



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**Estudio biodirigido de la actividad gastroprotectora de
Eupatorium aschembornianum Schauer utilizando el modelo
de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas wistar.**

**Tesis que para obtener el título de Químico Farmacéutico
Biólogo**

presenta:

Paula Gabriela Sánchez Gómez

Dr. Jesús Arrieta Valencia

Director de tesis.

Dr. Benito Reyes Trejo

Asesor de tesis.





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ÁGRADECIMIENTOS:

A la Escuela Superior de Medicina del Instituto Polotecnico Nacional por el financiamiento del presente proyecto. Registro asignado por la SIP: 20090816

Al Dr Jesús Arrieta Valencia por su apoyo, comentarios y consejos durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Benito Reyes Trejo por su contribución durante la realización del presente trabajo.

Dedicatoria:

Con amor incondicional dedico este trabajo a mi familia, amigos y a ti amor, porque me dan la motivación para seguir adelante y la inspiración para vivir.

A quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a una hija: Amor.

A quienes sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme.

A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo por esto y más gracias.

Índice

I. Introducción	1
II. Fundamento teórico	2
2.1. Úlcera gástrica	2
2.2. Clasificación	3
2.2.1. Localización	3
2.2.2. Hipersecreción de ácido	3
2.3. Etiología y patología.....	4
2.3.1. Uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos.....	5
2.3.2. Consumo de tabaco	6
2.3.3. Alcohol.....	6
2.3.4. <i>Helicobacter pylori</i>	7
2.3.5. Estrés.....	7
2.3.6. Otros factores	8
2.4. Sintomatología.....	8
2.5. Mecanismo de defensa de la mucosa gástrica	9
2.5.1. Factores funcionales	9
2.5.2. Factores humorales	12
2.5.2.1. Prostaglandinas	12
2.5.3. Factores neuronales.....	14
2.5.4. Otros mecanismos de defensa de la mucosa gástrica	15
2.6. Fármacos empleados para el tratamiento de úlcera gástrica	16
2.6.1. Clasificación	16
2.6.2. Antiácidos	16
2.6.3. Supresores de la secreción ácida.....	17
2.6.4. Fármacos citoprotectores	20

2.6.5. Meciadanol.....	23
2.6.6. Sulglicótido.....	23
2.6.7. Alginato	23
2.7. Plantas medicinales en el tratamiento de la úlcera gástrica.....	23
2.7.1. Plantas mexicanas con actividad gastroprotectora.....	24
2.7.2. <i>Hippocratea excelsa</i> (Cancerina).....	24
2.7.3. <i>Amphipterygium adstringens</i> (Cuachalalate).....	24
2.7.4. <i>Croton reflexifolius</i> (Huilocuahuitl)	25
2.7.5. <i>Eupatorium aschembornianum</i> (Axihuitl).....	25
2.8. Metabolitos secundarios aislados de plantas con actividad antiulcerosa	25
2.8.1. Triterpenoides	26
2.8.2. Flavonoides	27
2.8.3. Gomas y mucílagos.....	27
2.8.4. Saponinas	28
2.8.5. Taninos.....	28
2.8.6. Alcaloides	29
2.8.7. Aceites	29
III. Planteamiento del problema.....	30
IV. Hipótesis	31
V. Objetivos	32
5.1 Objetivo general	32
5.2. Objetivos específicos.....	32
VI. Materiales y métodos	33
6.1. Material vegetal.....	33
6.2. Preparación de los extractos de las hojas de <i>E. aschembornianum</i>	33
6.3. Fraccionamiento cromatográfico.....	33

6.4. Procedimientos generales	34
6.5. Datos Espectroscopicos	34
6.6. Animales.....	35
6.7. Fármacos.....	35
6.9. Lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con indometacina ..	38
6.10. Lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con L-NAME	40
6.11. Lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con NEM.....	43
6.12. Estadística.....	43
VII. Resultados.....	45
7.1. Efectos gastroprotectores.....	45
VIII. Discusión.....	55
8.1. Participación del óxido nítrico en el efecto gastroprotector de la enecanescina	55
8.2. Participación de las prostaglandinas en el efecto gastroprotector de la enecanescina	56
8.3. Participación de los grupos sulfhídrido en el efecto gastroprotector de la enecanescina	56
IX. Conclusiones	58
X. Perspectivas.....	59
XI. Bibliografía	60
XII. Anexo.....	68

Resumen

La planta medicinal *Eupatorium aschembornianum* Shauer (axihuitl) es comúnmente utilizada por la población del estado de Morelos, México. De acuerdo con la medicina popular, se considera útil en el tratamiento de la gastritis y úlcera gástrica. Por lo que el objetivo del presente trabajo científico es el estudio de la actividad gastroprotectora de dicha planta, para probar la validez de esta práctica, se utilizó el modelo experimental de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas wistar. Los resultados obtenidos muestran que el extracto hexánico presenta la mayor actividad (85.65 ± 4.76 % de gastroprotección a la dosis de 100 mg/kg). Respecto al fraccionamiento cromatográfico biodirigido del extracto hexánico, la fracción F2 obtenida con hexano/ acetato de etilo (9:1) fue la más activa con 83.19 ± 5.63 % de gastroprotección. Estos resultados proporcionan una evidencia de que axihuitl posee actividad gastroprotectora y que la enecanescina aislada de la F2, fue el principal compuesto gastroprotector. Las ratas tratadas oralmente con enecanescina mostraron un efecto similar al que se produjo con la administración de carbenoxolona (fármaco utilizado como referencia). Los efectos producidos por enecanescina y carbenoxolona fueron disminuidos por el tratamiento previo, ya sea con N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 70 mg/kg i.p.), un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, N-etilmaleimida (NEM, 10 mg/kg s.c.), bloqueador de los grupos sulfhídrido e indometacina (10 mg kg⁻¹ s.c.), inhibidor de la síntesis de prostaglandinas; esto sugiere que el mecanismo gastroprotector de este cromeno involucra la participación de óxido nítrico, grupos sulfhídrido endógenos y prostaglandinas. En conclusión, *E. aschembornianum* contiene compuestos con actividad gastroprotectora. La enecanescina, que se aisló de esta planta, es el principal compuesto con actividad gastroprotectora, con una eficacia similar a la que se presenta con el uso de carbenoxolona. El óxido nítrico, grupos sulfhídrido y las prostaglandinas están implicados en el mecanismo de acción gastroprotector de la enecanescina.

I. Introducción

La úlcera es una zona lesionada de la mucosa gástrica. Esta es una enfermedad recurrente y puede convertirse en un padecimiento crónico. Generalmente la úlcera péptica es causada por un desequilibrio entre factores agresivos (ácido, pepsina, infección por *Helicobacter pylori* entre otros), y los factores de defensa de la mucosa gástrica tales como: secreción de moco, bicarbonato, prostaglandinas, óxido nítrico, grupos sulfhídricos y flujo sanguíneo (Bruntom, 1996; Abdel-Salam, 2001).

La úlcera gástrica está entre una de las enfermedades más frecuentes a nivel mundial. En años recientes se han tenido grandes avances para el tratamiento de este padecimiento con el uso de medicamentos alopáticos, sin embargo, debido a sus efectos adversos se han contemplado métodos alternativos. En México ha surgido el interés por tratamientos naturales, como los provenientes de origen vegetal, que se ha reflejado en la selección de un gran número de especies de plantas. Este es el caso de *Hippocratea excelsa* (cancerina), *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate), *Croton reflexifolius* (huilocuahuatl) entre otras; plantas que se utilizan comúnmente en el tratamiento de la úlcera péptica, especialmente sus derivados y extractos, debido a que son una de las principales fuentes en la obtención de nuevos fármacos para el tratamiento de este padecimiento (Falcão *et al.*, 2008).

Se conoce que la planta *Eupatorium aschbornianum* Schauer (Axihuitl) es utilizada ampliamente por la población del estado de Morelos, México, para tratar de manera empírica la úlcera gástrica, sin embargo, no existe ningún reporte científico que acredite el uso tradicional de esta planta, por tal razón el presente trabajo tiene como finalidad, aislar e identificar el o los compuestos responsables de la actividad, así como determinar el grado de participación de los principales factores protectores de la mucosa gástrica, considerando la participación de las prostaglandinas, el óxido nítrico y los grupos sulfhídricos, y de esta forma obtener información acerca su posible mecanismo de acción.

II. Fundamento teórico

2.1. Úlcera gástrica

La úlcera gástrica es una lesión en la mucosa o una pérdida de tejido claramente circunscrita, que se extiende y puede penetrar la capa muscular superficial (*muscularis mucosae*; Figura 1), la cual recubre el tubo digestivo (Moreira y López, 2004). Dicho proceso ocurre cuando hay una alteración en el balance normal, inducido por factores agresivos o por una disminución en la resistencia de la mucosa (Borrelli e Izzo, 2000).

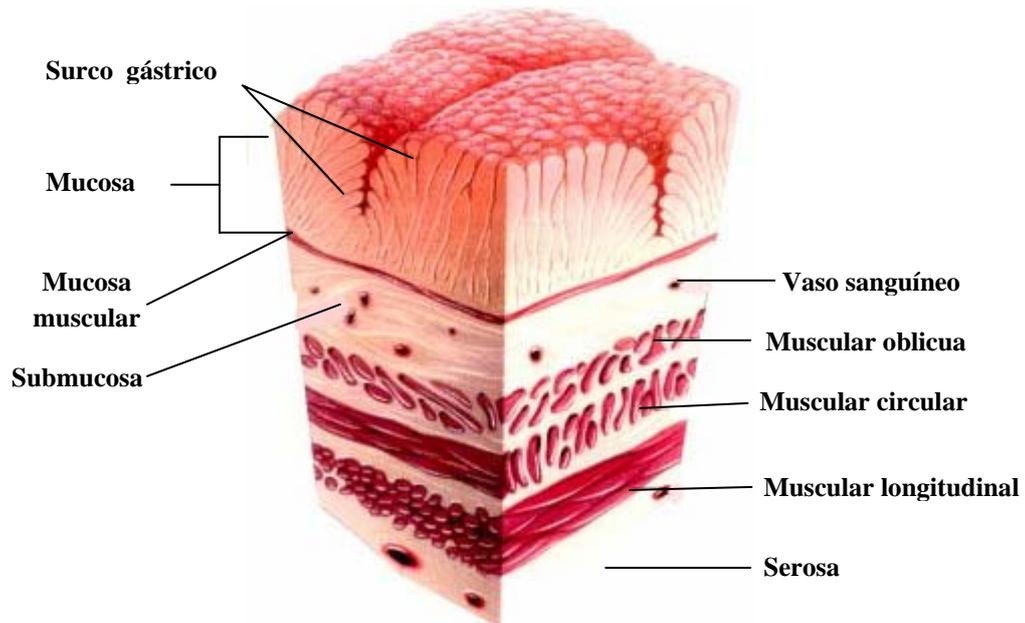


Figura 1. Capas de la mucosa gástrica

2.2. Clasificación

2.2.1. Localización

Cuando esta lesión se localiza en la mucosa estomacal se denomina úlcera gástrica y cuando se presenta en la primera porción del intestino delgado se llama úlcera duodenal (Moreira y López, 2004). En pacientes que padecen úlcera duodenal, se observa un aumento de la capacidad secretora de las células parietales, después de la segunda media hora de la ingesta de alimentos, dichos procesos conllevan a un aumento en la carga ácida del estómago y del ritmo de su vaciamiento. Las úlceras duodenales se encuentran generalmente en los tres o cuatro primeros centímetros del duodeno, en el bulbo duodenal. En ocasiones aparecen en la parte superior de la segunda porción del duodeno; entonces en ese caso se les llama úlceras postbulbares (Carretero, 2001; Ferrer *et al.*, 2006).

La úlcera péptica se inicia cuando la mucosa gástrica es penetrada por el ácido y la pepsina, consecutivamente invaden las capas más profundas de la pared gástrica e incluso pueden perforarla por completo. Estas úlceras se clasifican de aguda o crónica, de acuerdo a la cantidad de tejido conjuntivo dañado.

Una úlcera gástrica aguda difiere de la crónica, por que en ella se presenta una *erosión* en la que se afecta sólo a la mucosa y submucosa sin llegar hasta la *muscularis mucosae*. La úlcera crónica pasa por ciclos repetidos de ulceración y cicatrización, acompañada de mejorías clínicas (Carretero, 2001; Ferrer *et al.*, 2006).

2.2.2. Hipersecreción de ácido

Las úlceras, dependiendo de la hipersecreción de ácido producida, se clasifican principalmente en dos grupos: úlceras tipo I y úlceras tipo II. Las úlceras de tipo I, se producen en el estómago, hay poca o ninguna hipersecreción de ácido. Las úlceras tipo

II abarcan tanto úlceras gástricas, antrales, prepilóricas y duodenales; se caracterizan por acidificación debido a la excesiva descarga de gastrina e hipersecreción sostenida de ácido (Bruntom, 1996).

2.3. Etiología y patología

La úlcera péptica en el hombre se desarrolla probablemente a partir de una erosión superficial de tipo inespecífico en una zona localizada de necrosis y alteración del revestimiento del tubo digestivo. Esto deja una zona sin moco en la mucosa gástrica, susceptible a la posterior digestión. La causa frecuente de la ulceración péptica es el desequilibrio entre, factores agresivos y defensas locales (Ferrer *et al.*, 2006; Alvarado *et al.*, 2007).

Las úlceras duodenales se producen cuando la secreción excesiva de ácido y pepsina generada por las células gástricas no es debidamente amortiguada por el revestimiento de la mucosa gástrica, existen cuatro posibles causas: a) secreción de moco con capacidad protectora reducida; b) disminución en la secreción de moco; c) incapacidad de los mecanismos de retroalimentación duodeno-gástricos normales, para limitar la magnitud del vaciamiento gástrico hacia el duodeno; d) incapacidad de los mecanismos de retroalimentación de secretina pancreática, secretina-conductos biliares para producir secreción de jugo pancreático y bilis lo suficientemente alcalinos como para neutralizar el jugo gástrico a su entrada en el duodeno (Lam, 1984; Ferrer *et al.*, 2006; Alvarado *et al.*, 2007).

Las causas de daño en la mucosa son: secreción de ácido, pepsina; factores externos como el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), alcohol, agentes quimioterapéuticos, tabaco, e infección por *Helicobacter pylori*. Todos ellos

causan erosiones gástricas, sangrado y ulceraciones (Tarnawski, 1995; Bruntom, 1996; Abdel-Salam, 2001).

2.3.1. Uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos

Estos medicamentos se emplean con mucha frecuencia para el tratamiento de dolor, inflamación y fiebre. Su eficacia para solucionar estos problemas es muy alta; sin embargo, con relativa frecuencia producen efectos no deseados en las personas que los consumen y que afectan especialmente al estómago y al duodeno, por ello es el desarrollo de úlceras una de las complicaciones más habituales (Beckler, 1999).

Los antiinflamatorios actúan por medio de la inhibición de la síntesis de las prostaglandinas. Esto sirve para explicar el mecanismo ulcerogénico provocado por este tipo de medicamentos. La causa de este efecto tóxico se debe a la supresión de las prostaglandinas endógenas, ya que la reducción en estas lleva a la disminución del moco epitelial, secreción de bicarbonato, proliferación celular epitelial y por último de la resistencia de la mucosa (Ma *et al.*, 1999; Rodríguez, 2006).

Los AINES inducen la síntesis de factor alfa de necrosis tumoral y también de leucotrienos que estimulan la adherencia de neutrófilos por medio de proteínas de adhesión. Las prostaglandinas endógenas, el óxido nítrico, inhibidores de leucotrienos y del factor de necrosis tumoral alfa inhiben la adherencia de los neutrófilos al endotelio de la microvasculatura gástrica; esto es un factor muy importante en la producción de daños a la mucosa, ya que la adherencia de los neutrófilos daña la mucosa, liberando radicales libres de oxígeno, así como proteasas, y obstruyendo las capilares sanguíneos.

Los nuevos antiinflamatorios (rofecoxib, celecoxib) parecen ser igualmente eficaces para tratar el dolor y la inflamación y son menos dañinos para el aparato digestivo, por que producen un menor número de lesiones gástricas (Ma *et al.*, 1999; Rodríguez,

2006). En años recientes se ha suspendido el uso de algunos fármacos selectivos de COX-2 debido a los efectos adversos cardiovasculares asociados.

2.3.2. Consumo de tabaco

Se ha demostrado que cuando un paciente padece úlcera gástrica y es fumador, la tasa de mortalidad se incrementa tanto en hombres como en mujeres, este hecho se atribuye a los efectos del tabaco sobre el tracto gastrointestinal (Ma *et al.*, 1999). Aumenta la producción de ácido gástrico, incrementa el reflujo duodenogástrico, disminuye la producción de prostaglandinas y bicarbonato pancreático-duodenal, aumenta la producción de leucotrienos y la infiltración de neutrófilos en la mucosa gástrica, afecta la actividad de la sintasa de óxido nítrico, disminuye la proliferación de las células epiteliales y la formación de vasos sanguíneos. Funciones importantes para la curación de la úlcera péptica (Ma *et al.*, 1999; Rodríguez, 2006).

2.3.3. Alcohol

El alcohol, provoca úlcera péptica debido a su capacidad de modificar las características del moco gástrico, ya que inhibe la producción de prostaglandinas, interfiere con la reproducción de las células epiteliales y aumenta la secreción de ácido en el estómago (Lanza, 1984; Shorrock *et al.*, 1990).

También incrementa la respuesta inflamatoria y produce una sobre expresión del factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), seguida del aumento de la apoptosis en la mucosa gástrica. Además, de que el aumento de TNF- α , induce a la producción de otras citocinas tales como interleucina-1 y la interleucina-6, que podría iniciar una respuesta inflamatoria sistémica. Esto podría conducir a un aumento en la gravedad de los daños en las úlceras del estómago (Liu y Cho, 2000).

2.3.4. *Helicobacter pylori*

Hoy en día se considera que el agente infeccioso bacteriano, *Helicobacter pylori* es capaz de causar un incremento en la secreción de ácido gástrico, alterar las funciones de la barrera de moco e inducir la formación de metabolitos inflamatorios en la mucosa gástrica. Esta bacteria infecta el estómago en una gran parte de la población mundial sin embargo sólo un 10-20% de las personas infectadas por este microorganismo desarrollarán a lo largo de su vida una úlcera péptica en el estómago o duodeno (Torres, 2003; Moreira y López, 2004).

Investigaciones recientes realizadas en ratones, han mostrado que existe una cepa de *H. pylori* portadora de un gen que la hace extremadamente patógena, y que induce el surgimiento de úlceras en la mucosa gástrica. Esta cepa retrasa la curación de las lesiones, debido a que disminuye la microcirculación en la región ulcerada, que provoca una prolongada inflamación de la zona afectada. Se ha sugerido también, que existe una regulación inapropiada de la respuesta inmune gástrica, frente a la infección de *H. pylori* (Makino *et al.*, 1998; Kontureck *et al.*, 1999; Ernst y Gold, 2000).

2.3.5. Estrés

Existen múltiples observaciones que remarcan la relación entre el estrés y la aparición de la enfermedad ulcerosa, se le considera como un factor determinante para el desarrollo de esta enfermedad (Abdel-Salam, 2001; Jones, 2005).

En algunos casos la úlcera gástrica está asociada a estrés fisiológico, debido a que se incrementa la secreción de ácido clorhídrico y disminuyen el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica; sin embargo, aun no se tiene claro cual es la relación entre los factores emocionales, la secreción de ácido y el flujo sanguíneo visceral (Abdel-Salam, 2001; Jones, 2005).

2.3.6. Otros factores

El riesgo de desarrollar esta enfermedad no es el mismo para todas las personas. De tal modo que individuos mayores de 60 años, con historia previa de enfermedad ulcerosa, que padecen enfermedad grave relacionadas (especialmente del corazón, riñón o hígado), y que utilizan medicamentos anticoagulantes y/o corticoides a dosis altas, presentan un mayor riesgo de tener complicaciones digestivas con estos medicamentos. Los corticosteroides, el café, al igual que el alcohol, provocan úlceras pépticas debido a que inhibe la producción de prostaglandinas, modificando así las características del moco gástrico, aumentan la secreción de ácido en el estómago, e interfirieren con la reproducción de células epiteliales (Lanza, 1984; Shorrock *et al.*, 1988).

2.4. Sintomatología

El síntoma más frecuente y notable es la sensación de malestar con dolor en la zona central y superior del abdomen, que se caracteriza por su cronicidad y periodicidad en relación con la ingesta 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, que se calma al ingerir alimentos y vuelve a aparecer unas horas después (Smith y Thier, 1989).

Además se presentan náuseas, vómitos, anorexia y pérdida de peso. Independientemente de estos síntomas las personas que padecen de úlcera péptica tienen el riesgo de que se complique, pueden presentarse; hemorragia (producida cuando la úlcera es profunda y erosiona un vaso sanguíneo). En ocasiones la úlcera atraviesa completamente la pared intestinal, penetrando en órganos vecinos, creando así una perforación libre en la cavidad peritoneal (Alvarado *et al.*, 2007, Ramakrishnan *et al.*, 2007).

2.5. Mecanismo de defensa de la mucosa gástrica

El estómago mantiene su integridad por diferentes mecanismos, en general estos consisten en: funcionales, humorales y neuronales. La secreción de moco alcalino, la capa de fosfolípidos, microcirculación y motilidad actúan como factores funcionales, los factores humorales los constituyen, las prostaglandinas y el óxido nítrico; en tanto que las neuronas sensibles a la capsaicina, constituyen el factor neuronal (Tsukimi y Okabe, 2001). El déficit de alguno de estos factores puede facilitar el daño de la mucosa del estómago (Bruntom, 1996; Abdel-Salam, 2001).

2.5.1. Factores funcionales

2.5.1.1. Moco gástrico

La primera línea de defensa de la mucosa es la capa estable formada por el gel constituido por el moco y el bicarbonato, que cubren la superficie luminal y así mantienen un microambiente neutro en las células superficiales epiteliales (Tarnawski, 1995).

Este gel está fuertemente adherido a la mucosa intestinal y constituye una barrera física, que mantiene separada la superficie de las células epiteliales de las secreciones del jugo gástrico disuelto en el lumen del estómago (Allen *et al.*, 1993). Además de ser parte de la capa estable, el moco sirve como lubricante, retarda la difusión de hidrogeniones y pepsina, inhibe la activación del pepsinógeno y ejerce una acción antibacteriana.

Un grupo de hormonas gastrointestinales como la gastrina y secretina; la prostaglandina E₂, agentes colinérgicos y óxido nítrico, estimulan la secreción de moco. El bicarbonato es secretado al lumen por células epiteliales superficiales y parcialmente por células parietales (Tarnawski, 1995). Los principales constituyentes del gel mucoso son glicoproteínas, del tipo mucina, junto con otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos,

muchos de ellos derivados de la exfoliación de células epiteliales, bacterias e IgA. El 95% de este gel es agua con algunos electrolitos (Allen *et al.*, 1993).

2.5.1.2. Secreción de bicarbonato

Durante las últimas dos décadas, se han realizado estudios en la mucosa gástrica de diversas especies. Todos ellos han mostrado que la secreción de bicarbonato en el lumen del estómago, es un proceso que depende del metabolismo energético. Esta secreción es estimulada por diversos factores como la presencia de ácido o alimento en el lumen gástrico, y es inhibida por activación simpática (Allen *et al.*, 1993).

Existe una gran variedad de compuestos que pueden estimular o inhibir la secreción de bicarbonato. Dentro de los compuestos que la estimulan se encuentran las prostaglandinas del tipo E₂, agonistas muscarínicos, la hormona polipéptido pancreática, compuestos que contienen aluminio, como el sucralfato, y la administración directa de iones de aluminio al lumen gástrico. Los principales inhibidores de la secreción son los inhibidores de la ciclo-oxigenasa, antagonistas muscarínicos, agonistas α_2 - adrenérgicos y acetazolamida (Allen *et al.*, 1993).

La secreción de bicarbonato, proveniente de la superficie de las células epiteliales de la mucosa gástrica, alcaliniza al gel mucoso y proporciona la primera línea de defensa contra la acción agresiva del ácido clorhídrico luminal. Este proceso de neutralización del ácido luminal, ocurre dentro de la matriz del gel mucoso que está fuertemente adherido a las células epiteliales, y hace posible mantener un gradiente de pH que va desde un valor de pH ácido en el lumen (pH > 2) a uno cercano al neutral en la interfase muco-epitelial (Allen *et al.*, 1993). Cuando la mucosa gástrica es dañada, se produce una difusión pasiva de líquido intersticial, incluyendo bicarbonato, a través de la membrana de la mucosa, alcalinizando la fibrina lo que estimula los procesos de reparación celular (Allen *et al.*, 1993).

2.5.1.3. Flujo sanguíneo en la mucosa gástrica

La microcirculación de la mucosa libera oxígeno, nutrientes y remueve sustancias tóxicas. El endotelio microvascular genera vasodilatadores tales como la prostaciclina y el óxido nítrico (NO), que protegen a la mucosa gástrica contra el deterioro, e inhiben la acción dañina de los vasoconstrictores leucotrieno C₄, tromboxano A₂ y endotelina hacia la mucosa. Cuando la microvasculatura está dañada, las células endoteliales de la periferia a las áreas lesionadas inician la reparación y reconstrucción de la microvasculatura a través de la angiogénesis (Tarnawski, 1995). El adecuado flujo sanguíneo, asegurado por una microcirculación eficiente, juega un rol central en la eliminación de H⁺ de la mucosa, lo que previene la acidosis en los tejidos y mantiene el equilibrio ácido-base. Así, cuando la mucosa es expuesta a una acidez elevada, se puede observar un aumento en el flujo sanguíneo de la mucosa, sin alterar el pH mucoso (Tarnawski, 1995).

2.5.1.4. Motilidad

La contracción de los márgenes de las lesiones, es un requisito indispensable para la cicatrización de la herida y para la prevención de las lesiones provocadas por estrés y las inducidas con ácido acético, así como por los AINEs (Tsukimi y Okabe, 2001; Okabe y Amagase, 2005).

Se ha observado la presencia de miofibroblastos en la base de úlceras inducidas por ácido acético en ratas. En un estudio histológico, se encontró que la longitud de la ruptura de la muscularis mucosae fue significativamente mayor en los grupos tratados con indometacina y prednisolona en comparación con los controles. Tales resultados sugieren que los fármacos podrían aumentar la contracción del tejido conectivo en la base de la úlcera, probablemente por contrarrestar la acción de mediadores químicos o inhibiendo la liberación de esos mediadores. La mayoría de antiinflamatorios inhiben la

síntesis de PG y la actividad de las fosfolipasas. En consecuencia, lo más probable es que la indometacina y prednisolona interfieran con la contracción del área de la úlcera, como resultado de una reducción de PG endógenas (Okabe y Amagase, 2005). Mersereau e Hinchey en 1982 fueron los primeros que reportaron la importancia de la hipermotilidad del estómago en la génesis de las lesiones gástricas en respuesta a los AINEs. Las altas amplitudes de las contracciones y la restricción temporal del flujo sanguíneo de la mucosa provocadas por los AINEs reducen la resistencia de la mucosa gástrica. La hipermotilidad inducida por los AINEs está relacionada con una deficiencia de prostaglandinas causada por la inhibición de la COX-1, lo que sugiere que las prostaglandinas provenientes de la COX-1 participan de manera importante en la reducción de la motilidad gástrica lo que se traduce en una protección para la mucosa gástrica (Tanaka *et al.*, 2001).

2.5.2. Factores humorales

2.5.2.1. Prostaglandinas

La generación permanente de prostaglandinas E₂ (PGE₂) y prostaciclina (PGI₂) es importante para mantener la integridad de la mucosa. Casi todos los mecanismos de defensa de la mucosa son estimulados o facilitados por prostaglandinas exógenas o endógenas (Tarnawski, 1995). Estas son sintetizadas a partir de ácido araquidónico, que es liberado por los fosfolípidos de la membrana celular, es el precursor de un conjunto de sustancias fisiológicamente activas. Las prostaglandinas (PG) y Tromboxanos (Tx) son sintetizados por acción de la enzima ciclooxigenasa (COX), se caracterizan por poseer multitud de funciones antagónicas de sustancias, entre las que caben destacar vasodilatación y vasoconstricción, broncodilatación y broncoconstricción, estimulación e inhibición de la agregación plaquetaria, secreción de sustancias protectoras,

percepción del dolor y activación e inhibición de la inflamación en los tejidos (Peskar, 2001).

En la actualidad se ha descubierto la existencia de diversas isoformas de ciclooxigenasa, con diferencias entre ellas tanto en, distribución en los diferentes tejidos como en su papel fisiológico. La ciclooxigenasa-1 (COX-1) son isoformas constitutivas. Realizan funciones homeostáticas, manteniendo el funcionamiento normal del riñón, la integridad de la mucosa gástrica y la hemostasia. Se localiza en altas concentraciones en las plaquetas, células del endotelio vascular, mucosa gástrica y en el túbulo colector de las nefronas. Dichas concentraciones permanecen constantes, aunque también pueden incrementarse levemente por el estímulo de factores del crecimiento y ciertas hormonas (Peskar, 2001).

La COX-2 se localiza en numerosos tejidos (por ejemplo en cerebro, órganos reproductores, hígado, huesos, aparato digestivo y riñón) a concentraciones prácticamente indetectables y constantes, pero determinados estímulos (interleucina I, factor de necrosis tumoral, lipopolisacáridos, AMPc) son capaces de inducir una elevación importante de su concentración en los tejidos. Por ello, a la COX-2 se la considera una enzima inducible, capaz de incrementar sus niveles frente a estímulos inflamatorios o fisiológicos. Además de desempeñar funciones fisiológicas en los tejidos, la COX-2 es la responsable de la producción de las PG que median en la inflamación, el dolor, el edema y la fiebre (Peskar, 1998; Takeuchi, *et al.*, 2002).

Estas isoformas están codificadas por dos genes diferentes. El gen de la COX-1 se expresa completamente en la mayoría de los tejidos, no se inhibe con los glucocorticoides ni es estimulado por la inflamación u otros factores. Esto conduce a un nivel estable de COX-1, que es responsable de la producción de los niveles basales de PG. El gen de la COX-2, por el contrario, contiene regiones que son de respuesta

temprana ante los estímulos antes mencionados. Este gen se inhibe por agentes antiinflamatorios como los glucocorticoides (Takeuchi, *et al.*, 2002). La prostaglandina E₂ modula la secreción de ácido en el estómago mediante la reducción de las concentraciones de AMPc. En la célula parietal la prostaglandina E₂ interactúa con el receptor EP₃ que se encuentra acoplado a una proteína Gi, que inhibe a la adenilato ciclasa, que produce una disminución de la concentración de AMPc, requerido por la bomba intercambiadora de potasio para la secreción de ácido (Atay *et al.*, 2000). La prostaglandina E₂ también regula la secreción de moco y bicarbonato, debido a que en la célula parietal interactúa con receptores EP (Takahashi *et al.*, 1999).

2.5.2.2. Óxido nítrico

Se ha descrito que el NO tiene diversas funciones en la mucosa gástrica, como regulación del flujo sanguíneo, la secreción de moco y la permeabilidad celular, en consecuencia el NO tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad de la mucosa (Tsukimi y Okabe, 2001).

Los agentes liberadores de NO tales como nitroglicerina y nitroprusiato de sodio inhiben los daños hemorrágicos de la mucosa gástrica inducidas por HCl 50 mM o etanol al 70 %. Por el contrario, los inhibidores de la óxido nítrico sintasa (SON) tales como N^g-nitro-L-arginina (L-NA) y el L-NAME inhiben la acción citoprotectora, por lo que se considera que el NO tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad de la mucosa, ya sea provocando vaso relajación o promoviendo la síntesis de prostaglandinas (Tsukimi y Okabe, 2001).

2.5.3. Factores neuronales

Las neuronas sensibles a capsaicina también contribuyen a la protección de la mucosa. Se ha demostrado que la aplicación local de capsaicina en los nervios sensoriales

gástricos da como resultado una activación neuronal y liberación de neuropéptidos transmisores, en las terminaciones nerviosas, tales como, el péptido relacionado al gen de la calcitonina (PRGC), la sustancia P, calcitonina y neurocinina, localizados dentro o cerca de los grandes vasos submucosos (Tarnawski, 2005; Tsukimi y Okabe, 2001).

Se sabe que la supresión de los nervios sensoriales agravan las lesiones de la mucosa provocadas por agentes necrosantes. La administración local de capsaicina causa una respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica, que es inhibida por la inhabilitación de los nervios sensoriales, lo que sugiere que las neuronas sensoriales regulan la afluencia sanguínea de la mucosa (Tsukimi y Okabe, 2001). La PRGC ejerce una acción protectora de la mucosa, a través de la dilatación de los vasos submucosos debido a la generación de óxido nítrico. Además, macrófagos de la mucosa, leucocitos y células endoteliales secretan una gama de citocinas que afectan el crecimiento celular y su proliferación (Tarnawski, 2005).

2.5.4. Otros mecanismos de defensa de la mucosa gástrica

La mucosa gástrica se renueva continuamente, manteniendo un equilibrio entre la destrucción y la regeneración celular epitelial, gracias a la interacción dinámica de múltiples mecanismos de defensa. Su integridad anatómica es de fundamental importancia para su perfecto funcionamiento, puesto que representa una barrera mecánica entre el medio externo y el interno del estómago. La proliferación celular de la mucosa gástrica ocurre en las glándulas del estómago (Tarnawski, 1995; 2005).

La reepitelización superficial de la mucosa gástrica es rápida, estimándose que la vida media de las células epiteliales superficiales es de 1-2 días. En cambio, este mismo proceso en las glándulas gástricas, requiere de varios meses (Allen *et al.*, 1993). El factor más importante que estimula la proliferación celular en la mucosa gástrica es el péptido factor de crecimiento epidérmico (EGF). Este péptido es secretado por las

glándulas salivales y de Brünner, este estimula la síntesis del ARN y ADN en la mucosa, los cuales favorecen el crecimiento y la diferenciación celular de tal forma que se acelera la reparación de la mucosa gástrica (Allen *et al.*, 1993).

Otro mecanismo importante para la defensa de la mucosa gástrica son los compuestos que contienen grupos sulfhídrico. Se ha demostrado que protegen a la mucosa de las erosiones inducidas por etanol. Por lo que los grupos sulfhídricos proteicos son citoprotectores de la mucosa gástrica mediando la acción de las prostaglandinas. Los grupos sulfhídricos son requeridos para la síntesis de prostanoïdes y para la activación de los receptores de las prostaglandinas, además influyen en la permeabilidad de la membrana y captura de radicales libres (Szabo *et al.*, 1981; Kontureck *et al.*, 1987; Shorrock y Rees, 1988).

2.6. Fármacos empleados para el tratamiento de úlcera gástrica

2.6.1. Clasificación

Los distintos fármacos utilizados en el tratamiento de la úlcera tienen como blanco contrarrestar los factores agresivos o estimular las defensas de la mucosa gástrica tales como moco, bicarbonato, flujo sanguíneo y el NO (Borrelli e Izzo, 2000). Los fármacos utilizados para el tratamiento de la úlcera gástrica se clasifican en: antiácidos, antiseoretos y citoprotectores (Hoogerwerf *et al.*, 2001).

2.6.2. Antiácidos

En esta familia farmacológica se incluye un grupo de compuestos inorgánicos cuya característica común, base de su acción terapéutica, es neutralizar al ácido clorhídrico, sin interferir directamente con los procesos de secreción. Los antiácidos se clasifican en dos grupos: antiácidos absorbibles y no absorbibles (Flórez y Espulgues, 1999).

2.6.2.1. Antiácidos absorbibles

Los antiácidos absorbibles utilizados con mayor frecuencia son el NaHCO_3 y el CaCO_3 , sin embargo, no se recomiendan, debido a que dentro de sus efectos colaterales pueden producir hipernantremia, pérdida de CO_2 , alcalinización de la orina y predispone a litiasis renal fosfática, además, la duración de su efecto es corta y se asocia a molestias difusas por la existencia de gases en el tubo digestivo tales como distensión abdominal y eructos con reflujo de ácido (Hoogerwerf *et al.*, 2001; Flórez y Espulgues, 1999).

2.6.2.2. Antiácidos no absorbibles

Son sales inorgánicas que además de neutralizar parcialmente el ácido clorhídrico contenido en el estómago, inhiben la proteólisis originada por la pepsina (Gallimore *et al.*, 2004). Este tipo de fármacos lo constituyen principalmente sales de aluminio y magnesio, pero cuando se realiza una combinación de ambas sales da por resultado una capacidad de neutralización relativamente rápida y prolongada (Hoogerwerf *et al.*, 2001). Los principales problemas de los antiácidos se relacionan con su tiempo de acción corto y sus efectos adversos como son constipación, diarrea, síndrome de lacto alcalosis, hipercalcemia, nefrolitiasis y bloqueo intestinal para la absorción de fósforo (Bettarello, 1985; Flórez y Espulgues, 1992).

2.6.3. Supresores de la secreción ácida

Dentro de este grupo de fármacos podemos citar a los antagonistas de los receptores para histamina tipo H_2 , inhibidores de la bomba $\text{ATPasa H}^+/\text{K}^+$, antimuscarínicos y antagonistas de la gastrina (Gallimore *et al.*, 2004).

2.6.3.1. Antagonistas de los receptores de histamina tipo H_2

Los fármacos antagonistas de los receptores H₂ son utilizados en el tratamiento de la úlcera gástrica y duodenal. Existen cuatro antagonistas de los receptores H₂ en el mercado: la ranitidina, la cimetidina, la famotidina y la nizatidina. Todos ellos antagonizan de forma competitiva y reversible los receptores histaminérgicos H₂, que favorecen la producción del ácido gástrico debido a la unión con los receptores H₂ sobre la membrana baso lateral de las células parietales (Alvarado *et al.*, 2007). Por ello, estos fármacos inhiben la secreción de ácido estimulada por la ingesta de alimentos, como la inducida por estímulos fisiológicos (Hoogerwerf *et al.*, 2001). La incidencia de efectos adversos al consumir este tipo de fármacos es menor al 3%. Los efectos secundarios más frecuentes incluyen diarrea, dolor de cabeza, somnolencia, y constipación (Hoogerwerf *et al.*, 2001).

2.6.3.2. Antagonistas de receptores muscarínicos

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

2.6.3.3. Antagonistas de la gastrina

Diversas sustancias funcionan como antagonistas de la gastrina, debido a su gran similitud estructural con la colecistocinina, incluyendo derivados del ácido glutarámico

(Proglumida), análogos del triptófano (Benzotript), análogos de las benzodiazepinas (L365, 260). Todos estos compuestos inhiben en mayor o menor medida la interacción de la gastrina con su receptor. Sin embargo, en la actualidad no existe aplicación clínica de ningún antagonista de los receptores para la gastrina, sólo representan una posibilidad teórica, sin que se haya demostrado su utilidad práctica (Flórez y Espulgues, 1999). En un intento por aclarar el papel de la gastrina sobre la curación de la úlcera, se realizaron estudios de los efectos de un análogo de somatostatina (SDZ CO - 611) y antagonistas selectivos de la gastrina/CCK2, como YM022 y S-0509 y los efectos del omeprazol, sobre la curación de la úlcera. Se encontró que la administración simultánea de un SDZ CO-611 con omeprazol suprimía significativamente la hipergastremia en ratas con úlceras gástricas inducidas por ácido acético. La capacidad de omeprazol para curar la úlcera no se modificaron positivamente. Además, se demostró que los efectos de omeprazol, no se alteraron por el tratamiento simultáneo con YM022 o S-0509. Por lo que concluyeron que el omeprazol y los antagonistas de los receptores de gastrina, tales como YM022 y S-0509, podrían contribuir a la curación de la úlcera gástrica a través de sus efectos anti-secretorios (Okabe y Amagase, 2005).

2.6.3.4. Fármacos inhibidores de la bomba de protones

Los inhibidores de la bomba de protones son profármacos, principalmente indicados en el tratamiento de úlceras gástricas y duodenales, así como para el reflujo esofágico y el síndrome Zollinger-Ellison. Este tipo de fármacos son indudablemente los más efectivos supresores de la secreción de ácido, los cuales ejercen su acción mediante este mecanismo encontramos: al omeprazol, el lanzoprasol, el rabeprazol y el pantoprazol (Hoogerwerf *et al.*, 2001).

Estos antagonizan de forma irreversible la ATPasa H^+/K^+ o bomba de protones. Son bases débiles, no ionizadas a pH fisiológico y por tanto capaces de atravesar barreras biológicas. Sin embargo, en medio ácido, como el existente en el canalículo de la célula secretora, se ioniza y queda atrapado. Son profármacos, ya que requieren la conversión de su forma ionizada en un compuesto tetracíclico activo. Se absorben por vía oral y se eliminan por metabolismo hepático. Además de ser agentes eficaces, actúan más rápidamente que los antagonistas H_2 (Alvarado *et al.*, 2007).

Estos agentes entran a la célula parietal mediante el flujo sanguíneo, acumulándose en los conductos secretores, donde son activados debido a un proceso de protonación que resulta en un ácido sulfénico y una sulfenamida. Esta forma reactiva reacciona con el grupo sulfhídrico de la cisteína del dominio extracelular de la H^+/K^+ ATPasa, inactivándola de forma irreversible (Hoogerwerf *et al.*, 2001).

Entre los efectos adversos se incluyen: náusea, dolor abdominal, constipación, flatulencias, diarrea, miopatía, altrargías, dolores de cabeza y erupciones cutáneas. Pero dichos efectos se presentan en raras ocasiones y cuando esto sucede son bien tolerados (Hoogerwerf *et al.*, 2001).

2.6.4. Fármacos citoprotectores

Las prostaglandinas fueron las primeras sustancias en clasificarse como sustancias citoprotectoras, actualmente se incluyen dentro de éste grupo a ciertas sustancias que tienen actividad semejante al de las prostaglandinas o que promueven su biosíntesis. Entre los compuestos citoprotectores se incluyen al sucralfato, las sales de bismuto y a la carbenoxolona (Szabo y Goldberg, 1990).

2.6.4.1. Sucralfato

Es un complejo octosulfato de sucrosa y aluminio que se desdobra en pH ácido, aunque se ha demostrado que tiene efecto farmacológico aun con pH neutro. Es una base de aluminio que en condiciones ácidas puede formar una sustancia viscosa que se une a la superficie de la mucosa, su mecanismo de acción citoprotectora es a través del mejoramiento de la secreción de moco dada por la formación de complejos adherentes con las proteínas en la base de la úlcera y secreción de bicarbonato, induciendo la producción de prostaglandinas y promoviendo la reepitelización. El efecto adverso que con mayor frecuencia se reporta es la constipación, en raros casos se reportan: vértigo, mareos, dolor de cabeza, náuseas y sequedad bucal (Alvarado *et al.*, 2007).

2.6.4.2. Sales de Bismuto

Son tan efectivos como la cimetidina en pacientes con úlcera gástrica, se unen a la base de la úlcera promoviendo la producción de prostaglandinas y mucina, además de poseer un importante efecto bactericida. Estos compuestos no tienen capacidad neutralizante para el ácido clorhídrico sino que inhiben a la pepsina, aumentan la secreción de moco e interactúan con proteínas y forman una barrera contra la difusión del ácido. Los coloides de bismuto también producen desprendimiento de *Helicobacter pylori* del epitelio gástrico, con la consiguiente eliminación de la bacteria. Los efectos adversos más comunes son: heces oscuras o negruzcas; oscurecimiento de la lengua. Incidencia menos frecuente de: Náuseas, vómitos, estreñimiento, diarrea y reacción alérgica leve (Bruntom, 1996; Alvarado *et al.*, 2007).

2.6.4.3. Carbenoxolona

Es un triterpeno pentacíclico derivado de la hidrólisis del ácido glicirrízico, ha sido utilizado en Europa por muchos años como un compuesto antiulcerante con eficacia moderada. Su mecanismo de acción no es totalmente claro pero se cree que puede alterar la composición y cantidad de mucina, incrementar la vida media del epitelio gástrico, inhibir la difusión del ácido, estimular la secreción de moco y bicarbonato e incrementar la producción de prostaglandinas. Desafortunadamente es un análogo de los esteroides así que su uso es limitado debido a su actividad mineralocorticoide con lo cual, en muchos casos se genera retención de Na⁺ y líquidos, hipertensión, hipopotasemia y trastorno de la tolerancia a la glucosa (Takeuchi *et al.*, 1998; Alvarado *et al.*, 2007).

2.6.4.4. Análogos de las prostaglandinas

De acuerdo a que las prostaglandinas mantienen la integridad de la mucosa por la inhibición de la secreción de ácido, estimulación de la secreción de moco y bicarbonato e incrementan y mantienen el flujo sanguíneo, se han desarrollado análogos que se metabolizan lentamente. Estos incluyen al misoprostol y rioprostil análogos de la PGE₁, y arbaprostil, emprostil y trimoprostil derivados de la PGE₂. Estos fármacos están indicados para la prevención de daño a la mucosa causado por AINE's. Las prostaglandinas mantienen la integridad de la mucosa por la inhibición de la secreción de ácido, estimulación de la secreción de moco y bicarbonato e incrementan y mantienen el flujo sanguíneo (O'brien *et al.*, 1986; Atay *et al.*, 2000).

El efecto adverso comúnmente reportado por la administración de misoprostol es la diarrea con o sin dolor abdominal y calambres. El misoprostol está contraindicado en mujeres embarazadas ya que es un potente abortivo, pues incrementa las contracciones uterinas (Alvarado *et al.*, 2007).

2.6.5. Mecidanol

El meciadanol es un inhibidor de la actividad de la histidina descarboxilasa, y tiene una potente acción gastroprotectora contra el daño producido por etanol y aspirina lo que puede deberse a la inhibición de la formación de histamina en la mucosa (Kontureck, 1990).

2.6.6. Sulglicótido

El sulglicótido es un glicopéptido (cadena corta de aminoácidos con moléculas de azúcar adheridas) en forma de sal de sodio. Éste se comporta como agente que cubre la mucosa, su acción citoprotectora parece estar relacionada con el aumento de la expresión de la sintasa del óxido nítrico constitutivo, con la intervención en el mecanismo de apoptosis de las células epiteliales y con la estabilización de la estructura lisosomal en las células de la mucosa (Bruntom, 1996; Alvarado *et al.*, 2007).

2.6.7. Alginato

El alginato es un compuesto capaz de poner una barrera mecánica al reflujo esofágico del contenido gástrico ácido o no ácido. La actividad terapéutica del ácido algínico y de alginatos, deriva en una transformación local de la suspensión de este polímero por el jugo gástrico el cual protege mecánicamente a la mucosa gástrica de lesiones inducidas por el ácido clorhídrico, reduce la acidez del jugo gástrico y evita el reflujo esofágico (De Vincentis *et al.*, 1991).

2.7. Plantas medicinales en el tratamiento de la úlcera gástrica

A pesar de los avances para la obtención de fármacos antiulcerosos, las plantas medicinales siguen siendo una fuente importante para la obtención de estos compuestos, que pueden desarrollarse como una alternativa de los tratamientos existentes (Borrelli e Izzo, 2000; Falcão, 2008). Numerosas plantas son utilizadas frecuentemente a nivel mundial para el tratamiento de la úlcera gástrica, entre las cuales podemos mencionar a: liquorice, Aloe y Capsicum entre otras (Borrelli e Izzo, 2000; Falcão, 2008).

2.7.1. Plantas mexicanas con actividad gastroprotectora

En la medicina tradicional mexicana se tiene registro de 56 plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de la úlcera gástrica, dentro de las cuales las más estudiadas son *Hippocratea excelsa*, *Amphiterygium adstringens* y *Croton reflexifolius*.

2.7.2. *Hippocratea excelsa* (Cancerina)

De la corteza de la raíz de la cancerina ya se aislaron e identificaron a los metabolitos de la actividad gastroprotectora en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol, encontrándose como los metabolitos responsables de la actividad gastroprotectora al β -sitoesterol, la β -D-glucosido de β -sitoesterol, a la (-) epicatequina y a la mezcla de α y β -amirinas (Navarrete *et al.*, 2002).

2.7.3. *Amphiterygium adstringens* (Cuachalalate)

El extracto metanólico de la corteza de *Amphiterygium adstringens* mostró un efecto inhibitorio, dependiente de la dosis sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas wistar, el fraccionamiento de este extracto condujo a una fracción rica en triterpenos como responsables de la actividad gastroprotectora (Navarrete, *et al.*, 1998). Los compuestos activos de esta planta resultaron ser el β -sitoesterol y el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, este último con mayor actividad gastroprotectora (Arrieta *et al.*, 2003).

2.7.4. *Croton reflexifolius* (Huilocuahuitl)

Recientemente se realizó el estudio farmacológico de *Croton reflexifolius* donde se demuestra que el extracto hexánico tuvo mayor actividad y del cual se identificaron compuestos como β -sitoesterol, β -lupeol y ácido poliáltico, siendo los responsables de la actividad antiulcerosa (Reyes *et al.*, 2008)

2.7.5. *Eupatorium aschembornianum* (Axihuitl)

Otra planta mexicana utilizada en el tratamiento de úlcera gástrica es *Eupatorium aschembornianum*, de esta planta se han aislado metabolitos denominados eupatoriocromenos B (**1**) y C (**2**) y el benzofurano **3** (Gómez *et al.*, 1982). En otro estudio se demostró la actividad antimicrobiana y antifúngica de esta planta, aislándose los compuestos **2**, **4**, **5** y **6** (Figura 2) como responsables de estas actividades (Ríos *et al.*, 2003). Axihuitl es utilizado para tratar la úlcera gástrica en la medicina tradicional del estado de Morelos (Reyes *et al.*, 1991), a pesar de su amplio uso, no cuenta con ningún estudio que sustente cual o cuales son los compuestos responsables de la actividad gastroprotectora.

2.8. Metabolitos secundarios aislados de plantas con actividad antiulcerosa

En la medicina tradicional, se han aislado diversos metabolitos con actividad gastroprotectora, dentro de los cuales se puede mencionar algunos como: flavonoides, saponinas, triterpenoides entre otros (Borrelli e Izzo, 2000).

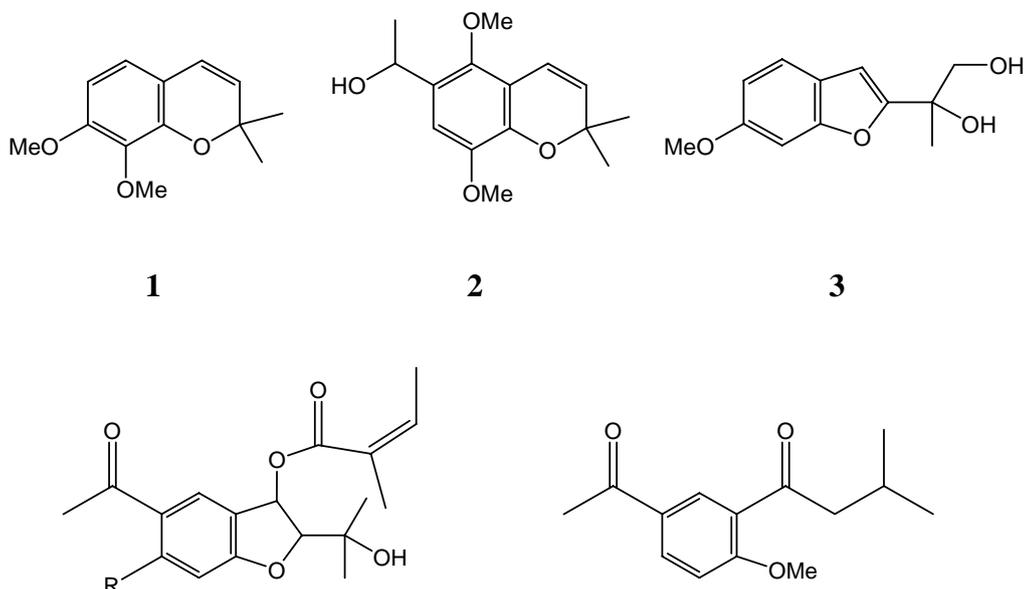




Figura 2. Metabolitos aislados de *Eupatorium aschembornianum*.

2.8.1. Triterpenoides

Algunos de los triterpenoides a los cuales se les ha demostrado actividad gastroprotectora son: β -lupeol, taraxerol, ácido ursólico, estos compuestos reducen las ulceraciones inducidas por estrés en ratas (Gupta *et al.*, 1981; Snykers y Fourie, 1989). El ácido oleanólico es otro triterpenoide que puede ser obtenido de *Prosopis glamulosa*, *Calendula*, *Heliantus*, que presenta actividad gastroprotectora en úlceras inducidas por aspirina, indometacina, reserpina y tetragastrina. Tanto la aspirina como la indometacina disminuyen los niveles de prostaglandinas, por lo que es probable que el ácido oleanólico promueva la producción de prostaglandinas (Gupta *et al.*, 1981; Snykers y Fourie, 1989). Recientemente se realizó el estudio de *Croton reflexifolius*, en el cual se identificaron varios compuestos con actividad antiulcerosa como β -lupeol, β -sitoesterol de los que anteriormente se conocía su actividad gastroprotectora (Reyes *et al.*, 2008).

2.8.2. Flavonoides

Los flavonoides con actividad gastroprotectora que más ampliamente se han estudiado son: la naringina, la quercetina, la silimarina, las antocianócidos y algunos derivados de la soforadina. La (-)epicatequina aislada de la corteza de la raíz de *Hippocratea excelsa* se identificó como metabolito responsable de la actividad gastroprotectora, pero a diferencia de otros flavonoides este metabolito no inhibe la secreción ácida (Navarrete *et al.*, 2002). Entre los mecanismos propuestos para explicar los efectos

gastroprotectores de los flavonoides se encuentran: aumento del 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 atribuírseles el efecto de depuración de radicales libres, los cuales juegan un papel importante dentro de la erosión y la ulceración en el tracto gastrointestinal. Debido a su baja toxicidad y a sus amplias propiedades reportadas se pronostica a los flavonoides como compuestos con elevado potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales asociadas con infección por *Helicobacter pylori*, gastritis, y úlcera duodenal (Borrelli e Izzo, 2000).

2.8.3. Gomas y mucílagos

Las gomas y mucílagos son sustancias quebradizas, amorfas, transparentes o traslúcidas que absorben agua fácilmente formando masas gelatinosas o soluciones coloidales viscosas, tienen la propiedad de cubrir y proteger la mucosa del estómago por lo que son usados en el tratamiento de la úlcera gástrica, un ejemplo de plantas que contienen mucílagos son: *Althaea officinalis*, *Cetraria islandica*, *Malva silvestres*, *Matricaria chamomilla* y distintas especies de Aloe (Borrelli e Izzo, 2000).

2.8.4. Saponinas

Las saponinas están ampliamente distribuidas en plantas, en forma de glicósidos. De acuerdo con su estructura de aglicona o sapogenina, se reconocen dos tipos de saponinas; esteroidales o tipo triterpenoide (Borrelli e Izzo, 2000).

Algunas plantas que tienen actividad gastroprotectora debido al alto contenido de saponinas, son: *Calendula officinalis*, *Calliandra portoticensis*, *Glycyrrhiza glabra*

entre otras. Su actividad gastroprotectora probablemente se debe a la activación de factores protectores de la membrana (Borrelli e Izzo, 2000).

2.8.5. Taninos

Los taninos son primordialmente utilizados en la terapéutica por sus propiedades astringentes, son capaces de alterar la capa exterior de la mucosa, logrando disminución de la permeabilidad y aumentando la resistencia al daño o irritación por agentes químicos o mecánicos. Al aplicar bajas concentraciones de taninos en la mucosa gástrica únicamente la capa exterior es transformada, haciéndola menos permeable, por lo que incrementa de esta forma la protección de la misma contra: bacterias, irritación química e irritación mecánica, en cambio si son aplicadas altas concentraciones de taninos provocan coagulación de las proteínas de capas más profundas de la mucosa, resultando en inflamación, diarrea, y vomito (Borrelli e Izzo, 2000).

2.8.6. Alcaloides

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

De la raíz de *Sophora sobprostrata* se aislaron alcaloides como son la matrina y la oximatrina, los cuales inhiben la secreción gástrica en ratas y la formación de úlceras (Yamasaki, 1983).

2.8.7. Aceites

El aceite volátil de *Hyptis mutabilis* Briq posee un efecto gastroprotector en ratas sobre lesiones inducidas por indometacina administrada por vía subcutánea (Barbosa y Ramos, 1992). La emulsión formada con aceite de la semilla de *Brucea javanica*, inhibe significativamente las lesiones gástricas inducidas por ligación de píloro, aspirina, estrés y úlcera gástrica crónica por ácido acético en ratas (Xue *et al.*, 1996).

III. Planteamiento del problema

A pesar de los avances que se han logrado en el tratamiento de la úlcera péptica, no se cuenta con un tratamiento farmacológico que cubra las expectativas del fármaco ideal, esto es, que alivie el dolor, que cure la úlcera y que retrase el periodo de recurrencia del padecimiento con mínimos efectos adversos, (Hoogerwerf y Pasricha, 2001). 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. En nuestro país, algunas poblaciones han utilizado en el tratamiento de la úlcera a la planta axihuitl, a pesar de su uso no se ha hecho ningún estudio riguroso relacionado con cuáles son los metabolitos activos responsables de la actividad gastroprotectora. El presente trabajo tiene como finalidad efectuar el estudio biodirigido de la actividad gastroprotectora de *Eupatorium aschembornianum* utilizando el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas wistar para determinar cuál (es) son los metabolitos responsables de dicha actividad, así como explorar la participación del NO, prostaglandinas y grupos sulfhídrico en su mecanismo de acción.

IV. Hipótesis

Del genero *Eupatorium* se han aislado saponinas, cromenos, flavonoides y triterpenos, para algunos de este tipo de compuestos ya se ha reportado actividad anti-ulcerosa; por lo que se espera que el(los) compuesto(s) responsable(s) de la actividad gastroprotectora de *Eupatorium aschembornianum* (axihuitl) estén relacionados estructuralmente con los compuestos antes mencionados.

IV. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad gastroprotectora mediante un estudio biodirigido de *Eupatorium aschembornianum* y establecer la participación de las prostaglandinas, el óxido nítrico, grupos sulfhidrilo del o los compuestos que resulten responsables de la acción gastroprotectora, utilizando el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en rata Wistar.

5.2. Objetivos específicos

1. Determinar qué extracto de *Eupatorium aschembornianum* tiene mayor actividad gastroprotectora en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas wistar.
2. Aislar e identificar el o los compuestos responsables de la actividad gastroprotectora de *Eupatorium aschembornianum*.
3. Determinar el grado de participación de las prostaglandinas, óxido nítrico, grupos sulfhidrilo, del o los compuestos que resulten activos.

VI. Materiales y métodos

6.1. Material vegetal

La planta *E. aschembornianum* fue recolectada en el poblado de San Juan Tlacotenco, municipio de Tepoztlán en el Estado de Morelos, México, durante el mes de agosto de 2007. Un espécimen de la colección original se depositó en el herbario de la división de Ciencias Forestales, “Herbario-Hortorio Jorge Espinosa” en la Universidad Autónoma de Chapingo, con el número de registro CHAP1835.

6.2. Preparación de los extractos de las hojas de *E. aschembornianum*

Las hojas de *E. aschembornianum* se secaron a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) bajo la sombra. Se molieron 3 kg de hojas secas. Se colocaron dentro de un recipiente de vidrio y se les adicionó 15 L de hexano, dejando en maceración durante tres días a temperatura ambiente (22 ± 2 °C), al tercer día, se filtró y concentró el extracto utilizando un rotaevaporador, esta operación se repitió dos veces más, obteniendo así el extracto hexánico. El residuo vegetal se trató de la misma forma con diclorometano y luego con metanol, para obtener los extractos de diclorometano y de metanol, respectivamente (Reyes *et al.*, 2008), (Diagrama 1). De la evaporación de los solventes a vacío se obtuvieron 66.8 g de extracto hexánico, 75.3 g de extracto de diclorometano y 150.6 g de extracto metanólico.

6.3. Fraccionamiento cromatográfico

De los extractos obtenidos de las hojas de *E. aschembornianum*, el extracto hexánico mostró la mayor actividad gastroprotectora (Tabla 1). Por lo que 40 g de este extracto se sometieron a una purificación en columna empacada con silica gel (0.063-0.200 mm, 250 g), utilizando incrementos grandes de polaridad, los cuales fueron: hexano (1.7 L,

F1), hexano / EtOAc 9:1 (1.7 L, F2), hexano / EtOAc 7:3 (1.7 L, F3), hexano / EtOAc 1:1 (1.7 L, F4). Se obtuvieron cuatro fracciones de polaridades crecientes (Reyes *et al.*, 2008). Estas fracciones fueron evaluadas con el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol para identificar la fracción con mayor acción gastroprotectora. (Reyes *et al.*, 2008), (Diagrama 2). La fracción F2, resultó la más activa, por lo que fue sometida a cromatografía en columna empacada con 200 g de gel de sílice. La cual fue eluida con hexano e incrementando su polaridad con mezclas sucesivas de hexano / AcOEt obteniendo 50 fracciones de 20 mL cada una. De las fracciones 15-25 (Hexano / AcOEt, 95:5) se obtuvo un sólido blanco (2.30 g, p.f. 148-150 °C) identificado por sus características físicas y espectroscópicas como enecanescina (Figura 3) (Fang *et al.*, 1988).

6.4. Procedimientos generales

El espectro infrarrojo se realizó utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 1310. La espectrofotometría de masas se determinó en un espectrofotómetro de alta resolución JEOL modelo 102 ASX. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN-¹H, operado a 300 MHz) y de carbono 13 (RMN-¹³C, operado a 75.4 MHz) fueron determinados en un espectrofotómetro Bruker DPX-300.

6.5. Datos Espectroscopicos

Enecanescina: IR (CHCl₃): ν_{\max} = 3010, 1640, 1385, 1140 cm⁻¹: alta resolución FAB⁺ MS: m/z = 450 (100) calculado por C₂₈H₃₄O₅: ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.10 (s, *J* = 8.5 Hz, H-4, H-4'), 6.31 (s, H-8, H-8'), 5.46 (d, *J* = 8.5 Hz, H-3, H-3'), 4.59 (q, *J* = 6.4 Hz, H-11, H-11'), 3.66 (s, OCH₃), 1.46 (s, H-13, H-13'), 1.43 (s, H-14, H-14'), 1.31 (d, *J* = 6.4 Hz, H-12, H-12'); ¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 157.6 (C-7, C-7'), 152.8 (C-9, C-9'),

127.3 (C-5, C-5'), 125.0 (C-6, C-6'), 124.0 (C-4, C-4'), 122.2 (C-3, C-3'), 113.8 (C-10, C-10'), 99.1 (C-8, C-8'), 76.3 (C-2, C-2'), 68.5 (C-11, C-11'), 55.3 (OCH₃), 28.3 (C-14, C-14'), 28.0 (C-13, C-13') y 23.2 (C-12, C-12'). Estos datos corresponden con los encontrados en la literatura (Fang *et al.*, 1988).

6.6. Animales

En el presente trabajo se utilizaron ratas Wistar con un peso entre 180-220 g los cuales fueron proporcionados por el bioterio de la Escuela Superior de Medicina del IPN. Los procedimientos de manipulación de animales se llevaron a cabo conforme a la Norma Oficial Mexicana sobre el Cuidado y Manejo de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Los animales fueron colocados en cajas individuales con piso de malla de alambre para evitar la coprofagia y el contacto con el aserrín. Se privaron de alimento 24 h antes de la experimentación permitiéndoles libre acceso al agua. Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando al menos siete animales por grupo (Reyes *et al.*, 2008).

6.7. Fármacos

Los extractos y fracciones fueron suspendidos en Tween 80 al 5 %, administrándose por vía intragástrica. La carbenoxolona (95 % de pureza, Sigma-Aldrich Co.) se utilizó como fármaco gastroprotector de referencia (Wan y Gottfried, 1985), la indometacina, el éster metílico de N^G-nitro-L-arginina (L-NAME, 98 % de pureza), la N-etilmaleimida (NEM, 98 % de pureza) se adquirieron de Sigma Aldrich Corporation. Los fármacos y fracciones fueron preparados minutos antes de realizar los experimentos y se administraron por la vía indicada para cada fármaco. Las ratas control recibieron únicamente el vehículo (Tween 80 al 5 %) en el mismo volumen (0.5 mL/100 g) y por la misma vía de administración que el compuesto o fármaco evaluado (Reyes *et al.*, 2008)

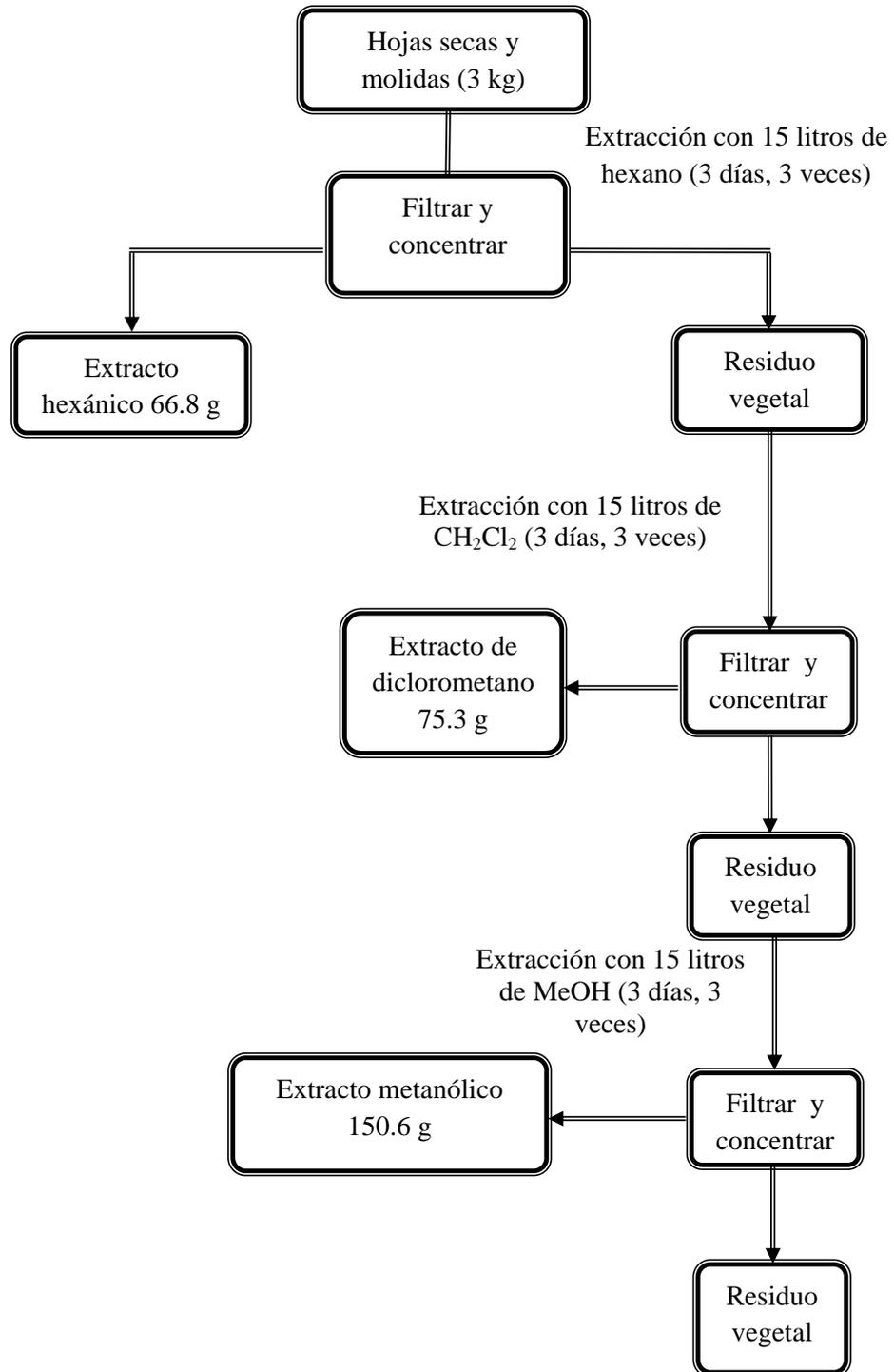


Diagrama 1. Preparación de los Extractos de *E. aschembornianum*.

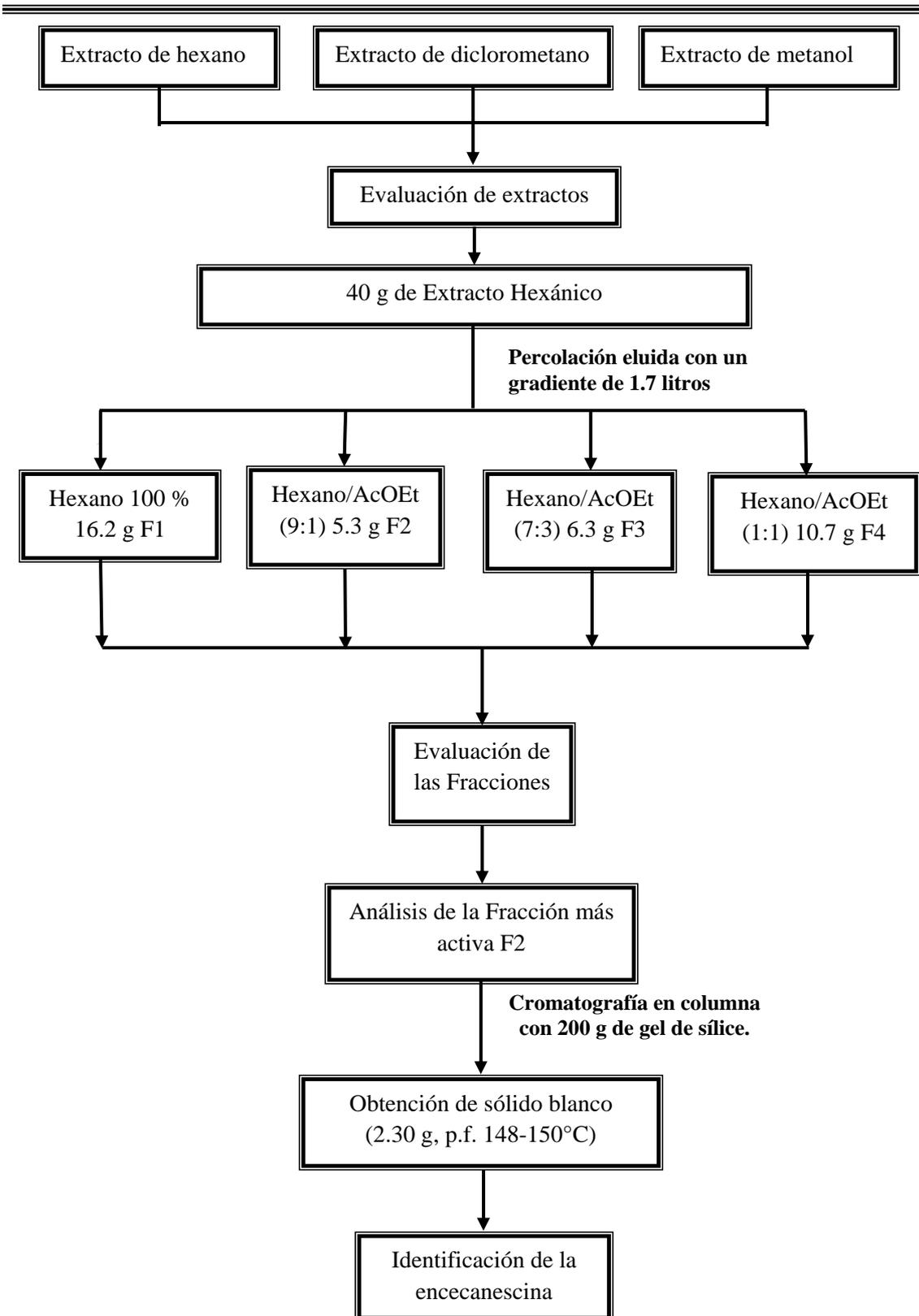


Diagrama 2. Purificación del extracto más activo de *E. aschembornianum* y obtención de enecanescina.

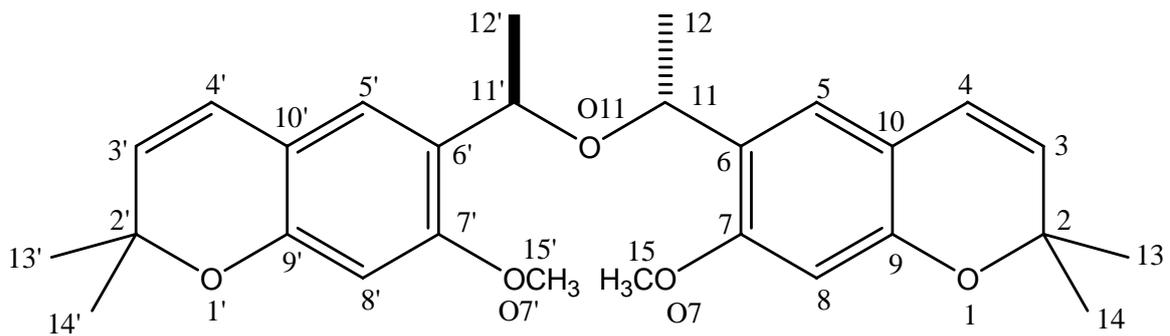


Figura 3. Estructura de la Encecanescina.

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

Para determinar la participación de las prostaglandinas endógenas en la gastroprotección de la encecanescina aislada de *E. aschembornianum* se administró una dosis de 10 mg/kg de indometacina por vía subcutánea (s. c.), disuelta en una solución de cloruro de sodio al 0.9 % conteniendo 5 % de bicarbonato de sodio (Wan y Gottfried, 1985; Reyes *et al.*, 2008), 75 minutos después se administró por vía oral la encecanescina (100 mg/kg) y la carbenoxolona (100 mg/kg) al grupo correspondiente, suspendidos en agua con trazas de Tween 80. Treinta minutos más tarde se administró etanol absoluto (1 mL/rata, v.o.), 2 horas después los animales se sacrificaron y se determinó el índice de úlcera (Reyes *et al.*, 2008). En este experimento se incluyeron dos grupos control. Al el primer grupo (control de vehículos) ingirió únicamente los vehículos más etanol y a el segundo grupo (control de Indometacina) se le administraron indometacina más etanol (Diagrama 4).

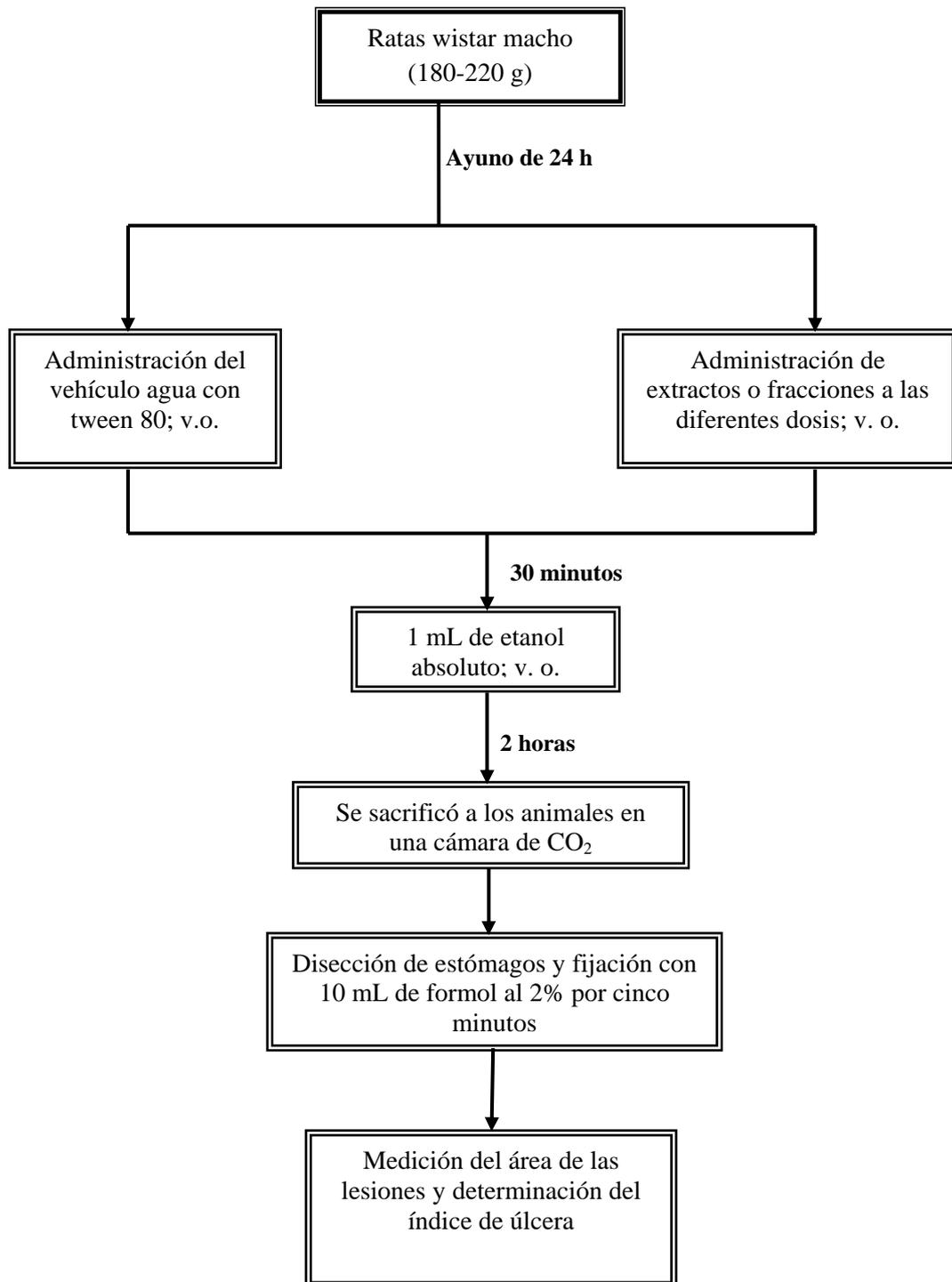


Diagrama 3. Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos o fracciones de *E. aschembornianum*.

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

Para determinar la participación del óxido nítrico endógeno en la gastroprotección de la encecanescina, se administró L-NAME (70 mg/kg, disuelto en solución salina 0.9%) intraperitonealmente (i.p.), 30 minutos después se administraron por vía oral la encecanescina (100 mg/kg) y la carbenoxolona (100 mg/kg), al grupo correspondiente (Reyes *et al.*, 2008). El etanol absoluto (1 mL) se administró después de 30 minutos y 2 horas más se realizó la disección de los estómagos y se fijaron las lesiones con formaldehído, posteriormente se determinó el índice de úlcera (Reyes *et al.*, 2008). En este experimento se incluyeron dos grupos control. El primer grupo control tratado con los vehículos y etanol, un segundo grupo control de L-NAME tratado con L-NAME y etanol (Diagrama 5).

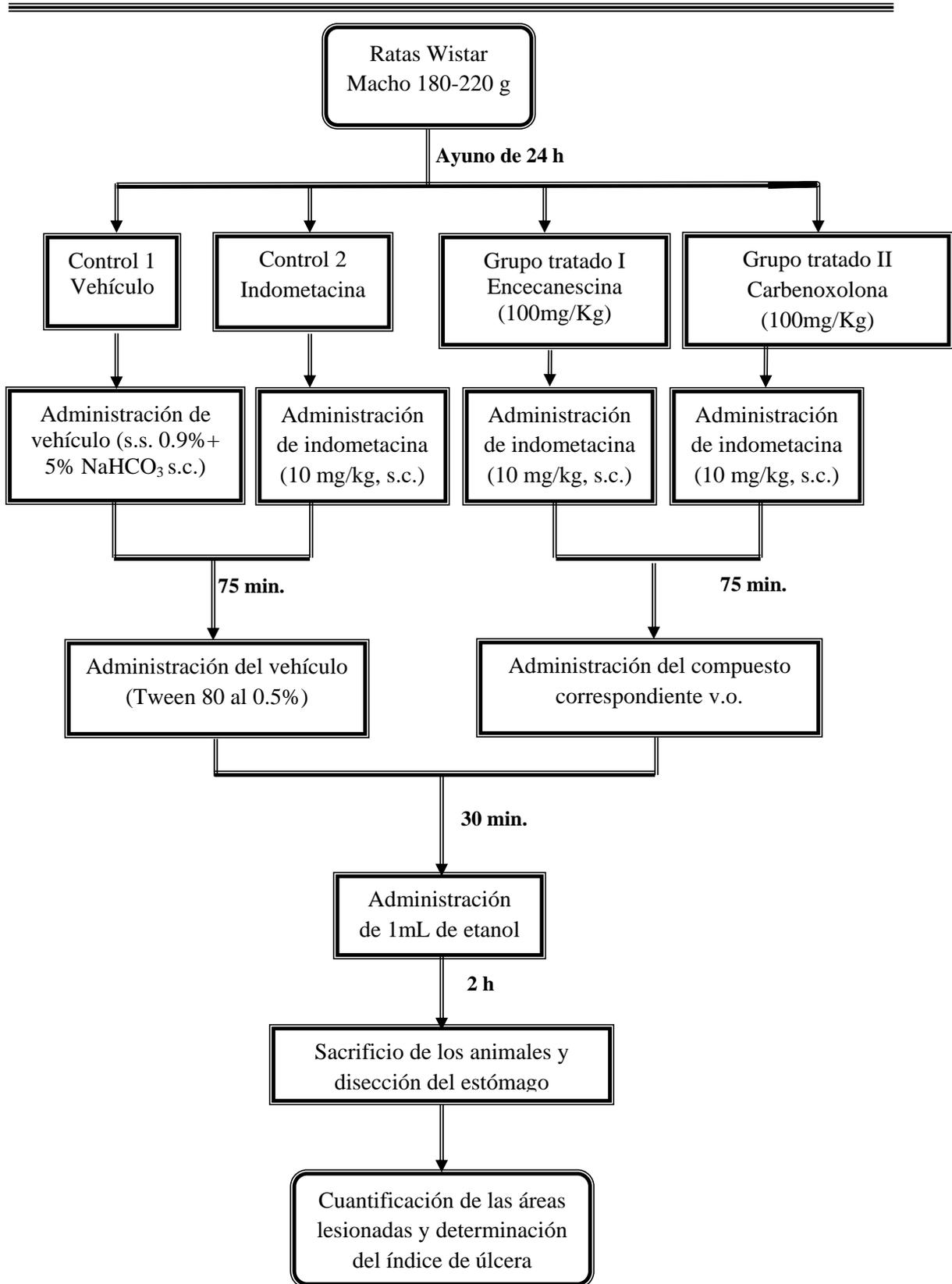


Diagrama 4. Evaluación de la participación de las prostaglandinas en la gastroprotección de la encecanescina aislada de *E. aschembornianum* en ratas tratadas con indometacina.

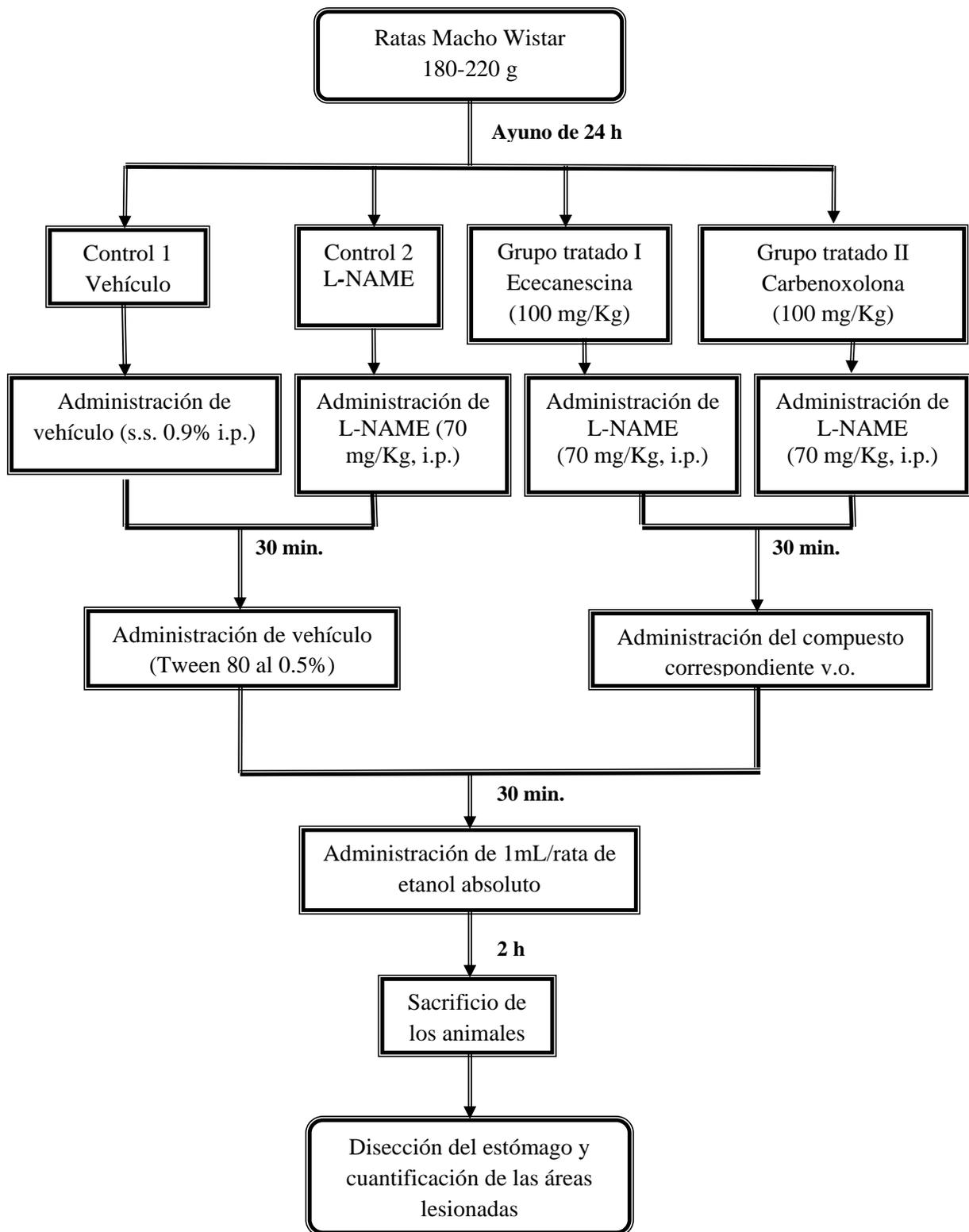


Diagrama 5. Evaluación del efecto de L-NAME sobre la actividad gastroprotectora de la enecanescina aislada de *E. aschembornianum* implicación del óxido NO endógeno.

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

Para investigar la participación de los grupos sulfhídricos en la gastroprotección de la encecanescina aislada de *E. aschembornianum* se administró NEM (10 mg/kg disuelta en solución salina al 0.9 % s. c.) 30 minutos antes de la administración oral de la encecanescina o de la carbenoxolona dependiendo del grupo correspondiente (Reyes *et al.*, 2008). Posteriormente pasados 30 minutos, se administró 1 mL de etanol absoluto a cada rata. Se dejó reposar 2 horas y después se sacrificaron las ratas continuando con el procedimiento hasta la obtención del índice úlcera. En este experimento se incluyeron dos grupos control. Un grupo control de vehículos tratado con los vehículos, más etanol y un segundo grupo control de NEM se trató con NEM más etanol (Matsuda *et al.*, 1999; Reyes *et al.*, 2008), (Diagrama 6).

6.12. Estadística

Los resultados se presentarán como la media \pm E.E.M. de siete a diez ratas por grupo. Para determinar las diferencias significativas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis (análisis de varianza de una vía para datos no paramétricos) seguida por la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de P fue menor que 0.05 (Matsuda *et al.*, 1999; Reyes *et al.*, 2008).

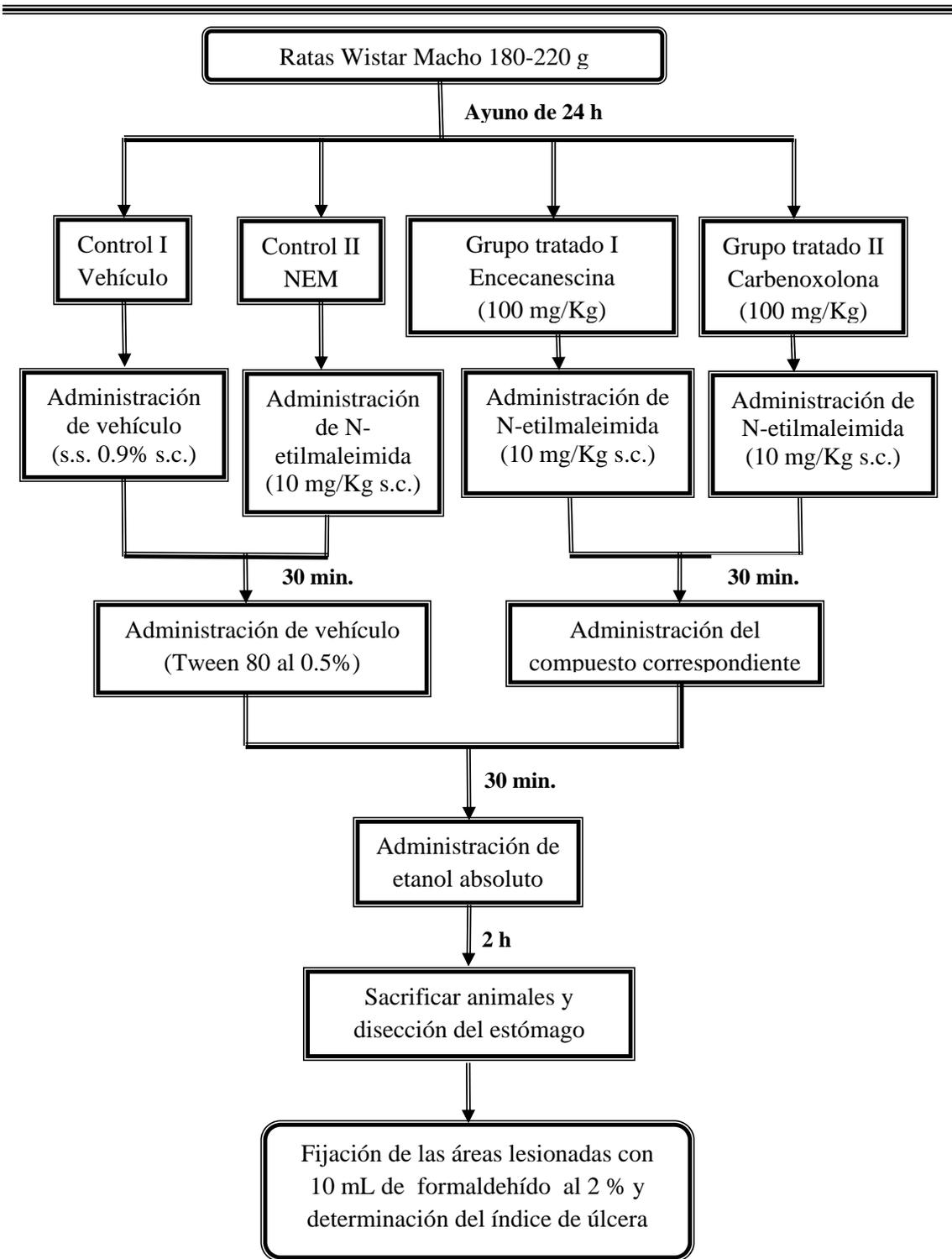


Diagrama 6. Evaluación de la participación de los grupos sulfhídrico en la actividad gastroprotectora de la encecianescina aislada de *E. aschembornianum* en ratas tratadas con NEM.

VII. RESULTADOS

7.1. Efectos gastroprotectores

Los efectos gastroprotectores de los diferentes extractos de *E. aschembornianum* se presentan en la tabla 1. Como se puede observar el extracto hexánico fue más activo que los extractos de diclorometano y metanol. Produciendo un efecto gastroprotector dosis dependiente, el máximo efecto se obtuvo con la dosis de 100 mg/kg ($85.65 \pm 4.76\%$ de gastroprotección). De las cuatro fracciones (F1 a F4) obtenidas a partir de la percolación del extracto hexánico, la fracción F2 resultó ser la más activa mostrando un efecto de $83.19 \pm 5.63\%$ de gastroprotección a la dosis de 100 mg/kg, (tabla 2).

De la purificación realizada a F2 por cromatografía en columna se obtuvieron 50 fracciones de 20 mL cada una. De la fracción 15 a 25 se aisló un compuesto identificado como encecanescina, con punto de fusión de 148-150° C, la cual presentó un efecto gastroprotector dosis dependiente, el efecto máximo de gastroprotección, ($68.62 \pm 7.81\%$) se alcanzó con la dosis de 100 mg/kg de encecanescina, (Figura 4). Además de la encecanescina también se aislaron de la fracción F2 β -sitosterol y estigmaesterol. Estos compuestos no fueron considerados en este trabajo debido a la escasa cantidad obtenida y al hecho de que sus efectos gastroprotectores ya se han demostrado (Rios *et al.*, 2003; Sánchez-Mendoza *et al.*, 2008).

Con respecto a la carbenoxolona que fue el fármaco de referencia, el efecto gastroprotector máximo obtenido fue de $66.20 \pm 8.71\%$ con la dosis de 100 mg/Kg, adicionalmente los resultados para este fármaco mostraron una inhibición de las lesiones gástricas inducidas por etanol dosis dependiente (Figura 5), al comparar los efectos máximos de gastroprotección de la encecanescina y carbenoxolona no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los dos compuestos.

Tabla 1. Efecto gastroprotector de los extractos de *Eupatorium aschembornianum* sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas wistar.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	GP (%)
Extracto de Hexano	10	7	39.84 ± 9.36*
	30	7	75.81 ± 8.54*
	100	7	85.65 ± 4.76*
Extracto de diclorometano	10	7	37.92 ± 8.09*
	30	7	37.40 ± 8.46*
	100	7	49.00 ± 9.02*
Extracto de Metanol	10	7	25.84 ± 11.27
	30	7	21.62 ± 9.96*
	100	7	20.24 ± 2.82*

*P <0.05 versus grupo control. El índice de úlcera del grupo control para esta evaluación fue de 72.88 ± 5.85

GP, Gastroprotección.

Tabla 2. Efecto gastroprotector de las fracciones del extracto hexánico en las lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas wistar.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	GP (%)
F1	100	8	66.75 ± 8.55*
F2	100	8	83.19 ± 5.63 *
F3	100	8	42.72 ± 11.09*
F4	100	8	77.24 ± 3.06*

* P <0.05 versus grupo control. El índice de úlcera del grupo control para esta evaluación fue de 72.88 ± 5.85.

GP, Gastroprotección.

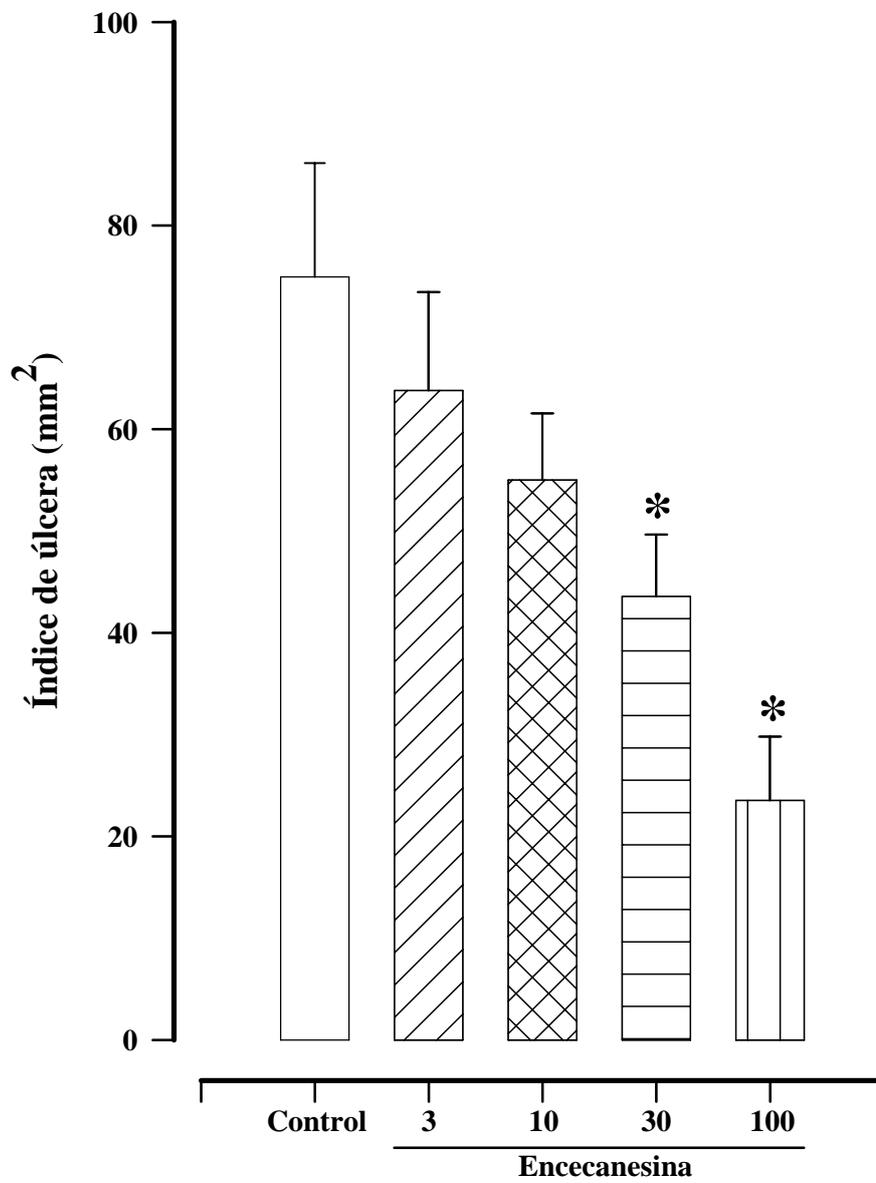


Figura 4. Efecto de diferentes dosis de enecanescina (3-100 mg/kg) en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto en ratas. Cada barra representa el promedio \pm EEM (n = 7-10 ratas). *p < 0.05, comparado con su respectivo control.

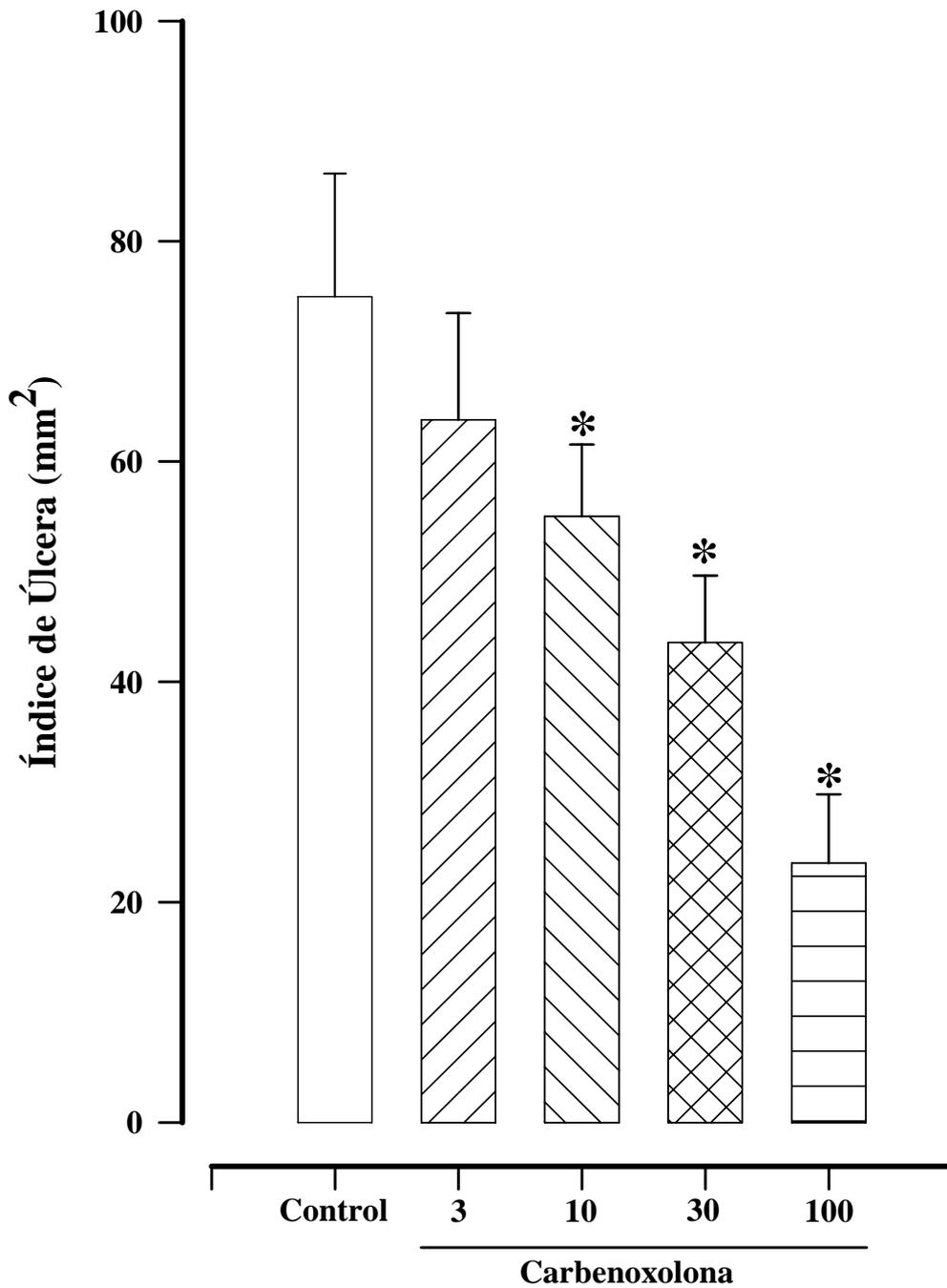


Figura 5. Efecto de diferentes dosis de carbenoxolona (3-100 mg/kg) en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto en ratas wistar. Cada barra representa el promedio \pm EEM (n = 7-10). * $p < 0.05$, comparado con su respectivo control.

7.2. Efecto de la indometacina, L-NAME y NEM sobre la actividad gastroprotectora de la encecanescina

El índice de úlcera en las ratas tratadas con 70 mg/kg de L-NAME (104.16 ± 12.40 mm²; figura 6), 10 mg/kg de indometacina ($85,15 \pm 12,89$ mm², figura 7) o 10 mg/kg de NEM (90.85 ± 4.42 mm², Figura 8) no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$), en comparación con sus respectivos grupos controles tratados solamente con solución salina (87.48 ± 6.83 mm², 83.97 ± 11.56 mm² y 87.8056 ± 8.64 mm² respectivamente). Previamente se ha reportado que las dosis utilizadas de estos compuestos son lo suficientemente elevadas como para bloquear la síntesis de prostaglandinas, la sintasa de óxido nítrico y los grupos sulfhídricos endógenos, sin embargo, no producen o agravan las úlceras presentes con anterioridad (Reyes *et al.*, 2008). Por otro lado el pretratamiento con L-NAME (70 mg/kg, s.c.), disminuye el efecto gastroprotector tanto de encecanescina (100 mg/kg) como de carbenoxolona (100 mg/kg) (Figura 6). El índice de úlcera obtenido en las ratas tratadas con encecanescina (96.61 ± 10.07 mm²) o carbenoxolona (78.41 ± 9.80 mm²) no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) al ser comparados con el grupo control de L-NAME (104.16 ± 12.40 mm²).

La Encecanescina (100 mg/kg) no produce una inhibición de las lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con indometacina (10 mg/kg). El máximo índice de úlcera obtenido por la encecanescina en este caso fue de 71.56 ± 7.33 mm², lo que indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) cuando se compara con el grupo control pretratado con indometacina para el cual se registró un índice de úlcera de 85.15 ± 12.89 mm². Por otro lado, el valor del índice de úlcera obtenido con 100 mg/kg de carbenoxolona fue de 62.23 ± 7.29 mm² este valor tampoco es significativamente diferente ($P < 0.05$) con respecto al grupo control (Figura 7).

La administración oral de enecanescina en ratas pretratadas con NEM (10 mg/kg) no inhibió las lesiones gástricas inducidas por etanol. En este caso, el índice de úlcera obtenido tras la administración de enecanescina fue de $87.68 \pm 11.66 \text{ mm}^2$, valor que no es estadísticamente diferente ($P < 0.05$) cuando se compara con el grupo control pretratado con NEM (Figura 8). De igual manera la carbenoxolona ($70.86 \pm 8.94 \text{ mm}^2$) resultó no ser estadísticamente diferente con respecto al grupo control de NEM (Figura 8).

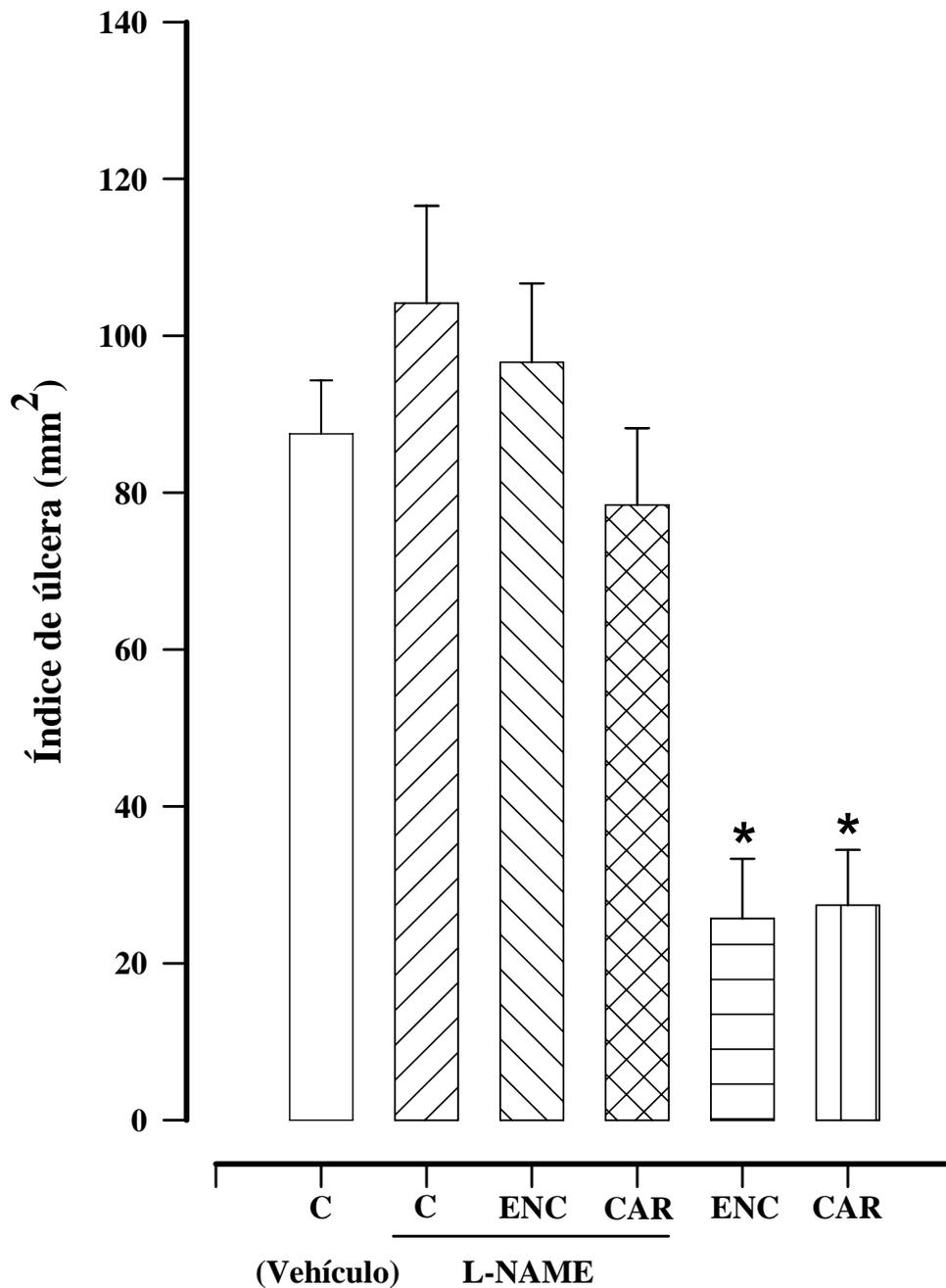


Figura 6. Efecto de la enecanescina (ENC) a 100 mg/kg y carbenoxolona (CAR) a 100 mg/kg en lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto en ratas pretratadas con L-NAME (70 mg/kg). Cada barra representa el promedio \pm EEM (n = 7-10 ratas). *p < 0.05, comparado con su respectivo control.

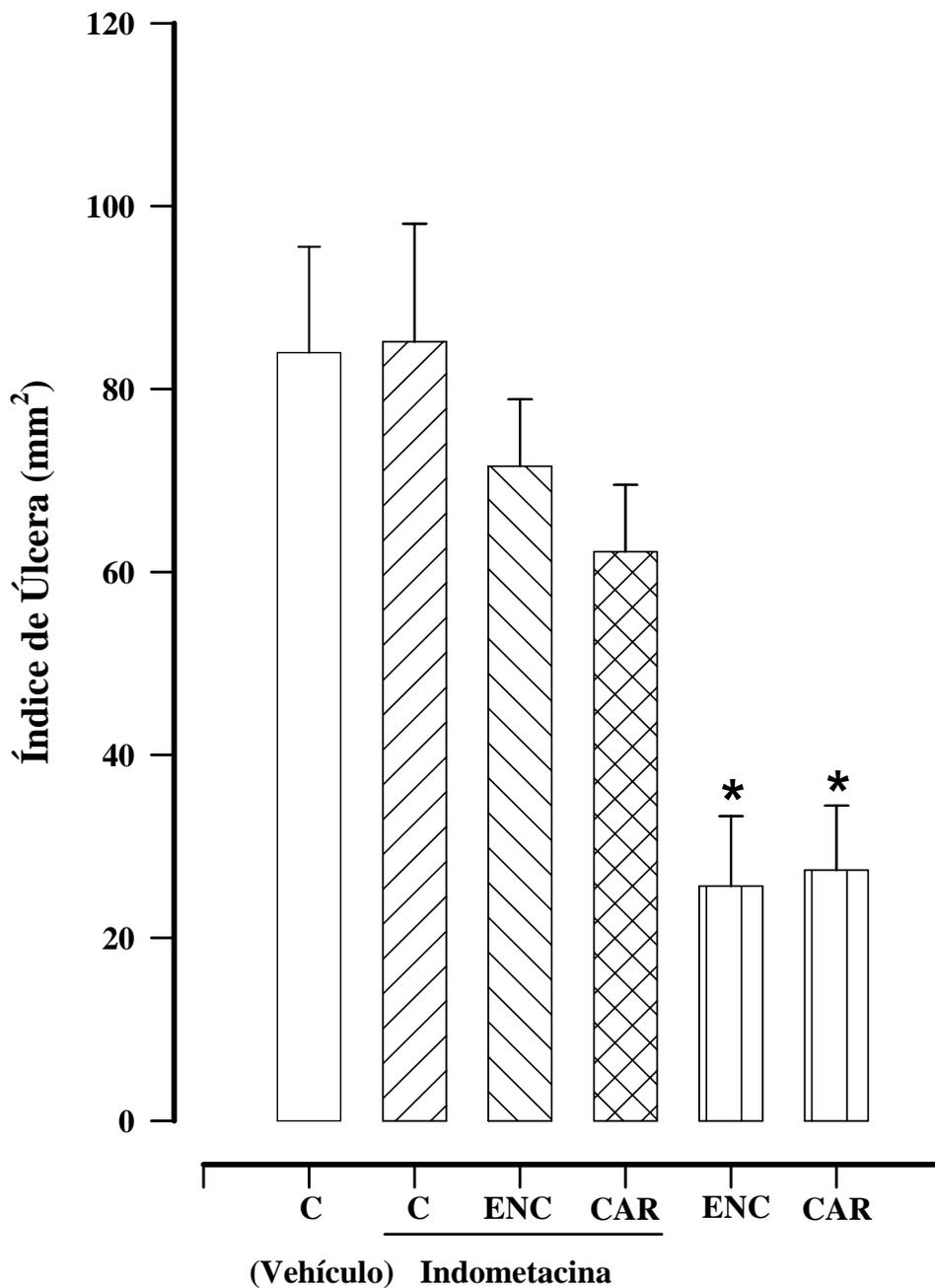


Figura 7. Efecto de la enecanescina (ENC) a 100 mg/kg y carboxolona (CAR) a 100 mg/kg en lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto en ratas pretratadas con indometacina (10 mg/kg). Cada barra representa el promedio \pm EEM (n = 7-10 ratas). *p < 0.05, comparado con su respectivo control.

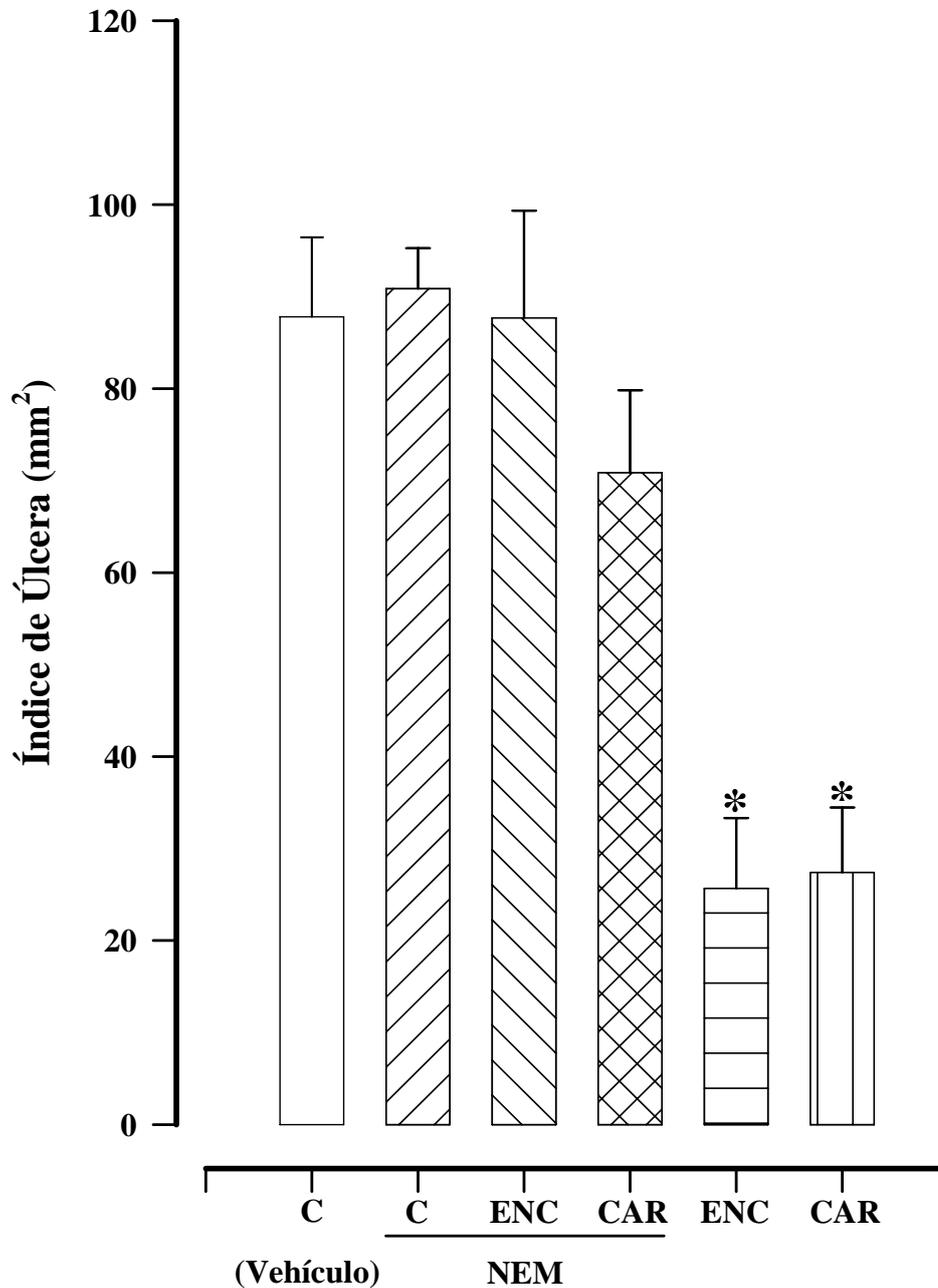


Figura 8. Efecto de la encecanscina (ENC) a 100 mg/kg y carbenoxolona (CAR) a 100 mg/kg en lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto en ratas pretratadas con NEM (10 mg/kg). Cada barra representa el promedio \pm EEM (n = 7-10 ratas). *p < 0.05, comparado con su respectivo control.

VII. Discusión

El presente estudio proporciona evidencia científica para el uso de *Eupatorium aschembornianum* en la práctica popular del tratamiento de úlceras gástricas (Estrada 1985). Se demostró que los extractos obtenidos de las hojas de esta planta presentan actividad gastroprotectora en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto en ratas wistar. El extracto hexánico presentó mayor actividad biológica, alcanzándose el máximo efecto con la dosis de 100 mg/kg ($85.65 \pm 4.76\%$ de gastroprotección).

El fraccionamiento biodirigido del extracto hexánico mostró que la enecanescina aislada de F2 fue uno de los principales componentes activos, la F2 tuvo un máximo efecto de gastroprotección de $83.19 \pm 5.63 \%$ con la dosis de 100 mg/kg. Sorprendentemente el efecto máximo de enecanescina, como compuesto puro, fue más bajo que el producido por F2 ($68.62 \pm 7.81 \%$), lo que se debe probablemente a que en F2 también se aislaron cantidades pequeñas de dos compuestos con actividad gastroprotectora conocida, β -sitoesterol y estigmaesterol, (Sánchez *et al.*, 2008). La enecanescina aislada de F2 es un cromeno; es bien conocido que el género *Eupatorium* contiene este tipo de compuestos (Gómez *et al.*, 1982), a pesar de que la enecanescina se aisló desde hace varios años (Fang *et al.*, 1988), en este estudio por primera vez se demostró actividad gastroprotectora para este compuesto.

8.1. Participación del óxido nítrico en el efecto gastroprotector de la enecanescina

En un intento por proporcionar información acerca del mecanismo de acción gastroprotector de la enecanescina, se evaluó la participación del NO en ratas pretratadas con L-NAME (un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico). Es bien conocido que el NO está involucrado en la modulación de la integridad de la mucosa gástrica y es

importante en la regulación de la secreción ácida y alcalina, así como en la modulación del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica (Calatayud *et al.*, 2001). Los resultados de este estudio muestran que, en presencia de L-NAME el efecto gastroprotector de la encecanescina fue inhibida ($96.61 \pm 10.07 \text{ mm}^2$), así como el efecto protector de la carbenoxolona (Figura 5). Por lo que, estos resultados sugieren que el óxido nítrico participa tanto en la gastroprotección de encecanescina como de la carbenoxolona.

8.2. Participación de las prostaglandinas en el efecto gastroprotector de la encecanescina

Las Prostaglandinas, especialmente la PGE_2 y PGI_2 , son responsables de la producción y el mantenimiento de la integridad celular de la mucosa gástrica (Rujjanawate, *et al.*, 2005) también están implicadas en la producción del moco gástrico. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las prostaglandinas participan en el mecanismo de gastroprotección de la encecanescina ya que el efecto de este compuesto fue modificado por el pretratamiento con indometacina, un inhibidor de la ciclooxigenasa ($71.56 \pm 7.33 \text{ mm}^2$) (Wan y Gottfried 1985). La acción gastroprotectora provocada por la administración de carbenoxolona también fue inhibida por el pretratamiento con indometacina ($62.23 \pm 7.29 \text{ mm}^2$). Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura (Reyes *et al.*, 2008).

8.3. Participación de los grupos sulfhídrido en el efecto gastroprotector de la encecanescina

Adicionalmente se estudió el papel de los grupos sulfhídrido en el mecanismo de acción de la encecanescina. Se ha demostrado que el desarrollo de lesiones gástricas inducidas por etanol, se acompaña de una disminución de los grupos sulfhídrido en la mucosa gástrica. Estos compuestos se neutralizan cuando se unen a los radicales libres que se

producen tras la lesión tisular por agentes nocivos. Además, los grupos sulfhídrido se unen a las subunidades de moco por puentes disulfuro con la consecuente reducción de los radicales libres, que finalmente son eliminados cuando el moco se vuelve soluble en agua (Ávila *et al.*, 1996; Maity *et al.*, 1998). En el presente estudio los animales fueron pretratados con NEM, un bloqueador de grupos sulfhídrido (Figura 7), con la finalidad de investigar la posible implicación de estos compuestos en el efecto gastroprotector de la encecanescina. Los resultados indican que el pretratamiento con NEM inhibió el efecto gatroprotector tanto de la encecanescina ($87.68 \pm 11.66 \text{ mm}^2$) como de la carbenoxolona ($70.86 \pm 8.94 \text{ mm}^2$). Esto demuestra que los grupos sulfhídrido endógenos participan en el mecanismo de acción gastroprotector del cromeno y del compuesto de referencia.

IX. Conclusiones

1. Los resultados de este estudio proporcionan evidencia científica acerca de la eficacia de *Eupatorium aschembornianum* en el tratamiento de la úlcera gástrica. Ya que se demostró que esta planta posee actividad gastroprotectora.
2. La enecanescina aislada del extracto hexánico, fue identificado como uno de los principales metabolitos responsables de la actividad gastroprotectora.
3. Con respecto al mecanismo de acción gastroprotector de la enecanescina se demostró que el óxido nítrico, prostaglandinas y grupos sulfhídrido endógenos participan en su mecanismo de acción.

X. Perspectivas

1. El efecto gastroprotector de la encecanscina debe ser estudiado en el modelo de úlcera gástrica inducida con ácido acético.
2. Cuantificar los niveles de NO, prostaglandinas, y grupos sulfhídrico, para determinar el grado de participación en el mecanismo de acción de cada uno de estos factores.
3. En estudios posteriores podrían ser evaluadas otras vías del mecanismo de acción, como la participación de las neuronas sensibles a capsaicina.

XI. Bibliografía

- Abdel-Salam, O.E.M., Czimmer, J., Szolcsanyi, J., Mózsik, G., (2001). Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *J. physiol. Paris* 95:105-127.
- Abdel-Salam, O.E.M., Decrecen, A., Szolcsanyi, J., (1999). Capsaicin-sensitive afferent sensory nerves in modulating gastric mucosal defense against noxious agents. *J. physiol. Paris* 288:1-19.
- Allen, A., Flemstrom, G., Garner, A. y Kivilaakso, E., (1993). Gastroduodenal mucosal protection. *Am. J. Physiol.* 73:823-857.
- Alvarado, J., Hani, A., Rodríguez, A., Archiva, P., Beltran, O., (2007) Guías de Práctica Clínica Basadas en la Evidencia, Enfermedad Ácido Péptica, Asociación Colombiana de Facultades de Medicina- ASCOFAME. 15-66.
- Arrieta, J., Benítez, J., Flores, E., Castillo, C. y Navarrete, A., (2003). Purification of gastroprotective triterpenoids from the steam bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulphhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med.* 69: 905-909.
- Atay, S., Tarnawski, A. and 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., Herrerías, J., (1996). Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. *Inflam. Res.* 45: 83-88.
- Barbosa, P. and Ramos, C., (1992). Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq. in rats. *Phytother. Res.* 6:114-115.

- Bays, D., and Finch, H., (1990). Inhibitors of gastric acid secretion. *Natural Products Reports*. 7: 409-445.
- Beckler, U., (1999). Gastritis and peptic ulcer disease in childhood. *Eur. J. Pediatr.* 158: 541-546.
- Bettarello, A., (1985). Antiulcer the therapy past to present. *Dig. Dis. Sci.* 30 (suppl. 11):365-425.
- 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 ther.* 9th ed. Ed. McGraw-Hill. USA. 901-917.
- Calatayud, S., Borrachina, M., Espulgues, J., (2001). Nitric oxide: relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa. *Microsc. Res Tech.* 53, 325-335
- Carretero, M., (2001) Citoprotección Gástrica. Avances Farmacologicos. Actualidad Científica. *OFFARM.* 121-125.
- De Vincentis, A., Bartosek, I., Vargiu, G., (1991). Alginato in drugs in gastroenterology, ed. By P. C. Braga, P., Guslandi, M. and Tittobello, A. Ed. Raven Press, New Cork. 256-260.
- Ernst P.B., Gold B.D., (2000) The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Ann. Rev. Microb.* 54, 615-640.
- Estrada, E., (1985). Jardín Botánico de Plantas Medicinales Maximino Martínez. Universidad Autónoma Chapingo, México, p. 12.
- Falcão H, Mariath I, Diniz, M, Batista L, Barbosa-filho J., (2008). Plants of the American continent with antiulcer activity. *Phytomed.* 15:132-146.

- Fang, N., Yu, S.; Mabry, T., (1988). Chromenes from *Ageratina arsenii* and Revised Structures of two Epimeric Chromene Dimers. *Phytochem.* 27, 1902-1905.
- Ferrer I., Pérez J., Herrerías J., (2006). Guía de Seguimiento Farmacoterapéutico Sobre Úlcera Péptica. 5-56.
- Flórez, J. y Espulgues, V., (1999). Farmacología de la secreción ácida gástrica y de la ulceración mucosa. Flórez, J. Armijo y A. Mediavilla. Farmacología humana 3^a ed. Ed. Masson S. A. 756-784.
- Flórez J. y Espulgues, V., (1992). Farmacología de la secreción del Aparato Digestivo. Flórez, J. Farmacología Humana 2^a Ed. SALVAT Medicina. Barcelona. 679-692.
- Gallimore, D. y Jordan, S., (2004). Prescription drugs: uses and effects. *Nurs. Stand.* 19:14-17.
- Gómez, F.; Quijano, L.; Calderón, J. S.; Perales, A.; Ríos, T., (1982). 2, 2-Dimethylchromenes from *Eupatorium aschembornianum*. *Phytochem.* 21, 2095-2097.
- Gupta, M., Nath, R., Gupta, G. and Bhargava, K., (1981). *Ind. J. Res.* 73:649-652.
- Hoogerwef, W. A. and Pasricha, P.J., (2001). Agents used for control of gastric and treatment of peptic ulcers and gastro esophageal reflux disease. In J.G. Hardman L.L. Limbird y A.G. Gilman (eds). Goodman and Gilman. *pharmacological basis thera* 10th ed. McGraw-Hill. USA. 1005-1020.
- Jones, M., (2005). The role of psychosocial factors in peptic ulcer disease: Beyond *Helicobacter pylori* and NSAIDs. *J. Psychosom. Res.* 60 (2006): 407-412.
- Kontureck, S., Brzozowski, T., Piasttucki, I., Radecki, T., Dupuy, D. and Szabo, S., (1987). Gastric mucosal protection by agents altering gastric mucosal sulfhydryls. *Dig.* 37:65-71.

- Kontureck, S.J., (1990). Mechanism of gastroprotection growth factor in gastroprotection and ulcer healing. *Scand. J. Gastroenterol.* 23:129-133.
- Kontureck, P.C., Brzozowki T., Kontureck, S.J., Stachura J., Karczewska, E., Pajdo R., Ghiara P., Hahn E.G., (1999) Mouse model of *Helicobacter pylori* infection: studies of gastric function ulcer healing. *Aliment Pharmacol. Ther.* 13, 333-346.
- Lam, S., (1984). Patogénesis and pathophysiology of duodenal ulcer. *Clin. Gastroenterol.* 13:24-49.
- Lanza, F. (1984). Endoscopio studies of gastric and duodenal injury alter the use of ibuprofen, asopirin and other non-steroidal anti-inflammatory agents. *Am. J. Med.* 77:19-24.
- Liu, E., Cho, Ch., (2000) Relationship between ethanol- induced gastritis and gastric ulcer formation in rats. *Dig.* 62:232-239.
- Ma, L., Chow, J. and 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.
- Makino, M., Koga, T., Ito, K., Kawada, H., Tabata, K., (1998) Delayed healing of chronic gastric ulcer after *Helicobacter pylori* infection in mice. *J. Pharmacol.*50: 943-8.
- Matsuda, H., Li, Y., and Yoshikawa, M., (1999). Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic. And oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci.* 65:27-32.

- Moreira, V. y López, A., (2004). Úlcera Péptica. Servicio de Gastroenterología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid *Rev. Esp. Enferm. Dig.* v.96 n.1 Madrid
- Navarrete, A., Martínez-Urbe, L. and Reyes, B. (1998). Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphiterygium adstringens* in rats. *Phytother. Res.* 12: 1-4.
- Navarrete, A., Trejo-Miranda, J. and Reyes-Trejo, L., (2002). Principles of root bark *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *J. Ethnopharmacol.* 79:383-388.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Estados Unidos Mexicanos. SAGARPA.
- O'Brien, P., Schutz, C., Gannon, B. and Browning, J., (1986). Protective effects of the synthetic prostaglandin enprostil on the gastric microvasculature after ethanol injury in the rat. *Am. J. Med.* 81(suppl.162):11-14.
- Peskar, B. and Maricci, N., (1998). Role of prostaglandins in gastroprotection. *Dig. Dis. Sci.* 43 (suppl. 9):23s-29s.
- Peskar, B.M., (2001). Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense. *J. Physiol Pharmacol.* 52(4): 555-568.
- Ramakrishnan K., Frcsse, MD. and Robert C. Salinas. (2007). Peptic Ulcer Disease. *Am. Fam. Physician.* 76:7:1005-1012.
- Reyes, B., Navarrete, A., Díez, A. O., Sixtos, C. y Estrada, E., (1991). Estudio fitoquímico de *Eupatorium aschenbornianum* (Axihuitl), planta medicinal con actividad antiulcerosa. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 21:31-33.
- Reyes, B., Sánchez, E., Becerra, A., Cedillo, E., Castillo, C., Arrieta J., (2008) Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer diterpenoid from *Croton reflexifolius*:

role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *J. Pharmacy and Pharmacology*. 60:931-936.

Ríos, Y., Aguilar-Guadarrama, B., Navarro, V., (2003). Two New Benzofuranes from *Eupatorium aschembornianum* and their Antimicrobial Activity. *Planta Med.* 69:967-970.

Robert, A., (1979). Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterol.* 77:761-767.

Rodríguez, C., (2006). Úlcera Péptica. Tópicos Selectos en Medicina Interna – *Gastroenterología*. Cáp 11. 162-176.

Rujjanawate, C., Kanjanapothi, D., Amornlerdpison, D., Pojanagaroon, S., (2005). Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *J. Ethnopharmacol.* 102, 120-122

Sánchez-Mendoza, M., Arrieta, J., Navarrete, A., (2008). Role of prostaglandins, nitric oxide, sulfhydryls and capsaicin-sensitive neurons in gastroprotection of stigmasterol and β -sitosterol. *N. P. C.* 3: 505-510.

Shorrock, C., Prescott, J., Ress, D., (1990). The effects of indometacin on gastroduodenal morphology and mucosal pH gradient in the healthy human stomach. *Gastroenterol.* 99: 334-339.

Shorrock, C. and Rees, W., (1988). Overview of gastroduodenal mucosal protection. *Am. J. Med.* 84 (suppl. 2A). 25-34.

Smith, H. y Thier, O., (1989). Fisiopatología. Principios biológicos de la enfermedad. 2^a ed. Ed. Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Snykers, F. and Fourie, T., (1989). *Eur. Patent* EP 93520. En. 100:39613

Szabo, S. and Goldberg, I., (1990). Experimental pathogenesis: drugs and chemical lesion in the gastric mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.* 25 (suppl. 174):1-8.

Szabo, S., Trier, J., Frnakel, P., (1981). Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Sci.* 214:200-202.

- Takahashi, S., Takeuchi, K. and Okabe, S. (1999). EP₄ receptor mediation of prostaglandin E₂-stimulated mucus secretion by rabbit gastric epithelial cells. *Bioche. Pharmacol.* 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. *Dig. Dis. Sci.* 47:2116-2124.
- Takeuchi, K., Kitamura, M. and Kubomi, M., (1998). Stimulation of duodenal bicarbonato secretion by carbenoxolone in rats: A comparative study with prostaglandin PgE₂. *Gen. Pharmac.* 30:739-744.
- Tanaka, A., Araki, H., Komoike, Y., Hase, S. and Takeuchi, K. (2001). Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to noesteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Physiol. Paris.* 95: 21-27.
- Tarnawskin, A., (1995). Mecanismos Celulares y Moleculares de la Mucosa Gástrica: La Injuria a la Mucosa y la acción protectora de los antiácidos. *Rev. Gastroent. Perú* 1995; 15(1): 74-78.
- Tarnawskin, A., (2005). Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal ulcer Healing. *Dig. Dis. Sci.* 50: supplement 1: S24-S33.
- Torres, J., (2003). Infección por *Helicobacter pylori* en niños y adultos. *Salud IMSS* 18-28.
- 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. and Gottfried, S., (1985). Citoprotective action of carbenoxolone sodium on ethanol-induced gastric lesson in rats and its inhibition by indomethacin. *J. Phaem. Phamacol.* 37:739-741.

Xue, S., Chen, S., Wu, J. and Wang, M. (1996). Antigastric ulcerative actions emulsive granules of seed oil of *Brucea Javanica*. *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao*. 13:13-17.

Yamazaki, M., (1983). Jpn. Kokai Tokio JP. 5857316; En *Chem. Abstr.* 99:16563.

Zhang, J., Yan, C., Zhan, Y., Gao, W., Zhai, X., (1990). Effect of Scopolia drugs on the gastric mucosal lesions in rats. *Yaoxue Xuebao*. 25(2):90-4. *Chem. Abstr.* (1990) 112:40

XII. Anexo

La presente investigación genero la siguiente publicación.

Sánchez-Mendoza , M., Reyes-Trejo B., Sánchez-Gómez P., Rodríguez-Silverio J., Castillo-Henkel C., Cervantes-Cuevas H., Arrieta-Valencia J. (2009). Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer chromene from *Eupatorium aschenbornianum*: Role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Fitoterapia* doi:10.1016/j.fitote.2009.07.009

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Fitoterapia

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fitote

Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer chromene from *Eupatorium aschenbornianum*: Role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls

María Elena Sánchez-Mendoza^a, Benito Reyes-Trejo^b, Paula Sánchez-Gómez^a,
Juan Rodríguez-Silverio^a, Carlos Castillo-Henkel^a, Humberto Cervantes-Cuevas^c, Jesús Arrieta^{a,*}

^a 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

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

^c Área de química, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, Av. San Pablo, Colonia Reynosa Tamaulipas 02200, México D. F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2009

Accepted in revised form 22 July 2009

Available online xxx

Keywords:

Gastroprotection

Peptic ulcer

Encecanescin

Eupatorium aschenbornianum

Asteraceae

ABSTRACT

Eupatorium aschenbornianum is considered useful in the treatment of gastric ulcer. In the current study the validity of this practice was tested by using the experimental model of an ethanol induced gastric ulcer in rats. The results show that *E. aschenbornianum* had gastroprotective activity, that the hexane extract had the highest protective activity ($85.65 \pm 4.76\%$), and that encecanescin isolated from this extract was the main active gastroprotective agent. The effect elicited by encecanescin was attenuated by N^G-nitro-L-arginine methyl ester, N-ethylmaleimide and indomethacin, which suggests that NO, prostaglandins and sulfhydryl groups are involved in the mechanisms of gastroprotective action.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

A peptic ulcer is an excoriated area of the gastric or duodenal mucosa caused by the action of gastric juice. It is a chronic and recurrent disease, and is the most predominant of the gastrointestinal disorders. It is generally recognized that peptic ulcers are caused by a lack of equilibrium between gastric aggressive factors and mucosal defensive factors [1]. A gastric ulcer is among the most serious diseases in the world. The etiology of gastroduodenal ulcers is influenced by various aggressive factors, such as 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 [2,1]. On the other hand, defensive mechanisms of the gastric mucosal 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 neural factors [3,4]. 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, or the adverse effects and high cost [2]. In the search for new therapeutic options, traditional medicinal plants are a source of natural products, such as triterpenes, diterpenes and flavonoids, among others with gastroprotective activity [5]. The genus *Eupatorium* belongs to the Eupatorieae family, one of the 13 families of Asteraceae, the latter of which includes nearly 1200 species that are distributed mainly in the tropical regions of the Americas, Europe, Africa and Asia. In addition to their antiulcerogenic uses, plant species in this genus have been used for many decades in folk medicine as antimalarial, antibacterial, antifungal and anti-inflammatory agents [6]. These species are well known for such components as sesquiterpene lactones, diterpenes, triterpenes, flavonoids, pyrrolizidine alkaloids, and

* Corresponding author. Tel.: +55 57 29 63 00x62 827; fax: +55 56 22 53 29.
E-mail address: maestrojesus@hotmail.com (J. Arrieta).

many different types of monoterpene derivatives, among others. Some of these substances have cytotoxic, antimicrobial and immunomodulating properties [6].

In traditional medicine of the state of Morelos, Mexico, the leaves of *Eupatorium aschenbornianum*, locally known as axihuitl, are commonly prepared by healers and shamans as infusions and used to treat tumors, skin problems, wounds, aphthae and gastric ulcers [7,8]. However, there is no scientific report either validating or invalidating the empirical use of this plant to cure gastric ulcers. Therefore, we tested the gastroprotective activity of *Eupatorium aschenbornianum* and, upon validating such protective action, proceeded to identify the active compounds. A bioassay-guided fractionation was performed and the compounds obtained were tested with the absolute ethanol-induced gastric ulcer experimental model in Wistar rats. In addition, the role of endogenous NO, sulfhydryl groups and prostaglandins in the gastroprotective effect was evaluated in order to provide information about the mechanism of action of these compounds. The results were compared to the effect of carbenoxolone.

2. Materials and methods

2.1. General procedures

Infrared spectrum was determined on a Perkin-Elmer spectrometer (model 1310). High resolution mass spectroscopy was performed in a JEOL spectrometer (model 102 ASX). The ^{13}C and ^1H NMR spectra were recorded on a Bruker DPX-300 spectrometer operating at 75.4 MHz for ^{13}C and at 300 MHz for ^1H . Chemical shifts are quoted relative to internal TMS.

2.2. Plant material

The leaves of *Eupatorium aschenbornianum* were collected in San Juan, Morelos during August of 2007. A specimen of the original collection can be found in the biology area of the Hortorio Jorge Espinosa Herbarium at the Chapingo Autonomous University, with the voucher number 1835.

2.3. Extraction and preliminary fraction

The leaves of *E. aschenbornianum* were dried at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) in the shade. After grinding 3.0 kg of leaves, compounds were successively extracted from them by maceration at room temperature ($22^\circ\text{C} \pm 2$) during 3 days, first with hexane ($15\text{ L} \times 3$), then dichloromethane ($15\text{ L} \times 3$), and finally methanol ($15\text{ L} \times 3$). Evaporation of the solvents in

vacuum yielded 66.8 g, 75.3 g and 150.6 g of syrupy residues, respectively. The hexane extract obtained from the leaves of *E. aschenbornianum* 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, F1), hexane/EtOAc (9:1, 1.7 L, F2), hexane/EtOAc (7:3, 1.7 L, F3), and hexane/EtOAc (1:1, 1.7 L, F4). Fraction 2 (F2), which was the most active, was chromatographed on a silica gel column (200 g). Elution was performed with the hexane and hexane/EtOAc mixtures, using 50 fractions of 20 mL each. Fractions 15–25 (Hexane/EtOAc, 95:5) yielded a white solid (2.30 g, mp 148–150 $^\circ\text{C}$), which was identified as encenescin (Fig. 1) by comparing its spectral data (IR, FAB $^+$ -MS, ^1H and ^{13}C NMR) with that of the literature [9].

2.4. Animals

All the experiments were performed with male Wistar rats, weighing 180–220 g, obtained from the animal house of the Superior Medicine School (ESM) of the National Polytechnic Institute (IPN). 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 allowed free access to tap water throughout. All experiments were carried out using 7–10 animals per group.

2.5. Drugs and dosage

Carbenoxolone (Sigma-Aldrich Co.) was used as the gastroprotective 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 indomethacin were purchased from Sigma Chemical Co., USA.

2.6. Acute gastric ulcer induced by absolute ethanol

A gastric ulcer was induced by orally administering absolute ethanol (1 mL), as described by Robert [10]. 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 CO $_2$

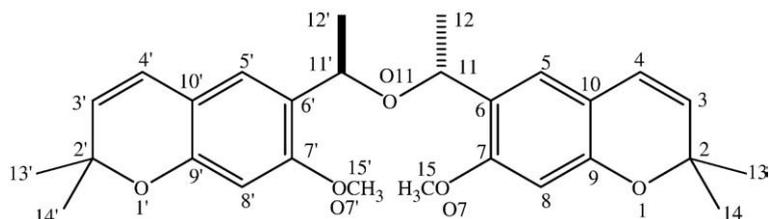


Fig. 1. The structure of encenescin.

Table 1

Gastroprotective effect of the extracts of *Eupatorium aschenbornianum* on ethanol induced ulceration in rats.

Treatment	Dose (mg/kg)	n	UI (mm ²)
Hexane extract	10	7	45.64 ± 9.43*
	30	7	18.17 ± 6.42*
	100	7	10.78 ± 3.57*
Dichloromethane extract	10	7	40.24 ± 1.999*
	30	7	40.67 ± 5.50*
	100	7	27.56 ± 7.42*
Methanol extract	10	7	38.58 ± 5.86*
	30	7	39.69 ± 3.56*
	100	7	40.78 ± 5.18*

* $p < 0.05$ versus control group. The ulcer index in the control group for this evaluation was 72.88 ± 5.85 .

UI = Ulcer index.

chamber. The stomach and duodenum were dissected out, inflated with 10 mL of 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 ($\times 10$) 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) \times 100/UIC, where UIC is the ulcer index for control and UIT is the index for the test animals [11,12].

2.7. 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 animals of 3 experimental groups 30 min before the administration of either the vehicle, enecanescin (100 mg kg⁻¹) or carbenoxolone (100 mg kg⁻¹) by the oral route [11]. 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.

2.8. Ethanol-induced gastric mucosal lesions in indomethacin-pretreated rats

To investigate the involvement of endogenous prostaglandins in the gastroprotective effect of the compounds, a control group received a subcutaneous injection of 5 mM NaHCO₃ in saline solution and another three groups an injection of indomethacin (10 mg kg⁻¹ dissolved in NaHCO₃ 5 mM) by the same route [13]. After 75 min, the animals in each of these four groups received one of 3 oral treatments: two groups were treated with saline solution and the other two groups with either 100 mg kg⁻¹ enecanescin or 100 mg kg⁻¹ carbenoxolone. Absolute ethanol was given to each rat 30 min after enecanescin 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 aforementioned.

2.9. Ethanol-induced gastric mucosal lesions in NEM pretreated rats

To investigate the involvement of endogenous sulfhydryls in the protective effects of enecanescin and carbenoxolone, NEM (10 mg kg⁻¹ dissolved in saline solution) was subcutaneously injected in 3 groups of animals 30 min before the oral administration of either the vehicle, enecanescin (100 mg kg⁻¹) or carbenoxolone (100 mg kg⁻¹) [11]. Absolute ethanol was given to each rat 30 min later and rats were killed 2 h after the ethanol administration to measure the intensity of the gastric ulcer. Two control groups (NEM-treated and non-NEM-treated) were included in this experiment.

2.10. Statistics

Data are presented as the mean \pm SEM from 7–10 rats per group. Statistically significant differences between the treatments were tested by the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparison tests. Probability (p) values less than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Gastroprotective effect

The gastroprotective activities on ethanol induced ulcerations in rats by different extracts of *E. aschenbornianum* are given in Table 1. The hexane extract elicited a dose dependent gastroprotective effect (maximum $85.65 \pm 4.76\%$ gastroprotective effect with 100 mg kg⁻¹) and was more active than the dichloromethane and methanol extracts. Of the four (F1 to F4) fractions obtained from the silica gel percolation of the hexane extract, F2 was found to be the most active (maximal $83.19 \pm 5.63\%$ gastroprotective effect; see Table 2). A pure compound identified as enecanescin, was obtained from F2, and showed a dose-dependent gastroprotective effect. The maximal gastroprotective effect of enecanescin, obtained with 100 mg kg⁻¹, was $68.62 \pm 7.81\%$ (Fig. 2A). It is worth mentioning that in addition to enecanescin, β -sitosterol and stigmasterol [7] were isolated from fraction F2. They were not considered in this work because of the scarce quantity

Table 2

Gastroprotective effect of the fractions of the hexane extract on ethanol induced ulceration in rats.

Treatment	Dose (mg/kg)	n	UI (mm ²)
F1	100	8	19.13 ± 4.92*
F2	100	8	9.67 ± 3.24 *
F3	100	8	32.96 ± 6.38*
F4	100	8	17.06 ± 2.29*

* $P < 0.05$ versus control group. The ulcer index in the control group for this evaluation was 72.88 ± 5.85 .

UI = Ulcer index.

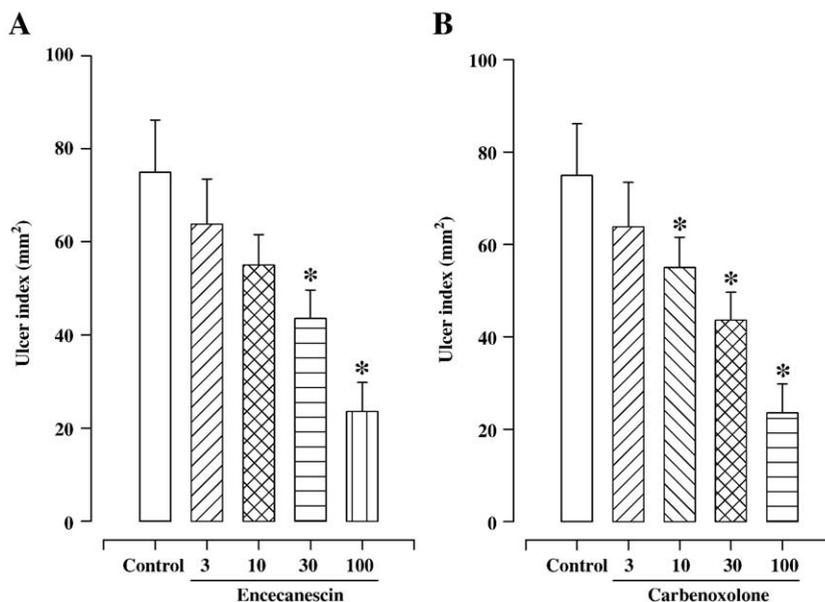


Fig. 2. Effect of different doses of (A) encecanescin (3–100 mg kg⁻¹) and (B) carbenoxolone (1–100 mg kg⁻¹) on gastric lesions induced in rats by absolute ethanol. Bars represent the mean \pm SEM., $n = 7-10$. * $p < 0.05$, vs the respective control; Dunn's multiple comparison test after Kruskal–Wallis test.

obtained and the fact that their gastroprotective effect is already very well known [12,14].

As previously mentioned, for comparative reasons the effect of carbenoxolone was also studied and the maximal gastroprotective effect induced by this compound was $66.20 \pm 8.71\%$ at a dose of 100 mg kg⁻¹. Carbenoxolone elicited a dose-dependent inhibition of gastric ulcers (Fig. 2B) that was not significantly different than that produced by encecanescin.

3.2. Effect of L-NAME, indomethacin and NEM on the gastroprotective effect

The ulcer indexes of the rats treated with 70 mg kg⁻¹ of L-NAME (104.16 ± 12.40 mm², Fig. 3A), 10 mg kg⁻¹ of indomethacin (85.1591 ± 12.8970 mm², Fig. 3B), or 10 mg kg⁻¹ of NEM (90.85 ± 4.42 mm², Fig. 3C) were not significantly different ($p < 0.05$) than their respective controls treated only

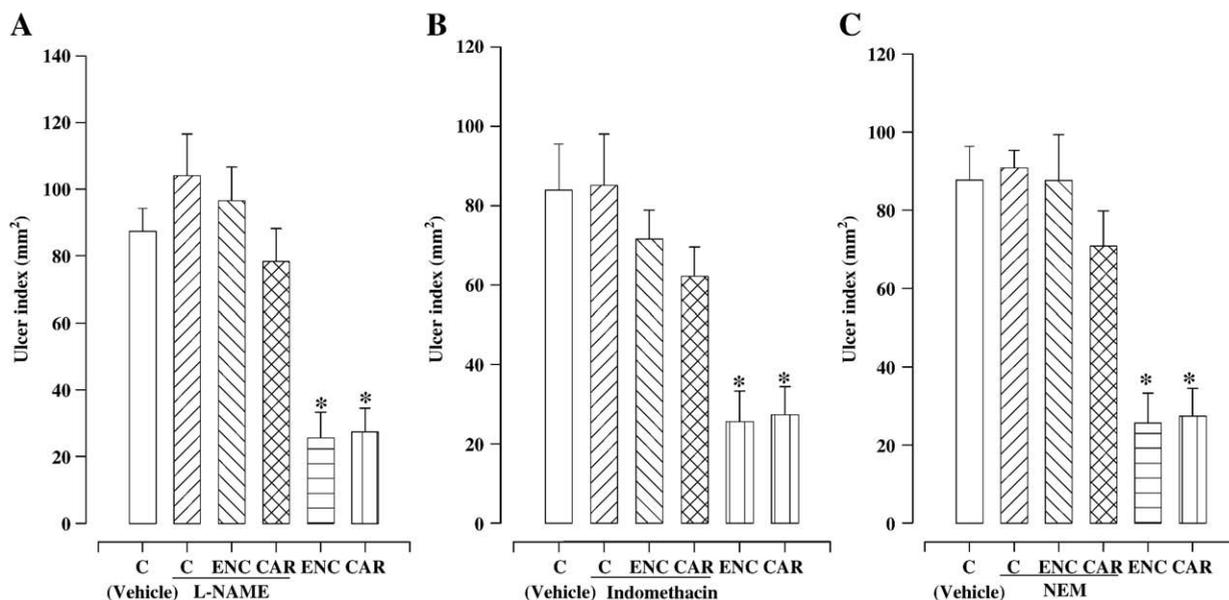


Fig. 3. Effect of encecanescin (ENC) and carbenoxolone (CAR) at 100 mg kg⁻¹ on gastric lesions induced by ethanol in rats pretreated with (A) L-NAME (70 mg kg⁻¹), (B) indomethacin (10 mg kg⁻¹) or (C) NEM (10 mg kg⁻¹). Bars represent the mean \pm SEM., $n = 7-10$. * $p < 0.05$, vs the respective control; Dunn's multiple comparison test after Kruskal–Wallis test.

with saline solution ($87.48 \pm 6.83 \text{ mm}^2$, $83.97 \pm 11.56 \text{ mm}^2$, and $87.80 \pm 8.64 \text{ mm}^2$). Previously, it was reported that such doses of these inhibitors were high enough to block prostaglandin synthesis, NO synthase and endogenous sulfhydryls, respectively, without producing ulcers or aggravating those previously present [12].

Pretreatment with L-NAME (70 mg kg^{-1} , s.c.) attenuated the gastroprotective effect of both enecanescin (100 mg kg^{-1}) and carbenoxolone (100 mg kg^{-1}) (Fig. 3A). The ulcer index obtained in the rats pretreated with L-NAME, then treated with enecanescin ($96.61 \pm 10.07 \text{ mm}^2$) or carbenoxolone ($78.41 \pm 9.80 \text{ mm}^2$) was not significantly different ($p < 0.05$) than the L-NAME-pretreated controls ($104.16 \pm 12.40 \text{ mm}^2$).

Pretreatment with indomethacin (10 mg kg^{-1}) also attenuated the gastroprotective effect of both enecanescin (100 mg kg^{-1}) and carbenoxolone (100 mg kg^{-1}) (Fig. 3B). The ulcer index obtained in the rats pretreated with indomethacin, then treated with enecanescin ($71.56 \pm 7.33 \text{ mm}^2$) or carbenoxolone ($62.23 \pm 7.29 \text{ mm}^2$) was not significantly different ($p < 0.05$) than the indomethacin-pretreated control ($85.15 \pm 12.89 \text{ mm}^2$).

Finally, pretreatment with NEM (10 mg kg^{-1}) likewise attenuated the gastroprotective effect of both enecanescin (100 mg kg^{-1}) and carbenoxolone (100 mg kg^{-1}) (Fig. 3C). The ulcer index obtained in the rats pretreated with NEM, then treated with enecanescin ($87.68 \pm 11.66 \text{ mm}^2$) or carbenoxolone was not significantly different ($p < 0.05$) than that NEM-pretreated controls.

4. Discussion

In the present study we provide preliminary scientific support to the popular practice of employing *E. aschenbornianum* in the treatment of gastric ulcers [8]. It was found that extracts obtained from the leaves of this plant have gastroprotective activity in the experimental rat model of ethanol induced gastric ulcers. The hexane extract was the most potent, with a maximal $85.65 \pm 4.76\%$ gastroprotective effect. The bioassay-guided fractionation showed that F2 was the most active fraction, with a maximal gastroprotective effect of $83.19 \pm 5.63\%$. Enecanescin was the main active ingredient isolated from F2. Interestingly, the maximal effect of enecanescin as a pure compound ($68.62 \pm 7.81\%$) was lower than that produced by F2, which is probably due to the fact that two other well-known gastroprotector compounds, β -sitosterol and stigmasterol [14], also form part of this fraction.

Enecanescin is a chromene and the genus *Eupatorium* is well known for its chromene content [15]. Although enecanescin was isolated several years ago [9], the current study represents the first report of its gastroprotective activity.

In an attempt to provide information about the mechanism of the gastroprotective action of enecanescin, 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 [4]. The current results show that in the presence of L-NAME the gastroprotective effect of enecanescin was inhibited ($96.61 \pm 10.07 \text{ mm}^2$), as was the protective effect of carbenoxolone (Fig. 3A). Thus NO is involved in the

gastroprotection elicited by both enecanescin and carbenoxolone, the latter being an anti-ulcer drug derived from a natural source that was used in this study as a comparative drug.

Prostaglandins, especially PGE_2 and PGI_2 , are both responsible for mucus production and the maintenance of cellular integrity in the gastric mucosa [16], as well as being involved in the protection of the gastric mucus. The current results show that prostaglandins participated in the mechanism of gastroprotection of both enecanescin and carbenoxolone.

Pretreatment with indomethacin inhibited the gastroprotective action elicited by enecanescin ($71.56 \pm 7.33 \text{ mm}^2$) and carbenoxolone ($62.23 \pm 7.29 \text{ mm}^2$). These results are consistent with data reported in the literature [17].

Further evidence was provided about the mechanism of action of enecanescin 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 free radicals, the latter of which are eliminated since the mucus is rendered water-soluble [18,19].

Consequently, we pretreated animals with NEM, a blocker of sulfhydryl compounds (Fig. 3C), in order to investigate the possible involvement of these compounds in the gastroprotective effect of enecanescin. The results indicate that pretreatment with NEM inhibited the gastroprotective effect of both enecanescin ($87.68 \pm 11.66 \text{ mm}^2$) and carbenoxolone ($70.86 \pm 8.94 \text{ mm}^2$), indicating that endogenous sulfhydryls are involved in the gastroprotective effect by both the chromone and the reference compound.

In conclusion, the current study demonstrates the effectiveness of *E. aschenbornianum* in the treatment of gastric ulcer. Enecanescin was identified as the main active gastroprotective agent in this traditional medicinal plant. The mechanism of the gastroprotective action shown by enecanescin is related to endogenous NO, prostaglandins and sulfhydryl groups.

Acknowledgements

This work was supported by grant from the Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional (México) (Proyecto 20082383). We thank Bruce Allan Larsen for reviewing the use of English in this manuscript.

References

- [1] Falcão HS, Mariath IR, Diniz MF, Batista LM, Barbosa-Filho JM. Phytomedicine 2008;15:132.
- [2] Toma W, Gracioso JdeS, De Andrade FD, Hiruma-Lima CA, Vilegas W, Souza-Brito AR. Biol Pharm Bull 2002;25:1151.
- [3] Tsukimi Y, Okabe S. Biol Pharm Bull 2001;24:1.
- [4] Calatayud S, Barrachina D, Esplugues JV. Microsc Res Tech 2001;53:325.
- [5] Borrelli F, Izzo AA. Phytother Res 2000;14:581.
- [6] Zhang ML, Wu M, Zhang JJ, Irwin D, Gu YC, Shi QW. Chem Biodivers 2008;5:40.
- [7] Rios MY, Aguilar-Guadarrama AB, Navarro V. Planta Med 2003;69:967.
- [8] Estrada E. Jardín Botánico de Plantas Medicinales Maximino Martínez. México: Universidad Autónoma Chapingo; 1985. 12 pp.
- [9] Fang N, Yu S, Mabry TJ. Phytochemistry 1988;27:1902.
- [10] Robert A. Gastroenterology 1979;77:761.
- [11] Matsuda H, Li Y, Yoshikawa M. Life Sci 1999;65:PL 27.

- [12] Arrieta J, Benitez J, Flores E, Castillo C, Navarrete A. *Planta Med* 2003;69:905.
- [13] Wan BY, Gottfried S. *J Pharm Pharmacol* 1985;37:739.
- [14] Sánchez-Mendoza M, Arrieta J, Navarrete A. *N P C* 2008;3:505.
- [15] Gómez F, Quijano L, Calderón JS, Perales A, Ríos T. *Phytochemistry* 1982;21:2095.
- [16] Rujjanawate C, Kanjanapothi D, Amornlerdpison D, Pojanagaroon S. *J Ethnopharmacol* 2005;102:120.
- [17] Reyes-Trejo B, Sánchez-Mendoza ME, Becerra-García AA, Cedillo-Portugal E, Castillo-Henkel C, Arrieta J. *J Pharm Pharmacol* 2008;60:931.
- [18] Ávila JR, de la Lastra CA, Martín MJ, Motilva V, Luque I, Delgado D, et al. *Inflamm Res* 1996;45:83.
- [19] Maity S, Vedasiromoni JR, Ganguly DK. *Jpn J Pharmacol* 1998;78:285.

Glosario de abreviaturas

L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
NEM	N-etilmaleimida
NO	Óxido nítrico
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
COX	Ciclo oxigenasa
TNF- α	Factor alfa de necrosis tumoral
IgA	Inmunoglobulina A
PG	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandinas E ₂
PGI ₂	Prostaciclina PGI ₂
Tx	Tromboxanos
PRGC	Péptido relacionado al gen de la calcitonina
EGF	Péptido factor de crecimiento epidérmico
AcOEt	Acetato de etilo
CAR	Carbenoxolona
ENC	Encecanescina