se ha demostrado que algunos terpenos contenidos en los aceites esenciales, facilitan la penetración de varios fármacos. Se considera que la barrera de la capa lipídica se rompe debido a los enlaces de hidrógeno competitivos entre los lípidos y los terpenos, lo que conduce a una menor energía de activación de las moléculas para difundirse⁵² lo que puede ayudar a los metabolitos activos a tener una mejor absorción. Nuestros resultados concuerdan con estudios realizados sobre otras plantas como *Angelica sinensis*, donde se descubrió que la administración oral de una nanoemulsión del monómero Z-ligustílida purificada a partir del aceite esencial de *Angelica sinensis*, aumenta su efecto antiinflamatorio en comparación con la Z-ligustílida en una preparación sin nanoemulsión.⁵³

También se decidió realizar la comparación de nuestros tratamientos con un fármaco de referencia, el omeprazol, el cual disminuyó significativamente las lesiones gástricas inducidas con indometacina. Cabe mencionar que no hubo una diferencia significativa con ninguna de las dosis de NEAE evaluadas, por lo que esta preparación fue tan efectiva como el omeprazol para generar gastroprotección. Estos resultados son relevantes porque se sabe que los IBPs disminuyen la producción de HCl y son los de primera elección en enfermedades relacionadas con daño gástrico. Sin embargo, el período de uso prolongado conlleva un mayor riesgo de infecciones entéricas por *Clostridium difficile*, *Salmonella* y *Campylobacter*³⁵ además de empeorar notablemente el daño intestinal ligero causado por los AINEs.⁴³ Por lo tanto, la emulsión del aceite esencial de *L. porteri* podría servir como una nueva opción terapéutica

contra la gastropatía relacionada con los AINEs ya que hasta el momento no se han reportado efectos adversos al ser administrados por vía oral.

El H₂S tiene una importante participación en la defensa de la mucosa gastrointestinal mediante sus efectos citoprotectores y antioxidantes. Al generar el daño con la administración de indometacina, se observó un incremento en los niveles de H₂S, en estudios anteriores se ha observado que la inducción de ulceración gástrica se asocia con un aumento de la expresión de las enzimas CSE y CBS lo que lleva a un aumento en los niveles de H₂S,⁵⁴ ya que esta es una respuesta defensiva, dirigida a mitigar las lesiones tisulares y acelerar la reparación. De igual manera, la exposición a estrés por inmersión incrementa la actividad de la ruta enzimática CSE/CBS que resulta en una producción elevada de H₂S *in vitro* en la mucosa gástrica. Con los tratamientos de NEAE a dosis de 10 mg/kg y de 30 mg/kg se observó una disminución significativa de los niveles de H₂S, sugiriendo que éste preparado puede regular la liberación de este gasotransmisor como la DLG, que actúa como responsable de la regulación de la liberación de H₂S como mecanismo de acción en su actividad gastroprotectora.⁵⁵

El NO modula la secreción de moco, el flujo sanguíneo e inhibe la adherencia de leucocitos la endotelio.²⁰ Se ha observado que los AINEs inhiben la actividad de la iNOS,⁵⁶ la cual sintetiza NO cuando el organismo se encuentra en amenaza, por lo que se esperaba ver una disminución en los niveles de NO en el grupo tratado con indometacina, y así fue, aunque esta diferencia con el grupo basal no fue estadísticamente significativa. Con respecto a los resultados obtenidos en los diversos tratamientos, en este estudio, no se logró observar una diferencia significativa con respecto al grupo de daño. Por lo tanto, es evidente que el AE de *L. porteri* no tiene un efecto en la modulación del NO.

Como se ha mencionado anteriormente, existen gasotransmisores que participan en la regulación de la defensa mucosal. Los resultados obtenidos respecto a los gasotransmisores gástricos (NO y H₂S), nos sugieren que la modulación del H₂S podría ser el mecanismo por el cual se genera el efecto gastroprotector del AE de *L. porteri*, además existen otros mecanismos por los cuales se genera la gastroprotección. Como el efecto antiinflamatorio y

antioxidante, ya que en el daño por AINEs, el estrés oxidativo y la activación de la vía inflamatoria son mecanismos que participan de manera importante. Al respecto se ha demostrado que la *Z*-3-butilidenftálida tiene efectos antiinflamatorios y antioxidantes mediante la inducción de factores de transcripción como el Nrf2 que media la activación transcripcional de muchos genes antioxidantes.⁵⁷ Este estudio es el primero en explorar los probables mecanismos de gastroprotección del AE, sin embargo, se necesitan estudios más especializados para caracterizar los probables mecanismos de acción involucrados en efectos antiinflamatorio y antioxidante del AE de *L. porteri*.

10. Conclusiones.

En este trabajo se demostró que la administración del AE de la raíz de *L. porteri* en la preparación de nanoemulsión y a las dosis de 3, 10 y 30 mg/kg tiene un efecto gastroprotector en ratas en el modelo de daño gástrico inducido con indometacina, en tanto que otras formulaciones de *L. porteri*, como el AE sin emulsionar y el EA no presentaron efecto. Además, se evidenció que en el efecto gastroprotector de la NEAE de la raíz de *L. porteri* está involucrada la modulación del gasotransmisor H₂S, pero no en la modulación del NO.

Estos hallazgos muestran evidencia de que la NEAE de *L. porteri* tiene efecto gastroprotector y podría ser utilizada para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la gastropatía inducida con el AINE.

11. Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos del presente trabajo, proponemos las siguientes perspectivas:

Evaluar el perfil antiinflamatorio en el efecto gastroprotector de la NEAE de *L. porteri* en el modelo de daño gástrico por indometacina.

Evaluar la participación de PGE₂ y PGI₂ en el efecto gastroprotector de la NEAE de *L. porteri* en el modelo de daño gástrico por indometacina.

Evaluar el efecto enteroprotector de la NEAE de *L. porteri* en el modelo de daño intestinal por AINEs.

12. Referencias.

1. Salud S de. Manejo de la Úlcera Péptica en Adultos en el primer y segundo niveles de atención. *Ssa-150-08*. 2008:39. doi:10.1115/DETC2010-28427
2. Sostres C, Gargallo CJ, Lanás A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper and lower gastrointestinal mucosal damage. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(SUPPL 3):1-8. doi:10.1186/ar4175
3. Metz D, Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Reviews in basic and clinical gastroenterology. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. *Gastroenterology*. 2008;135:41-60. doi:10.1053/j.gastro.2008.05.030
4. Velázquez-Moyado JA, Martínez-González A, Linares E, Bye R, Mata R, Navarrete A. Gastroprotective effect of diligustilide isolated from roots of *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) on ethanol-induced lesions in rats. *J Ethnopharmacol*. 2015. doi:10.1016/j.jep.2015.08.030
5. Secretaría de salud. Incidencia de casos nuevos de enfermedad por grupos de edad Estados Unidos Mexicanos 2017 Población General. *epidemiologia Salud.gob*. 2017:3. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2017/incidencia/incidencia_casos_nuevos_enfermedad_grupo_edad.pdf.
6. Lew E. Peptic Ulcer Disease. In: Greenberger NJ, Blumberg RS, Burakoff R, eds. *CURRENT Diagnosis & Treatment: Gastroenterology, Hepatology, & Endoscopy*, 3e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2016. <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1119987061>.
7. Secretaría de salud. Panorama epidemiológico de las úlceras, gastritis y duodenitis en México, periodo 2003-2008. *Sist Nac Vigil Epidemiol*. 2010;27(19):4.
8. Guslandi M. Effects of ethanol on the gastric mucosa. *Dig Dis*. 1987;5(1):21-32. doi:10.1159/000171159

9. Hills BA, Butler BD, Lichtenberger LM. Gastric mucosal barrier: hydrophobic lining to the lumen of the stomach Gastric mucosal barrier: hydrophobic to the lumen of the stomach. 1983.
10. Wallace JL. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? *Physiol Rev.* 2008;88(4):1547-1565. doi:10.1152/physrev.00004.2008
11. Kaunitz JD. Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010;26:604-610. doi:10.1097/MOG.0b013e32833f1222
12. Ham M, Kaunitz JD. Gastroduodenal defense. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007;23(6):607-616. doi:10.1097/MOG.0b013e3282f02607
13. Tarnawski AS, Chai J, Jones MK. Esophageal and Gastrointestinal Microcirculation: Essential for Mucosal Protection, a Target for Injury, and a Critical Component of Injury and Ulcer Healing. *Organ Microcirc Keio Univ Int Symp Life Sci Med.* 2005;13:49-61.
14. Szabo S. "Gastric cytoprotection" is still relevant. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014. doi:10.1111/jgh.12735
15. Rang H, Dale M, Ritter J, Flower R. *Farmacología.* Vol 6.; 2008. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
16. Gyires K. Analysis of the effect of different neuropeptides in gastric mucosal defense initiated centrally. *Cell/Tissue Inj Cytoprot Gastrointest Tract Mech Prev Treat.* 2012;30:161-169. doi:10.1159/000338428
17. Holzer P. Resolving the toxic discharge problems of the Sussex field, Wyoming. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007;7(6):563-569. doi:10.1016/j.coph.2007.09.004.Role
18. Stuart IF. *Fisiología Humana.* Vol 91. 12^a. México; 2011.
19. Cryer B. Role of prostaglandins in Stomach and Duodenum. *Gastroenterology Clin North Am.* 2001;30(4):877-894. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/766661>.

20. Lanas A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(SUPPL. 2):2-7. doi:10.1186/ar2465
21. Díaz-Triste NE, González-García MP, Jiménez-Andrade JM, Castañeda-Hernández G, Chávez-Piña AE. Pharmacological evidence for the participation of NO–cGMP–KATP pathway in the gastric protective effect of curcumin against indomethacin-induced gastric injury in the rat. *Eur J Pharmacol.* 2014;730:102-106. doi:10.1016/j.ejphar.2014.02.030
22. Chávez-Piña AE, Tapia-Álvarez GR, Reyes-Ramírez A, Navarrete A. Carbenoxolone gastroprotective mechanism: Participation of nitric oxide/cGMP/K ATP pathway in ethanol-induced gastric injury in the rat. *Fundam Clin Pharmacol.* 2011;25(6):717-722. doi:10.1111/j.1472-8206.2010.00897.x
23. Wallace JL, Vong L, McKnight W, Dickey M, Martin GR. Endogenous and Exogenous Hydrogen Sulfide Promotes Resolution of Colitis in Rats. *Gastroenterology.* 2009;137(2):569-578.e1. doi:10.1053/j.gastro.2009.04.012
24. Rose P, Moore PK, Zhu YZ. H₂S biosynthesis and catabolism: new insights from molecular studies. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(8):1391-1412. doi:10.1007/s00018-016-2406-8
25. Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL. The Emerging Roles of Hydrogen Sulfide in the Gastrointestinal Tract and Liver. *Gastroenterology.* 2006:259-271. doi:10.1053/j.gastro.2006.02.033
26. Kabil O, Banerjee R. Enzymology of H₂S Biogenesis, Decay and Signaling. *Antioxid Redox Signal Redox Signal.* 2014;20(5):770-782. doi:10.1089/ars.2013.5339
27. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de La Terapéutica.* Undécima E. Colombia: McGrawHill; 2007.
28. Fujiwara Y, Schmassmann A, Arakawa T, Halter F, Tarnawski A. Indomethacin Interferes with Epidermal Growth Factor Binding and

- Proliferative Response of Gastric KATO III Cells. *Digestion*. 1995;90822(5):364-369.
29. Takeuchi K. Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: Importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. *World J Gastroenterol*. 2012;18(18):2147-2160. doi:10.3748/wjg.v18.i18.2147
 30. Hidekazu S, Toshihiro N, Hitoshi T, Sachiko M, Toshifumi H. Roles of oxidative stress in stomach disorders. *J Clin Biochem Nutr*. 2012;50(3):174-181. doi:10.3164/jcfn.11
 31. Peskar BM, Maricic N, Gretzer B, Schuligoi R, Schmassmann A. Role of cyclooxygenase-2 in gastric mucosal defense. *Life Sci*. 2001;69(25-26):2993-3003. doi:10.1016/S0024-3205(01)01407-2
 32. Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N. NSAID-Induced gastric damage in rats: Requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*. 2000;119(3):706-714. doi:10.1053/gast.2000.16510
 33. J.M. S. The use of proton pump inhibitors in treating and preventing NSAID-induced mucosal damage. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(SUPPL 3). doi:10.1186/ar4177
 34. Kinoshita Y, Ishimura N, Ishihara S. Advantages and disadvantages of long-term proton pump inhibitor use. *J Neurogastroenterol Motil*. 2018;24(2):182-196. doi:10.5056/jnm18001
 35. Malfertheiner P, Kandulski A, Venerito M. Proton-pump inhibitors: Understanding the complications and risks. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(12):697-710. doi:10.1038/nrgastro.2017.117
 36. Wallace JL, Nagy P, Feener TD, et al. A Proof-of-Concept, Phase 2 Clinical Trial of the Gastrointestinal Safety of a Hydrogen Sulfide-Releasing Anti-Inflammatory Drug. *Br J Pharmacol*. 2019. doi:10.1111/bph.14641
 37. Wilson MF. Medicinal Plant Fact Sheet: *Ligusticum porteri* / Osha. 2007.
 38. Linares E, Bye RA. a Study of Four Medicinal Plant Complexes of Mexico.

- J Ethnopharmacol.* 1987;19:153-183.
39. Juárez-Reyes K, Ángeles-López GE, Rivero-Cruz I, Bye R, Mata R. Antinociceptive activity of *Ligusticum porteri* preparations and compounds. *Pharm Biol.* 2014;52(1):14-20. doi:10.3109/13880209.2013.805235
 40. Nguyen K, Sparks J, Omoruyi FO. Investigation of the cytotoxicity, antioxidative and immune-modulatory effects of *Ligusticum porteri* (Osha) root extract on human peripheral blood lymphocytes. *J Integr Med.* 2016;14(6):465-472. doi:10.1016/S2095-4964(16)60280-7
 41. Brindis F, Rodríguez R, Bye R, González-Andrade M, Mata R. (Z)-3-butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an α -glucosidase inhibitor. *J Nat Prod.* 2011;74(3):314-320. doi:10.1021/np100447a
 42. Cégiéla-Carlio P, Bessièrè JM, David B, Mariotte AM, Gibbons S, Dijoux-Franca MG. Modulation of multi-drug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus* by Osha (*Ligusticum porteri* L., Apiaceae) essential oil compounds. *Flavour Fragr J.* 2005;20(6):671-675. doi:10.1002/ffj.1584
 43. Wallace JL. Mechanisms, prevention and clinical implications of nonsteroidal anti-inflammatory drug-enteropathy. *World J Gastroenterol.* 2013;19(12):1861-1876. doi:10.3748/wjg.v19.i12.1861
 44. Bulatov A V, Goldvirt DK, Moskvin LN, Moskvin AL, Vaskova EA. Stepwise Injection Photometric Determination of Hydrogen Sulfide in Natural Gas. *J Flow Inject Anal.* 2006;23(2):102-106.
 45. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982. doi:10.1016/0003-2697(82)90118-X
 46. Rivero I, Juárez K, Zuluaga M, Bye R, Mata R. Quantitative HPLC method for determining two of the major active phthalides from *Ligusticum porteri* Roots. *J AOAC Int.* 2012. doi:10.5740/jaoacint.11-151
 47. Collin G, Gagnon H, St-Gelais A, Turcotte M. Composition of the essential

- oil and the hydrosol of the roots of *Ligusticum porteri*. *Am J Essent Oils Nat Prod.* 2014;1(3):4-10. <http://www.essencejournal.com/vol2/issue1/pdf/2.1.pdf>.
48. Sacchetti G, Medici A, Maietti S, et al. Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in comparison with commercial essential oils. *J Agric Food Chem.* 2004;52(11):3486-3491. doi:10.1021/jf035145e
 49. D. Morales, † ‡, J. M. Gutiérrez ‡, M. J. García-Celma, † A, Y. C. Solans* †. A Study of the Relation between Bicontinuous Microemulsions and Oil/Water Nano-emulsion Formation. *Langmuir.* 2003;19(18):7196-7200. doi:10.1021/LA0300737
 50. Tsai NM, Chen YL, Lee CC, et al. The natural compound n-butylidenephthalide derived from *Angelica sinensis* inhibits malignant brain tumor growth in vitro and in vivo³. *J Neurochem.* 2006;99(4):1251-1262. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04151.x
 51. Borges RS, Keita H, Ortiz BLS, et al. Anti-inflammatory activity of nanoemulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: in vitro and in zebrafish studies. *Inflammopharmacology.* 2018;26(4):1057-1080. doi:10.1007/s10787-017-0438-9
 52. Fox LT, Gerber M, Du Plessis J, Hamman JH. Transdermal drug delivery enhancement by compounds of natural origin. *Molecules.* 2011;16(12):10507-10540. doi:10.3390/molecules161210507
 53. Ma Z, Bai L. Anti-inflammatory effects of Z-Ligustilide nanoemulsion. *Inflammation.* 2013;36(2):294-299. doi:10.1007/s10753-012-9546-2
 54. Wallace JL, Dickey M, McKnight W, Martin GR. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. *FASEB J.* 2007;21(14):4070-4076. doi:10.1096/fj.07-8669com
 55. Velázquez-Moyado JA, Balderas-López JL, Sánchez-Ortiz BL, Navarrete A, Tavares-Carvalho JC, Pineda-Peña EA. Diligustilide releases H₂S and stabilizes S-nitrosothiols in ethanol-induced lesions on rat gastric mucosa.

Inflammopharmacology. 2017;26(2):611-619. doi:10.1007/s10787-017-0392-6

56. Stratman NC, Carter DB, Sethy VH. Ibuprofen: Effect on inducible nitric oxide synthase. *Mol Brain Res*. 1997;50(1-2):107-112. doi:10.1016/S0169-328X(97)00168-X
57. Saw C, Wua Q, Su Z-Y, et al. Effects of natural phytochemicals in *Angelica sinensis* (Danggui) on Nrf2-mediated gene expression of phase II drug metabolizing enzymes and anti-inflammatio. *Biopharm Drug Dispos*. 2013;34:303-311. doi:10.1002/bdd