



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“Actividad gastroprotectora de *Tithonia diversifolia* utilizando el
modelo de lesiones inducidas por etanol en rata Wistar”**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

LUIS ANTONIO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

Director: Dra. María Elena Sánchez Mendoza

Asesor: Dra. Leticia Cruz Antonio





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Síntesis de Fármacos dentro de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

La investigación fue realizada bajo la dirección de la Dra. Ma. Elena Sánchez Mendoza y la Dr. Leticia Cruz Antonio.

Este trabajo fue financiado parcialmente con apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (Proyecto PAPIIT IN-209810).

A los miembros del jurado integrado por Dr. Adelfo N. Reyes Ramírez, Dra. Ma. Elena Sánchez Mendoza, Dra. Leticia Cruz Antonio, Q.F.B. Irma Alejandre Razo y Dr. Arturo Valle Mendiola.

DEDICATORIAS

A mi madre Victoria, por su apoyo y amor continuo e incansable no solo durante mi carrera, sino durante toda la vida. Por ser un ejemplo y la voz en mi cabeza que me guía para hacer lo correcto.

A mi padre Alejandro, por enseñarme a nunca olvidar quien soy, de donde vengo y a donde voy.

A mis hermanos Manuel Alejandro y Victor Daniel, por estar presentes en los mejores y los peores momentos de mi vida, por soportarme todos estos años y por que no importa lo que pase, siempre seremos hermanos.

A Valeria, por ser la mejor amiga y una de las personas más maravillosa que he conocido, por todo lo que compartimos y lo que compartiremos.

A Ignacio, por todas las pláticas, las risas y por ser un amigo en las buenas y en las malas.

A Ivan Monsalvo, Ricardo Adrián, Claudia Arlette, quienes me han apoyado en los momentos mas oscuros, escuchado cuando tenía algo que decir y por empujarme cuando estaba confundido.

A mis amigos Aldo, Alma, Alejandro Eduardo y Victor Hugo, porque a pesar del tiempo y los problemas, se que tengo su amistad.

A todos y cada uno de los amigos, compañeros y maestros que conocí durante la carrera, de quienes aprendí lo hermosa y divertida que es la vida.

A todos y cada uno de los amigos, compañeros y maestros que conocí durante la carrera, de quienes aprendí lo hermosa y divertida que es la vida.

Actividad gastroprotectora de *Tithonia diversifolia* utilizando el modelo de lesiones inducidas por etanol en rata Wistar

Al Dr. Adelfo N. Reyes, por ser el primero en darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y de esta forma, dar el primer paso hacia lo que será el resto de mi vida.

Y de manera muy especial al Dr. Edelmiro Santiago Osorio, a la Biól. Itzen Aguiñiga y a todos los miembros del Laboratorio de Hepatopoyesis y Leucemia dentro de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, por brindarme su amistad, su apoyo y por darme la oportunidad de aprender algo nuevo.

A la vida.

A Dios.

Actividad gastroprotectora de *Tithonia diversifolia* utilizando el modelo de lesiones inducidas por etanol en rata Wistar

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber” Albert Eintein.

“Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo, involúcrame y lo aprendo” Benjamin Franklin.

“Mediocre alumno aquel que no sobrepasa a su maestro” Leonardo Da Vinci.

“Todo hombre que conozco es superior a mí en algún sentido. En ese sentido, aprendo de él” Ralph Waldo Emerson.

“Personalmente siempre estoy dispuesto a aprender, aunque no siempre me gusta que me den lecciones” Winton Churchill.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I INTRODUCCIÓN.....	2
II MARCO TEÓRICO	3
2.1 ÚLCERA PÉPTICA.....	3
2.2 CLASIFICACIÓN	3
2.3 SÍNTOMAS	3
2.4 ETIOLOGÍA.....	4
2.4.1 Factores nocivos para la mucosa gástrica.....	5
2.4.1.1 Hipersecreción de ácido.....	5
2.4.1.2 Infección por <i>Helicobacter pylori</i>	5
2.4.1.3 Consumo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos	5
2.4.1.4 Fumar tabaco.....	6
2.4.1.5 Consumo de alcohol	6
2.4.1.6 Estrés	7
2.5 MECANISMOS DE DEFENSA DE LA MUCOSA GÁSTRICA.....	7
2.5.1 Factores funcionales	7
2.5.1.1 Barrera moco-bicarbonato	7
2.5.1.2 Microcirculación	8
2.5.1.3 Motilidad.....	8
2.5.2 Factores humorales.....	8
2.5.2.1 Prostaglandinas	9
2.5.2.2 Óxido nítrico	9
2.5.3 Factores neuronales	10
2.5.4 Grupos sulfhidrido	10
2.6 FÁRMACOS EMPLEADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA ÚLCERA GÁSTRICA	11
2.6.1 Antiácidos	11
2.6.2 Supresores de la secreción gástrica	12
2.6.2.1 Antagonistas de los receptores de histamina tipo H ₂	13

Actividad gastroprotectora de *Tithonia diversifolia* utilizando el modelo de lesiones inducidas por etanol en rata Wistar

2.6.2.2 Antagonistas de los receptores muscarínicos.....	13
2.6.2.3 Antagonistas de la gastrina	13
2.6.2.4 Inhibidores de la bomba de protones.....	14
2.6.3 Fármacos citoprotectores.....	14
2.6.3.1 Sucralfato	14
2.6.3.2 Carbenoxolona	14
2.6.3.3 Análogos de las prostaglandinas	15
2.6.3.4 Sales de bismuto.....	15
2.6.4 Meciadanol.....	15
2.6.5 Sulglicótido	16
2.6.6 Alginato	16
2.7 METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIULCEROSA.....	16
2.7.1 Triterpenoides	16
2.7.2 Flavonoides.....	17
2.7.3 Gomas y mucílagos	17
2.7.4 Saponinas.....	18
2.7.5 Taninos	18
2.7.6 Alcaloides	18
2.7.7 Aceites	19
2.8 PLANTAS EMPLEADAS EN EL TRATAMIENTO DE LA ÚLCERA GÁSTRICA EN MÉXICO	19
2.8.1 <i>Hippocratea excelsa</i>	20
2.8.2 <i>Amphipterygium adstringens</i>	20
2.8.3 <i>Croton reflexifolius</i>	20
2.8.4 <i>Eupatorium ascherbonianum</i>	21
2.8.5 <i>Tithonia diversifolia</i>	21
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
IV HIPÓTESIS	23
V OBJETIVOS.....	24

Actividad gastroprotectora de *Tithonia diversifolia* utilizando el modelo de lesiones inducidas por etanol en rata Wistar

5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos	24
VI MATERIAL Y MÉTODO	25
6.1 Material vegetal	25
6.2 Preparación de los extractos de <i>Tithonia diversifolia</i>	25
6.3 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de diclorometano.....	26
6.4 Material biológico	28
6.5 Fármacos.....	29
6.6 Evaluación del efecto gastroprotector de los extractos, fracciones de <i>T. diversifolia</i> y/o tagitinina C	29
6.7 Evaluación de la participación de óxido nítrico en el efecto gastroprotector de tagitinina C.....	31
6.8 Evaluación de la participación de las prostaglandinas en el efecto gastroprotector de tagitinina C	33
6.9 Evaluación de la participación de los grupos sulhidrido en el efecto gastroprotector de tagitinina C	33
6.10 Estadística.....	36
6.11 Procedimientos generales	36
6.12 Datos espectroscopicos.....	36
VII RESULTADOS	37
7.1 Efecto gastroprotector de los extractos de <i>Tithonia diversifolia</i>	37
7.2 Evaluación de la actividad gastroprotectora de tagitinina C	40
7.4 Participación del óxido nítrico, las prostaglandinas y los grupos sulfhidrilo en el mecanismo de acción gastroprotector de tagitinina C	42
VIII DISCUSIÓN	46
8.2 Participación del óxido nítrico, las prostaglandinas y los grupos sulfhidrilo en la actividad gastroprotectora de tagitinina C.....	47
IX CONCLUSIONES	49
X PERSPECTIVAS	50
XI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

XII. ANEXOS	59
12.1 Espectro de RMN-1H (300 Mhz, OC) de tagitinina C.....	59
12.2 Espectros de RMN-13C (75 MHz, OC) de tagitinina C.....	60
12.3 Artículo impreso	61

RESUMEN

En el municipio de Suchiapa, perteneciente al Estado de Chiapas, México, las hojas de *Tithonia diversifolia* (árnica) son utilizadas principalmente para el tratamiento de las úlceras gástricas, sin embargo, no se disponía de evidencia científica que corroborara dicha aplicación terapéutica. Por lo que considerando lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto gastroprotector de *T. diversifolia* a través de un estudio biodirigido utilizando el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas Wistar. Los resultados obtenidos indican que los extractos de hexano, diclorometano y metanol presentan una gastroprotección similar a la dosis de 100 mg/kg. Sin embargo, a la dosis de 30 mg/kg los extractos de hexano y metanol fueron inactivos, el extracto de diclorometano mostro actividad gastroprotectora tanto a la dosis de 30 mg/kg como a la de 10 mg/kg, dicho efecto no fue dependiente de la dosis.

El fraccionamiento del extracto de diclorometano permitió aislar e identificar a la tagitinina C como uno de los principales compuestos con actividad gastroprotectora. La evaluación de la actividad gastroprotectora de tagitinina C a las dosis de 1, 3, 10 y 30 mg/kg mostró un 37.7, 70.1, 100 y 100 % de gastroprotección, respectivamente. Adicionalmente se exploró el posible mecanismo de acción de esta lactona y los resultados sugieren que en su mecanismo de acción gastroprotector no están implicadas las prostaglandinas, el óxido nítrico o los grupos sulfhidrilo, ya que su efecto no se inhibió con el pretratamiento de indometacina, L-NAME ó N-etilmaleimida, respectivamente.

I INTRODUCCIÓN

En México las úlceras gástricas son uno de los principales problemas de salud y a nivel mundial su incidencia se ha incrementado en los últimos años.

Las úlceras gástricas son lesiones de la mucosa gástrica y de manera general se acepta que son causadas por el desequilibrio entre los factores nocivos (ácido, pepsina e infección por *Helicobacter pilory*, etc) y los factores de protección de la mucosa gástrica (secreción de moco, bicarbonato, óxido nítrico, prostaglandinas, microcirculación, etc). En la actualidad su tratamiento farmacológico está conformado por medicamentos antiácidos, antisecretores y/o citoprotectores, sin embargo, no se cuenta con medicamentos que cubran las expectativas de fármaco ideal, esto es, que alivie el dolor, cure la úlcera y retrase el periodo de recurrencia del padecimiento con mínimos efectos adversos.

Es por ello que cierto porcentaje de la población sigue recurriendo a la medicina tradicional, ya sea en forma complementaria o como alternativa para resolver sus problemas de salud. En nuestro país se tiene un registro de 56 plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de úlceras gástricas, entre las que se encuentra *Tithonia diversifolia*, que de manera popular se le conoce como árnica en el municipio de Suchiapa en el estado de Chiapas, sin embargo, a pesar de su uso tradicional no existen estudios que sustentaran dicha utilidad.

Considerando lo anterior, el presente proyecto estuvo encaminado a efectuar un estudio biodirigido de la actividad gastroprotectora de *T. diversifolia* utilizando el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en rata Wistar. Dicho estudio permitió la identificación de la lactona sesquiterpenica tagitinina C, como uno de los constituyentes responsables de la actividad gastroprotectora. Adicionalmente se aporta información sobre su posible mecanismo de acción.

II MARCO TEÓRICO

2.1 ÚLCERA PÉPTICA

La úlcera péptica es una enfermedad que se caracteriza por la pérdida de sustancia mucosa que puede extenderse a la submucosa e incluso a la capa muscular, afectando a zonas del aparato digestivo que están en contacto con el ácido clorhídrico (Alsasua, 2003). La úlcera péptica incluye tanto a la úlcera gástrica como a la úlcera duodenal (Malfertheiner *et al.*, 2009).

2.2 CLASIFICACIÓN

En base a su localización la úlcera péptica se clasifica en tres tipos. En las úlceras Tipo 1, el lugar frecuentemente ulcerado es la curvatura menor del estómago, cerca de la incisura angularis, las úlceras de Tipo 2, son las úlceras concomitantemente gástricas y duodenales y las de Tipo 3 son las pre-pilóricas, las cuales están altamente asociadas a la ingesta de anti-inflamatorios no esteroideos (Reymunde, 2007).

Las úlceras gástricas también se clasifican en aguda o crónica de acuerdo a la cantidad de tejido conjuntivo dañado, la úlcera gástrica aguda difiere de una crónica debido a que el grado de erosión en la úlcera aguda, afecta solo a la mucosa y submucosa sin llegar hasta la *muscaris mucosae*, mientras que la úlcera crónica pasa por ciclos de ulceración y cicatrización acompañados de mejorías clínicas (Carretero, 2001; Ferrer *et al.*, 2006).

2.3 SÍNTOMAS

El síntoma predominante de la úlcera péptica sin complicaciones es un dolor epigástrico, que puede ser acompañado por otros síntomas dispépticos como distensión abdominal, saciedad temprana y náusea (Malfertheiner *et al.*, 2009).

En la úlcera gástrica el dolor es sordo, difuso a nivel epigástrico o hipocondrio derecho. En la mayoría de los pacientes el dolor mejora con la ingestión de alimentos, pero se incrementa de una a tres horas después, en el 50 % de los casos. Hay otros síntomas como son náusea, vómito, obstrucción parcial o total del píloro, disminución de peso, pirosis y síntomas dispépticos vagos. También puede presentarse un cuadro de abdomen agudo, por perforación o hemorragia.

La úlcera duodenal clásica suele manifestarse por una sensación de “quemadura o ardor” en el epigastrio que se presenta unas horas después de comer, en ocasiones suele despertar al paciente por las noches, el 80 % de los pacientes presenta este tipo de dolor vago con irradiación a la espalda y al resto del abdomen. También se acompaña de una sensación de hambre (Bourlon, 1997).

2.4 ETIOLOGÍA

Aunque en la actualidad no se conoce exactamente la etiología de la úlcera péptica, se acepta que su aparición proviene del desequilibrio entre los agentes irritativos locales y los mecanismos de protección de la mucosa gástrica (Alsasua, 2003; Falcao *et al.*, 2008). Entre los primeros destaca la propia secreción ácida, la secreción de enzimas proteolíticas (pepsina), la infección por *Helicobacter pylori*, y a ello se añade la existencia de productos químicos exógenos (el consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), la nicotina, el etanol, etc), así como también el estrés, entre otros factores (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2010). Entre los mecanismos protectores destaca la permanente secreción de moco y bicarbonato, junto a estos factores, la integridad de la mucosa queda asegurada por mecanismos de reparación del epitelio y por la vascularización, que proporciona los elementos metabólicos necesarios para asegurar una capacidad de resistencia frente a la agresión. Por último, es importante mencionar a mediadores como el óxido nítrico, las prostaglandinas PGE₂ y PGI₂ (Falcao *et al.*, 2008), los grupos sulfhidrido y las neuronas sensibles a capsaicina.

2.4.1 Factores nocivos para la mucosa gástrica

2.4.1.1 Hipersecreción de ácido

La secreción de ácido juega un papel muy importante en la patogenia de la úlcera gástrica, esta se incrementa cuando hay un aumento en el número de células parietales, por la alteración de los mecanismos estimuladores o inhibidores, hipersecreción de pepsina-pepsinógeno e hipersecreción ácida secundaria a la hipersecreción de pepsina (Bourlon, 1997).

2.4.1.2 Infección por *Helicobacter pylori*

El *H. pylori* es considerado el agente etiológico más importante en el desarrollo de la gastritis crónica tipo B y las úlceras pépticas, además de estar ligado al carcinoma gástrico. Una vez adquirida la infección, está permanece de por vida a menos que sea tratado con antimicrobianos (Castillo-Juárez *et al.*, 2009). *H. pylori* es capaz de sobrevivir en el ácido gástrico debido a la producción de NH₃, el cuál neutraliza los iones de hidrógeno, sin embargo, también causa daños funcionales y morfológicos en el epitelio gástrico (Ito *et al.*, 1998).

2.4.1.3 Consumo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos se utilizan frecuentemente en el tratamiento del dolor, inflamación, reumatismo y osteoartritis. Sin embargo, el mayor problema de su uso es el desarrollo de úlceras. Se estima que uno de cada tres pacientes que toman AINEs durante un periodo prolongado, desarrollan úlceras gástricas y duodenales. Lo cuál es debido a que inhiben de manera no selectiva a las enzimas encargadas de sintetizar las prostaglandinas (COX-1 y COX-2). Siendo la COX-1 la encargada de sintetizar las

prostaglandinas que están involucradas en el mantenimiento de la integridad de mucosa gástrica (Ma *et al.*, 1999; Rodríguez, 2006). Además, los AINEs promueven la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), que inducen la apoptosis de la mucosa gástrica, ya que dañan a los lípidos celulares, a las proteínas y al ADN a través del estrés oxidativo, también alteran la aconitasa mitocondrial, lo que conduce a la liberación del hierro, este hierro libre reacciona con el H₂O₂ produciendo radicales libres, lo que amplifica el estrés oxidativo (Pal *et al.*, 2010). Adicionalmente, los AINEs inducen la síntesis del factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), que junto con los leucotrienos estimulan la adhesión de neutrófilos, esto es muy importante en el daño a la mucosa gástrica, ya que la adhesión de neutrófilos afecta la mucosa gástrica liberando ROS, proteasas y obstruyendo los capilares sanguíneos (Pal *et al.*, 2010).

2.4.1.4 Fumar tabaco

Estudios epidemiológicos y experimentales han demostrado que el consumo de tabaco y las úlceras gástricas están estrechamente asociados (Deniz *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2002). El fumar tabaco aumenta la producción de ácido e incrementa el flujo duodenogástrico, disminuye la producción de prostaglandinas y bicarbonato, afecta la actividad de la sintasa del óxido nítrico, disminuye la proliferación de células epiteliales y la formación de vasos sanguíneos (Ma *et al.*, 1999; Rodríguez, 2006). La nicotina es el principal componente del humo del tabaco, es un alcaloide hidrosoluble que se absorbe rápidamente por el tracto respiratorio, gastrointestinal, piel y mucosas. Que altera la motilidad gástrica (Kohagen *et al.*, 1996) y el flujo sanguíneo, provocando el desarrollo de úlceras gástricas (Wong *et al.*, 2002).

2.4.1.5 Consumo de alcohol

El consumo de alcohol está asociado a una gran variedad de condiciones patológicas, entre estas, las enfermedades gastrointestinales (Glavin and Rockman, 1985). Estudios previos

han demostrado que el etanol produce daño a la mucosa gástrica a través de la formación de radicales libres y afectando los factores de defensa, tales como el moco y la circulación gástrica (Ineu *et al.*, 2008). Adicionalmente, el etanol puede producir contracción del músculo circular, lo cual puede llevar a la compresión de la mucosa y en consecuencia a la necrosis y la ulceración (Fulop *et al.*, 2005). El alcohol tiene la capacidad de modificar las características del moco gástrico, ya que inhibe la producción de prostaglandinas, interfiere con la producción de células epiteliales y aumenta la secreción de ácido (Lanza, 1984; Shorrock *et al.*, 1990).

2.4.1.6 Estrés

El estrés emocional y psicológico son factores frecuentemente identificados en la patogénesis de la úlcera péptica, sin embargo, la evidencia confiable de que el estrés por sí mismo sea la causa de la úlcera péptica, es escasa (Malfertheiner *et al.*, 2009).

2.5 MECANISMOS DE DEFENSA DE LA MUCOSA GÁSTRICA

Los factores de protección de la mucosa gástrica, se clasifican en tres factores, que son: factores funcionales, factores humorales y factores neuronales (Moraes *et al.*, 2009).

2.5.1 Factores funcionales

2.5.1.1 Barrera de moco-bicarbonato

La barrera moco-bicarbonato constituye la primera línea de defensa de la mucosa. Esta barrera está formada por gel de moco, bicarbonato y fosfolípidos surfactantes, que cubren la superficie de la mucosa. Esta capa retiene el bicarbonato (HCO_3^-), secretado por las células para mantener un microambiente neutro (pH 7.0) y evita la acción proteolítica de la pepsina (Laine *et al.*, 2008).

La barrera de moco-bicarbonato es solo la barrera pre-epitelial entre el lumen y el epitelio, cuando esta se daña por enfermedad la próxima serie de protección entra en juego, en ella se incluye la neutralización intracelular del ácido, el mantenimiento y la reparación rápida del epitelio y la distribución del flujo sanguíneo de la mucosa (Laine *et al.*, 2008).

2.5.1.2 Microcirculación

La microcirculación de la mucosa es esencial para la entrega de nutrientes y la remoción de sustancias tóxicas. La mayoría de las arterias gástricas se ramifica en capilares y las células endoteliales que recubren los microvasos generan poderosos vasodilatadores como el óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂), que protegen a la mucosas de las lesiones y se oponen a la acción perjudicial de los vasoconstrictores de la mucosa como leucotrieno C4 y tromboxano A2 (Laine *et al.*, 2008).

2.5.1.3 Motilidad

La relación que existe entre la motilidad, el vaciamiento gástrico y la formación de úlceras ha sido ampliamente estudiada. Por una parte, se menciona que la contracción del músculo circular produce compresión de la mucosa lo que genera necrosis y ulceración, y por otro lado la contracción favorece el vaciamiento gástrico disminuyendo el tiempo de exposición al agente ulcerogénico. El caso contrario se presenta con la relajación del músculo liso, que por un lado protege a la mucosa gástrica debido al aplanamiento de los pliegues del estómago evitando la compresión de la mucosa, pero a su vez se incrementa el tiempo de exposición a los agentes necrosantes (Fulop *et al.*, 2005).

2.5.2 Factores humorales

2.5.2.1 Prostaglandinas

Las prostaglandinas (PG) son sintetizadas a partir del ácido araquidónico (un fosfolípido de membrana) y están implicadas en una amplia variedad de funciones gastrointestinales (Takeuchi *et al.*, 1997). Además casi todos los mecanismos de defensa son estimulados o facilitados por ellas (Laine *et al.*, 2008), estos incluyen: la secreción glandular, citoprotección, motilidad y la angiogénesis. Debido a que las PG no se pueden almacenar, el estómago las produce de manera continua siendo la PGE2 la principal prostaglandina formada por el estómago humano (Sekiguchi *et al.*, 2007; Heeba *et al.*, 2009; McCready *et al.*, 1984; Laine *et al.*, 2008). De igual manera las prostaglandinas de la serie E y sus análogos sintéticos pueden inhibir la secreción de ácido, estimular la secreción de bicarbonato y mucosa, alterar el flujo sanguíneo y la motilidad, esta actividad citoprotectora ha sido demostrada en animales y humanos al proteger a la mucosa de una gran variedad de sustancias ulcerogénicas (McCready *et al.*, 1984).

2.5.2.2 Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO), está implicado en la secreción de ácido gástrico y en la modulación de la integridad de la mucosa gástrica, a través de la modulación de la circulación junto con las prostaglandinas endógenas (Laine *et al.*, 2008).

La distensión del estómago estimula la secreción de ácido, proceso que es modificado por el NO endógeno, que es liberado a través de la vía colinérgica, provocando un efecto negativo sobre la secreción ácida. De igual manera el NO actúa como transmisor de algunas vías no adrenérgicas no colinérgicas modulando la secreción de ácido a través del sistema guanilato ciclasa (GMPc). Así mismo el NO tiene un efecto opuesto en la secreción de pepsinógeno, debido a la activación de la vía del GMPc estimulado por el NO endógeno (Ito *et al.*, 2008).

2.5.3 Factores neuronales

La mucosa y submucosa gástrica están inervados por las neuronas aferentes primarias sensoriales que acompañan a los vasos capilares, estas terminaciones nerviosas pueden detectar el contenido luminal y/o la presencia de ácido en la mucosa a través de los canales de detección de ácido. La activación de estos nervios afecta directamente el tono de las arteriolas submucosas, que regulan el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica, la interferencia con cualquier aspecto de la inervación sensorial, como la abolición de los nervios aferentes sensoriales perjudica la respuesta hiperémica y por lo tanto disminuye la resistencia de la mucosa gástrica (Laine *et al.*, 2008).

Las neuronas sensibles a la capsaicina juegan un papel muy importante en la protección de la mucosa gástrica, ya que 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: la sustancia P, calcitonina, neurocinina y el péptido relacionado al gen de la calcitonina (PRGC), localizados dentro o cerca de los grandes vasos sanguíneos submucosos (Tarnawski, 2005; Tsukimi y Okabe, 2001). El PRGC ejerce una acción protectora de la mucosa, a través de la relajación de los vasos submucosos debido a la generación de óxido nítrico (Tarnawski, 2005), además de la estimulación de la secreción de moco y bicarbonato, que contribuyen a mantener la integridad de la mucosa gástrica (Moraes *et al.*, 2009).

2.5.4 Grupos sulfhidrilo

Los grupos sulfhidrilo endógenos son necesarios para la síntesis de prostanoïdes y la consecuente activación de sus receptores, además son responsables de la defensa de la mucosa gástrica ya que influyen en la permeabilidad de la membrana y en la captura de radicales libres (Szabo *et al.*, 1981; Shorrrock y Rees, 1988; Maity *et al.*, 1998). En el tracto gastrointestinal los grupos sulfhidrilo desempeñan múltiples funciones durante el proceso de inflamación y ulceración (Yonezawa *et al.*, 2007; Wallace, 2007), su

mecanismo de protección también implica un aumento en el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica debido a la vasorelajación mediada por los canales K^+_{ATP} (Yonezawa *et al.*, 2007), e inhibición de la expresión del factor de necrosis tumoral. Además inhibe la lesiones gástricas inducida por AINEs (Laine *et al.*, 2008; Wallace, 2007).

Estudios previos realizados con donadores de H_2S como NaHS han demostrado que permiten la regeneración del tejido dañado, además que evitan el daño inducido por etanol de manera dosis dependiente y protegen al estómago del estrés oxidativo (Yonezawa *et al.*, 2007; Chávez-Piña *et al.*, 2010).

2.6 FÁRMACOS EMPLEADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA ÚLCERA GÁSTRICA

El enfoque moderno para el tratamiento de la úlcera gástrica consiste en inhibir la secreción ácida del estómago y promover la gastroprotección (Jauni and Shyamala, 2006). Con base en su acción terapéutica los fármacos utilizados en el tratamiento de la úlcera gástrica se clasifican en: antiácidos, antisecretores o citoprotectores (Hoogerwerf *et al.*, 2001).

2.6.1 Antiácidos

Los antiácidos son un grupo de compuestos útiles como tratamiento inicial para controlar el dolor y ardor estomacal. Su efecto es a través neutralizar el ácido que se encuentra en el estómago sin interferir en los procesos de secreción (Bourlon, 1997) y se pueden clasificar como absorbibles y no absorbibles.

Los antiácidos absorbibles utilizados con mayor frecuencia son el $NaHCO_3$ y el $CaCO_3$, sin embargo, pueden producir hipernatremia, pérdida de CO_2 , alcalinización de la orina y predispone a litiasis renal fosfática, 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).

Los antiácidos no absorbibles son sales inorgánicas que además de neutralizar parcialmente el ácido clorhídrico estomacal, inhiben la proteólisis originada por la pepsina. Este tipo de fármacos lo constituyen principalmente sales de aluminio y magnesio, (Hoogerwerf *et al.*, 2001), los principales problemas 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 (Flórez y Espulgues, 1992)

2.6.2 Supresores de la secreción gástrica

Los mecanismos fisiológicos que regulan la secreción ácida son la base terapéutica de los trastornos ácido-pépticos, en la figura 1 se muestran dichos mecanismos de regulación fisiológica y farmacológica de la secreción ácida (Brunton y Parker, 2009).

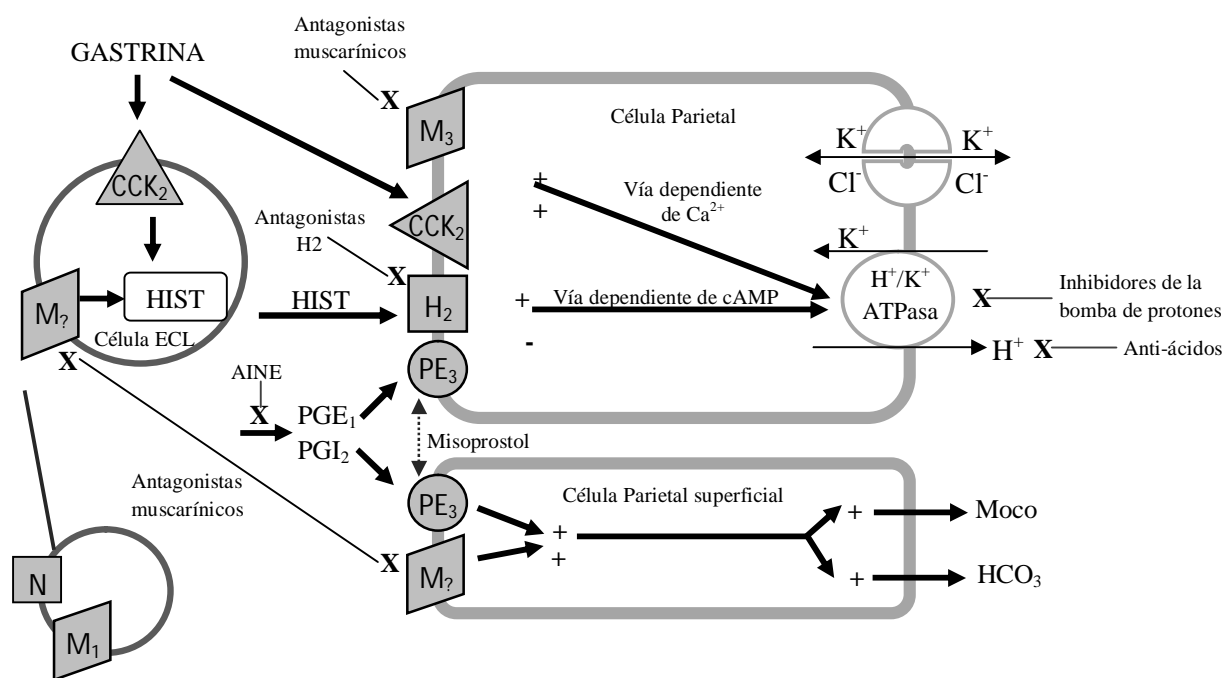


Figura 1: Regulación fisiológica y farmacológica de la secreción gástrica. Las vías fisiológicas se muestran con líneas negras sólidas, las cuales pueden inhibirse o estimularse, las líneas más claras representan la acción de los fármacos (Brunton y Parker, 2009).

2.6.2.1 Antagonistas de los receptores de histamina tipo H₂

Estos fueron los primeros medicamentos eficaces para el tratamiento de la enfermedad ácido-péptica. Los antagonistas de los receptores H₂ inhiben la secreción de ácido compitiendo de manera reversible con la histamina por su unión a los receptores H₂ en la membrana basolateral de las células parietales (Brunton y Parker, 2009).

En el mercado existen cuatro antagonistas de los receptores H₂: cimetidina, ranitidina, famotidina y nizatidina. La cimetidina es uno de los más potentes antagonistas de los receptores tipo H₂, que inhibe la secreción de ácido y se utiliza en todo el mundo para tratar las úlceras gástricas (Brunton y Parker, 2009). Además se ha reportado que reduce la generación de anión superóxido, demostrando que la cimetidina tiene propiedades antioxidantes (Ineu *et al.*, 2008).

2.6.2.2 Antagonistas de los receptores muscarínicos

Este grupo de fármacos inhibe la secreción gástrica estimulada por acetilcolina, y dentro de sus efectos secundarios se encuentran la resequedad en la boca, visión borrosa, estreñimiento y midriasis (Bays y Finch, 1990).

2.6.2.3 Antagonistas de la gastrina

Una gran variedad de sustancias, como los derivados del ácido glutarámico, análogos del triptófano y las benzodiazepinas, funcionan como antagonistas de la gastrina. Todos estos compuestos inhiben la interacción de la gastrina con su receptor en mayor o menor grado, sin embargo, no tienen aplicación clínica, solo representan una posibilidad teórica sin que se haya demostrado su utilidad (Flórez y Espulgues, 1999).

2.6.2.4 Inhibidores de la bomba de protones

Los inhibidores de la bomba de protones son profármacos que requieren activarse en un ambiente ácido. Luego de la absorción, el profármaco se difunde a las células parietales del estómago y se acumula en los canalículos secretores de ácido donde es activado para la formación de una sulfenamida tetracíclica, atrapando al fármaco de tal manera que no puede retrodifundirse a través de la membrana canicular. A continuación, la forma activada se une de manera covalente con los grupos sulfhidrilo de cisteínas en la H^+ , K^+ -ATPasa, inactivando de manera irreversible a la bomba. La secreción de ácido solo se reanuda al sintetizarse e insertarse nuevas moléculas en la membrana luminal (Brunton y Parker, 2009). Ejemplo de este tipo de fármacos son la serie de omeprazoles.

2.6.3 Fármacos citoprotectores

2.6.3.1 Sucralfato

Los polisacáridos sulfatados como el sucralfato (un octasulfato de sacarosa con adición de $Al(OH)_3$), actúa formando un polímero viscoso, que se adhiere a las células epiteliales y a los cráteres de las úlceras hasta por 6 horas, (Brunton y Parker, 2009) además de inhibir la hidrólisis de las proteínas de la mucosa, otros efectos citoprotectores incluyen la estimulación de la producción local de prostaglandinas y del factor de crecimiento epidérmico (Bourlon, 1997; Brunton y Parker, 2009).

2.6.3.2 Carbenoxolona

La carbenoxolona sódica es un derivado sintético del ácido glicirrónico obtenido de la raíz de regaliz, que ha sido extensamente estudiada y se ha reportado su efecto anti-úlceroso en animales y humanos, la acción de este fármaco incluye un incremento de la vida del epitelio gástrico, inhibición de la actividad péptica, estimulación de la secreción de moco y HCO_3^- ,

inhibición de la difusión de ácido o un incremento en la producción de prostaglandinas (Takeuchi *et al.*, 1998).

2.6.3.3 Análogos de las prostaglandinas

Debido a que los AINEs disminuyen la síntesis de prostaglandinas inhibiendo a las ciclooxigenasas, los análogos sintéticos de las prostaglandinas ofrecen un método lógico para reducir el daño a la mucosa producido por los AINEs (Brunton y Parker, 2009). Dentro de este grupo se encuentra el misoprostol que es un análogo sintético de las prostaglandina E2, el cuál actúa como potente antisecretores y citoprotector (Watkinson and Akbar, 1987).

2.6.3.4 Sales de bismuto

Son tan efectivas 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 sino que inhiben a la pepsina, aumentan la secreción de moco e interactúan con proteínas y forman una barrera contra la difusión de ácido. Los coloides de bismuto también producen el desprendimiento de *Helicobacter pylori* del epitelio gástrico, con lo que consiguen la eliminación de la bacteria (Brunton, 1996; Alvarado *et al.*, 2007).

2.6.4 Meciadanol

El meciadanol es un polifenol derivado del grupo químico de las flavonas y en estudios *in-vitro* se ha demostrado que inhibe la enzima histidina descarboxilasa en las células gástricas por lo que reduce la síntesis de histamina (Jayarg *et al.*, 1988).

2.6.5 Sulglicotido

El sulglicotido es un glicopéptido (cadena corta de aminoácidos con moléculas de azúcar adheridas) en forma de sal de sodio. Cubre la mucosa y su acción citoprotectora parece estar relacionada con el aumento de la expresión de la sintasa del óxido nítrico e interviene en el mecanismo de la apoptosis de las células epiteliales (Bruntom, 1996; Alvarado *et al.*, 2007).

2.6.6 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 los alginatos, deriva de 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 (De Vincentis *et al.*, 1991).

2.7 METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIULCEROSA

2.7.1 Triterpenoides

Los triterpenos pertenecen a un grupo de productos naturales conocidos como terpenoides, que son derivados del isopreno, la mayoría de los terpenos son metabolitos secundarios de plantas y se clasifican en cíclicos, acíclicos y por su número de carbonos, de este modo los de 30 carbonos son llamados triterpenos (Jiménez-Estrada *et al.*, 2006).

Entre los triterpenoides aislados con actividad anti-ulcerosa se encuentra el ácido oleanólico, el cual ha sido evaluado en modelos de inducción de lesiones por indometacina y aspirina, por lo que es probable que promueva la síntesis de prostaglandinas. Otros

ejemplos de triterpenos con actividad gastroprotectora son el β -sitoesterol, β -lupeol, el tarexerol y el ácido ursólico (Borrelli e Izzo, 2000).

2.7.2 Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de tipo fenilpropano que se encuentran generalmente como O-glicósidos en sus fuentes naturales. Poseen una unidad básica de esqueleto de 15 carbonos, la mayoría de los flavonoides se representan como moléculas de tipo C₆-C₃-C₆, con dos anillos aromáticos y un heterociclo con oxígeno (Céspedes y Salazar, 2006).

La acción gastroprotectora de los flavonoides naturales posiblemente es mediada por la estimulación del moco y bicarbonato o por inhibición directa de la bomba de protones en las células parietales, uno de los flavonoides aislados de las babanas es la leucocianidina, la cual muestra un efecto gastroprotector (Lewis and Shaw, 2001).

Otros de los flavonoides anti-ulcerosos que han sido estudiados son: quercetina, naringina, similarina, antocianósidos y derivados de la sofradina y epi-catequina (Borrelli e Izzo, 2000).

2.7.3 Gomas y mucílagos

Las gomas y los mucílagos son polisacáridos heterogéneos y en general llevan ácidos urónicos. Dentro de las propiedades que poseen estos compuestos están la de absorber agua formando sustancias viscosas o geles, debido a esta característica son capaces de cubrir y proteger la mucosa gástrica, algunos ejemplos de plantas que contienen mucílagos son *Althaea officinalis*, *Cetraria islándica*, *Malva silvestres*, *Matricaria chamonilla* y distintas especies de aloe (Borrelli e Izzo, 2000).

2.7.4 Saponinas

Las saponinas son glucósidos de esteroides o triterpenoides, comunes en un gran número de especies de plantas, esta clase de metabolitos secundarios muestra una notable actividad biológica, tienen propiedades inmunoestimulantes, hipocolesterolémicos y anticancerígenos, además son empleados como antifúngicos y antivirales (Cammareri *et al.*, 2008). Algunas saponinas con actividad gastroprotectora han sido aisladas de *Calendula officinalis*, *Calliandra portoricencis*, *Glycyrrhiza glabra*, *Panas japonicum* y *Kochia scoparia*, la actividad de estas no está relacionada con la inhibición de la secreción gástrica, y probablemente se deba a la activación de factores de defensa (Borrelli e Izzo, 2000).

2.7.5 Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos no nitrogenados, solubles en agua e insolubles en alcohol o solventes orgánicos. Su clasificación se basa en su ruta de biosíntesis y sus propiedades químicas, de este modo se tienen: taninos condensados y taninos hidrolizables. Su actividad farmacológica como anti-ulcerogénicos se debe a su capacidad astringente, los taninos modifican la capa exterior de la mucosa, la hacen menos permeable y más resistente al daño por agentes químicos o mecánicos. Sin embargo, solamente aplicando dosis bajas se obtienen estos efectos, las dosis elevadas de taninos sobre la mucosa gástrica provoca la coagulación de las proteínas en las capas más profundas, lo que da como resultado inflamación, diarrea y vómito (Borrelli e Izzo, 2000).

2.7.6 Alcaloides

Los alcaloides verdaderos son compuestos sintetizados de un aminoácido, por lo tanto son compuestos nitrogenados. Poseen actividad farmacológica como psicoactivos, por lo que su principal uso es para el tratamiento de enfermedades mentales y como analgésicos. Sin embargo algunos alcaloides como la escopolamina, anisodina y anisodinina son efectivos

agentes antiulcerogénicos, dichos compuestos inhiben de la secreción de ácido gástrico y la actividad de la pepsina (Zhang *et al.*, 1990). Otros alcaloides con actividad antiulcerosa son la matrina y oximatrina, los cuales fueron aislados de *Sophora soprostrata*, estos inhiben la secreción gástrica y la formación de úlceras en ratas (Yamasaki, 1983).

2.7.7 Aceites

Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias (terpenoides volátiles, aldehídos, fenoles, óxidos, cetonas y alcoholes) que le dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias y semillas. El aceite de *Hyptis mutabilis* Briq posee un efecto gastroprotector en lesiones inducidas por indometacina en ratas (Barbosa and Ramos, 1992) y la emulsión del aceite de las semillas de *Brucea javanica* inhibe las lesiones gástricas inducidas por ligación pilórica, aspirina, estrés y la úlcera crónica inducida por ácido acético en ratas (Xue *et al.*, 1996).

2.8 PLANTAS EMPLEADAS EN EL TRATAMIENTO DE LA ÚLCERA GÁSTRICA EN MÉXICO

En años recientes ha aumentado el interés por las terapias alternativas y el uso de productos naturales, especialmente de las plantas para el tratamiento de la úlcera gástrica. Muchas sustancias presentes en las plantas tienen efecto gastroprotector, por lo que las plantas resultan una fuente potencial en la búsqueda de nuevos fármacos (Vasconcelos *et al.*, 2010). 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*, *Croton reflexifolius* y *Eupatorium ascherbornianum*.

2.8.1 *Hippocratea excelsa*

H. excelsa de la familia de Celastraceae es una especie con propiedades médicas e insecticidas. Es conocida en Yucatán con los nombres Mayas de: “chumloop”, “salbe ets”, “sak boób” y “xooknom”. La raíz es conocida comúnmente como “cancerina” y “mata piojo” en la parte central y sur de México. También es usada como agente antiinflamatorio y cicatrizante, contra la disentería, gastritis y úlceras gástricas (Cáceres-Castillo *et al.*, 2008). En un estudio previo se reporta que los extractos metanólico y acuoso de esta planta reduce significativamente el índice de úlcera en lesiones inducidas por varias sustancias ulcerogénicas (Navarrete *et al.*, 2002).

2.8.2 *Amphiterygium adstringens*

A. adstringens es una planta que pertenece a la familia Julianiaceae. Es un género Americano que se encuentra desde México hasta Perú, es conocida con el nombre de cuachalalate, quechalalatl o cuachalala. En la medicina tradicional se le han atribuido varias propiedades curativas, como cicatrización, como antibiótico, para disolver cálculos biliares y renales, eliminar colitis y fiebre, agente hipocolesterolémico, antimalaria, antiinflamatorio, para cáncer digestivo y úlceras gástricas (Olivera *et al.*, 1999).

A partir de la corteza de *A. adstringens* se han aislado e identificado varios triterpenos, con actividad gastroprotectora como el ácido 3 α -hidroximasticadienoico, el 3-epi-oleanoico y el β -sitoesterol (Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

2.8.3 *Croton reflexifolius*

El género *Croton* pertenece a la familia Euphorbiaceae, son árboles o arbustos y en la región de la Huasteca Hidalguense son conocidos con el nombre de “huilocuahuitl”. Las hojas de *C. reflexifolius* son utilizadas para el tratamiento de la tos, diabetes y úlcera gástrica. Del extracto hexánico de *C. reflexifolius* se ha aislado el ácido poliáltico, un

diterpenoide con actividad gastroprotectora en cuyo mecanismo de acción están implicados el óxido nítrico y los grupos sulfhidrilos (Reyes *et al.*, 2008).

2.8.4 *Eupatorium ascherbornianum*

Otra planta utilizada en el tratamiento de la úlcera gástrica es *E. ascherbonianum*, conocida como Axihuitl y es empleada en la medicina tradicional del estado de Morelos (Reyes *et al.*, 2003). Se ha demostrado la actividad antimicrobiana y antifúngica para esta planta (Rios *et al.*, 1982), así mismo se han aislado compuestos como el sitoesterol-3-0- β -glucosido, β -sitiesterol y epicatequina, los cuales muestran la mayor actividad gastroprotectora (Navarrete *et al.*, 2002).

2.8.5 *Tithonia diversifolia*

Tithonia diversifolia pertenece a la familia Asteraceae, y es conocida con el nombre de girasol mexicano, se cultiva como flor ornamental y se utiliza en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes y dolores de estómago, garganta e hígado. Se ha demostrado que *T. diversifolia* posee compuestos bioactivos con efectos anti-inflamatorios, antidiarreicos, antiamebianos y antiespasmódicos (Owoyele *et al.* 2004). Adicionalmente en la medicina tradicional mexicana se utiliza para el tratamiento de úlceras gástricas.

III PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En México las úlceras gástricas son la cuarta causa de morbilidad y el número de pacientes se ha incrementado en los últimos años (SSA, 2005), debido a que existen múltiples factores que condicionan su desarrollo, entre ellos está el consumo de AINEs, alcohol, tabaco y el estrés. La úlcera gástrica es causada por un desequilibrio entre factores agresivos, y los factores de defensa de la mucosa gástrica, ya que a pesar de los avances que se han logrado en su tratamiento, no se cuenta con medicamentos que cubran las expectativas del fármaco ideal, esto es, que alivie el dolor, cure la úlcera y retrase el periodo de recurrencia del padecimiento con mínimos efectos adversos (Hoogerwerf y Pasricha, 2001). En años recientes se ha incrementado el interés en los productos naturales como fuente de búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la úlcera gástrica, especialmente en las plantas (Vasconcelos *et al.*, 2010). Una de ellas es *Tithonia diversifolia* la cuál es utilizada en la medicina tradicional mexicana de manera empírica para el tratamiento del dolor estomacal, indigestión, dolor en el hígado y úlceras gástricas (Owoyele *et al.* 2004). En un estudio previo de *T. diversifolia* se demostró que presenta actividad contra *Helicobacter pylori* (Castillo-Juárez *et al.* 2009), el cuál es un factor relacionado con la úlcera gástrica, a pesar del uso tradicional para el tratamiento de la úlcera gástrica no existe ningún estudio que avale este uso terapéutico, por lo que considerando lo anterior, el presente trabajo fue encaminado a evaluar el efecto gastroprotector de *T. diversifolia* a través del modelo de lesión gástrica inducida por etanol en rata Wistar.

IV HIPÓTESIS

Debido al uso tradicional que se le da a *Tithonia diversifolia* para tratar la úlcera gástrica, se espera que presente efecto gastroprotector en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas Wistar.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad gastroprotectora de *Tithonia diversifolia* a través de un estudio biodirigido.

5.2 Objetivos específicos

- 1.- Aislar e identificar el o los compuestos responsables de la actividad gastroprotectora de *Tithonia diversifolia*.
- 2.- Determinar el grado de participación de las prostaglandinas, el óxido nítrico y de los grupos sulfhidrido, del o los compuestos que resulten activos.

VI MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Material vegetal

La planta *Tithonia diversifolia* fue recolectada en el poblado de Suchiapa, en el Estado de Chiapas, México, durante el mes de Agosto del 2009. La planta fue identificada por Francisco Hernández Najarro del departamento de Flora del Herbario de Chiapas, que es parte del jardín botánico dependiente de la Secretaria de Protección del Medio Ambiente, Vivienda e Historia Natural del Estado de Chiapas. Un espécimen de la colecta original puede ser encontrado con el número de registro 42974.

6.2 Preparación de los extractos de *Tithonia diversifolia*

Las hojas de *T. diversifolia* fueron secadas a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) bajo la sombra y posteriormente molidas. 3 kg de las hojas molidas se colocaron dentro de un recipiente de vidrio al cuál se le adicionaron 15 L hexano, dicho disolvente permaneció en contacto con el material vegetal durante un periodo de tres días a temperatura ambiente, al tercer día se filtró y se elimino el disolvente, utilizando un rotaevaporador. Esta operación se repitió dos veces más, para obtener el extracto hexánico. A continuación el residuo vegetal se trató de la misma forma con diclorometano (15 L) y posteriormente con metanol (15 L), para obtener los extractos de diclorometano y de metanol (diagrama 1), respectivamente (Reyes *et al.*, 2008).

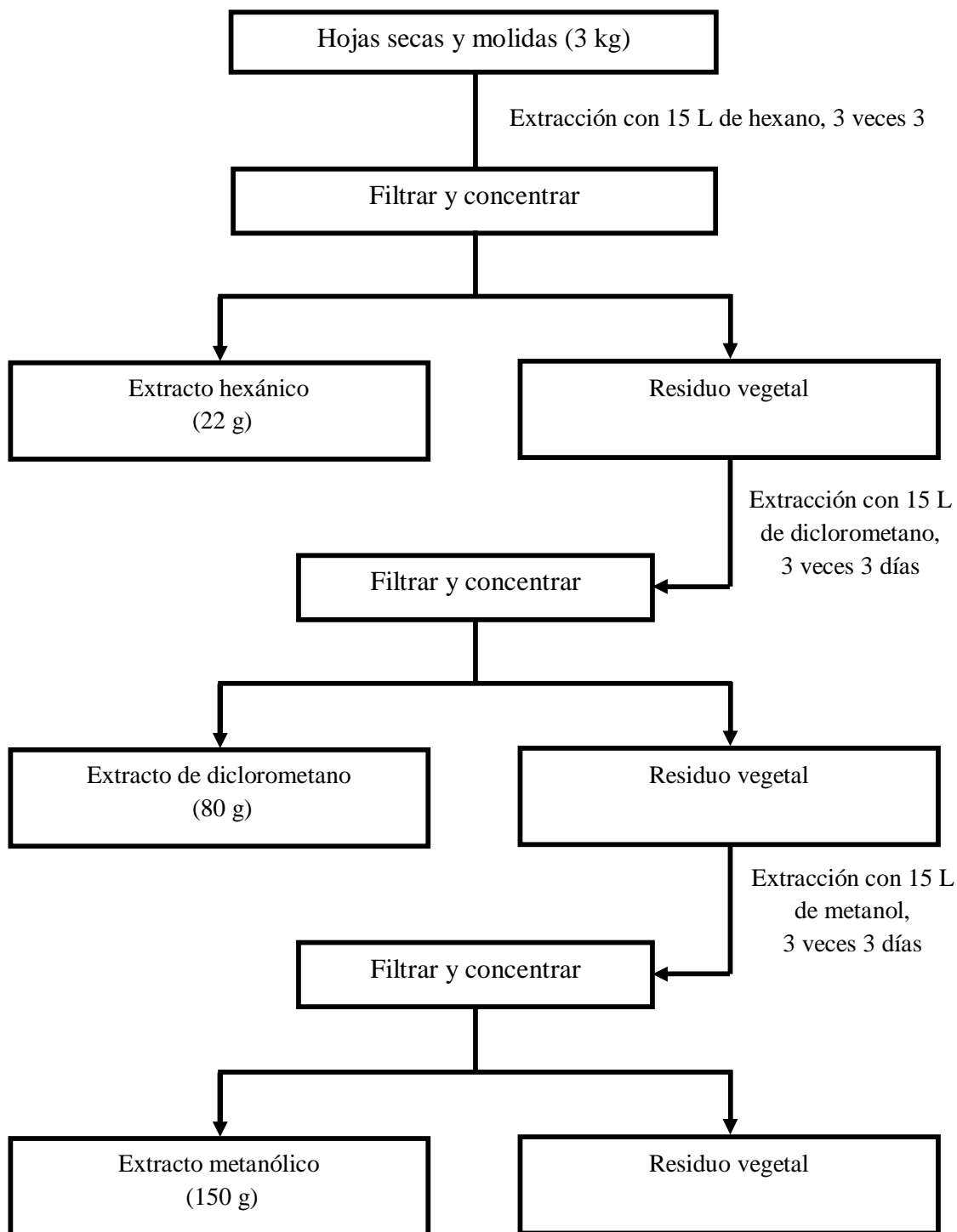


Diagrama 1: Preparación de los extractos de *Tithonia diversifolia*.

6.3 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de diclorometano

70 g del extracto de diclorometano se sometieron a una separación por cromatografía en columna (CC), empacada con sílica gel (500 g) y empleando cambios de polaridad del eluyente, lo cual permitió la obtención de 5 fracciones: F1 (hexano/acetato 9:1; 1.5 L); F2 (hexano/acetato 7:3; 1.5 L); F3 (hexano/acetato 1:1; 1.5 L); F4 (acetato 100%; 1.5 L) y F5 (metanol 100%; 1.5 L). La actividad gastroprotectora de las fracciones obtenidas, fue evaluada por medio del modelo de lesión gástrica inducida por etanol.

Posteriormente 6.4 g de la F2 fueron sometidos a CC, utilizando como eluyentes: hexano y mezclas de hexano:acetato de etilo. En este procedimiento se obtuvieron 24 fracciones (F1' - F24'), las cuales fueron nueve evaluadas por el modelo de lesión gástrica. De la fracción F8' (Hexano/Acetato 7:3) se aisló e identificó por sus características espectroscópicas, a la tagitinina C (figura 2), como el principal compuesto con actividad gastroprotectora (diagrama 2).

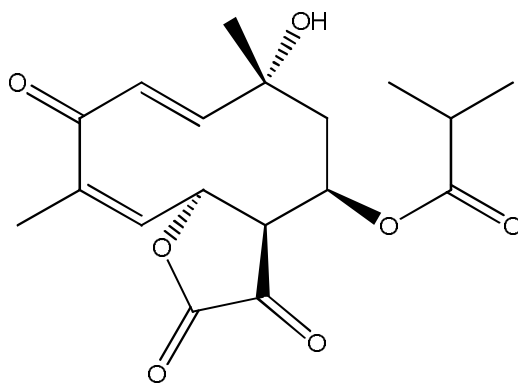


Figura 2: Estructura de la tagitinina C (Baruah *et al.*, 1979).

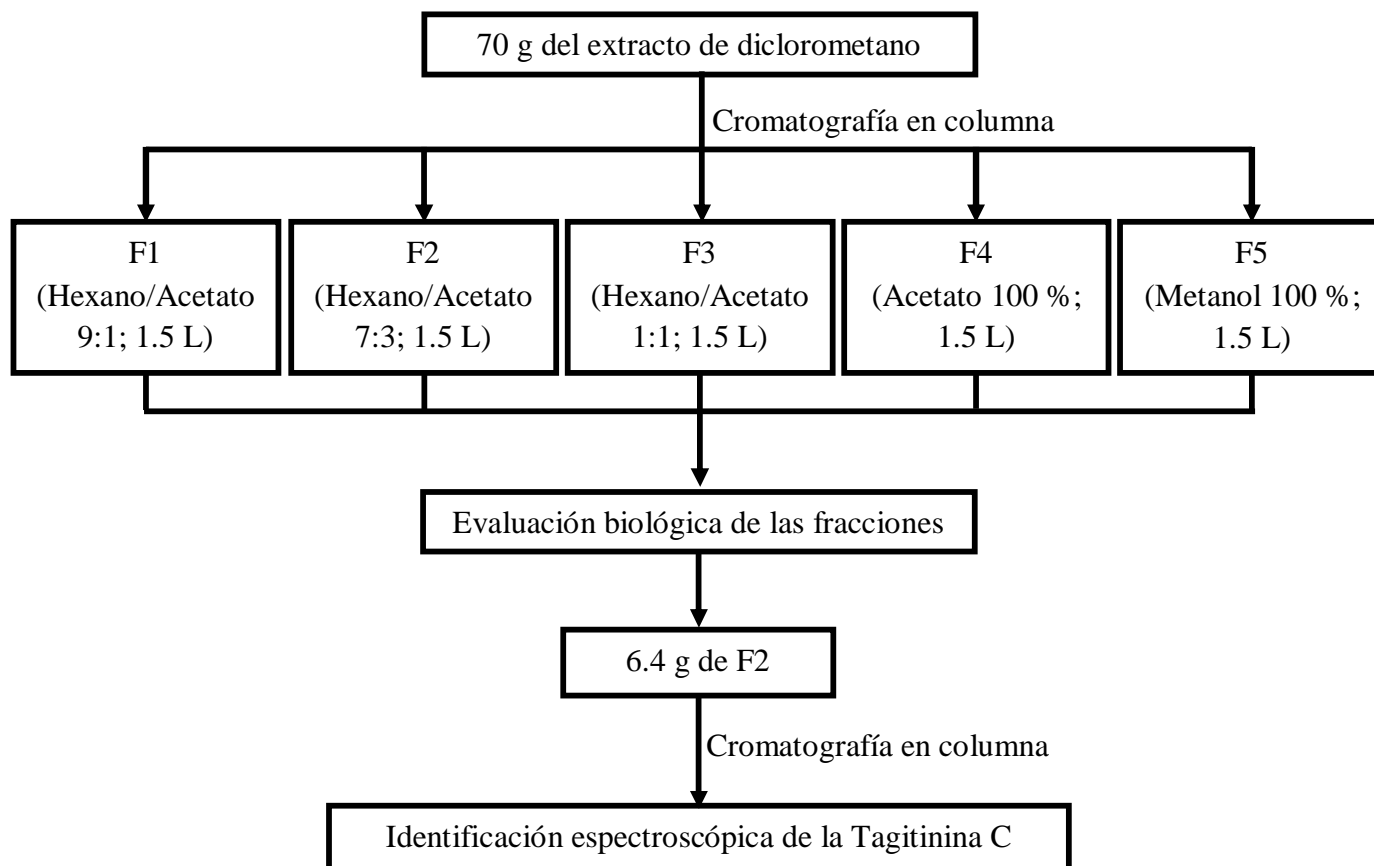


Diagrama 2: Fraccionamiento biodirigido de *Tithonia diversifolia*.

6.4 Material biológico

Para el presente trabajo se utilizaron ratas Wistar con un peso entre 180-220 g las cuales fueron proporcionadas por 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 el 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 horas antes de los experimentos, pero tuvieron libre acceso al agua (Reyes *et al.*, 2008).

6.5 Fármacos

La indometacina, el éster metílico de N^G -nitro-L-arginina (L-NAME, 98% de pureza), la N-etilmaleimida (NEM, 98% de pureza) y la carbenoxolona (95% pureza) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. Los fármacos y los extractos administrados por vía intragástrica, se suspendidos en Tween 80 al 5%. Para la administración por vía intraperitoneal o subcutánea se disolvieron en solución salina estéril al 0.9% y en el caso de la indometacina, está se suspendió en solución salina al 0.9% y bicarbonato de sodio al 5%. Los extractos, fracciones y fármacos fueron preparados minutos antes de realizar los experimentos y se administraron por la vía indicada para cada fármaco. La carbenoxolona se utilizó como fármaco de referencia (Wan y Gottfried, 1985). Las ratas control recibieron únicamente el vehículo correspondiente en el mismo volumen (0.5 mL/100 g para administración intragástrica ó 0.1 mL/ 100 g por subcutánea e intraperitoneal) y por la misma vía de administración que el compuesto o fármaco evaluado (Reyes *et al.*, 2008).

6.6 Evaluación del efecto gastroprotector de los extractos, fracciones de *T. diversifolia* y/o tagitinina C

Para evaluar la actividad gastroprotectora, las lesiones gástricas fueron inducidas por la administración intragástrica de etanol absoluto. Para ello, en primer lugar se administraron por vía oral los extractos (dosis de 10, 30 y 100 mg/kg), las fracciones (30 mg/kg), la carbenoxolona (3-100 mg/kg) o el vehículo (conforme a el experimento correspondiente), 30 minutos después se administró etanol absoluto (1 mL/rata, p.o.), y 2 horas después los animales se sacrificaron en cámara de CO₂, de forma inmediata se realizó la disección de los estómagos, llenándose con formaldehído al 2% durante 5 minutos para lograr la fijación de la capa interna del estómago, terminado este periodo, se procedió a abrir los estómagos por la curvatura mayor (diagrama 3).

El área dañada (mm²) se determinó por medio de un microscopio estereoscópico provisto de una rejilla métrica, y el índice de úlcera se calculó como el área total de las lesiones de

Actividad gastroprotectora de *Tithonia diversifolia* utilizando el modelo de lesiones inducidas por etanol en rata Wistar

cada estómago. El porcentaje de gastroprotección se determinó por medio de la siguiente ecuación (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2010):

$$\% \text{ Gastroprotección} = \frac{(UIC - UIT)}{UIC} \times 100$$

Donde:

UIC: índice de úlcera del grupo control.

UIT: índice de úlcera del grupo tratado.

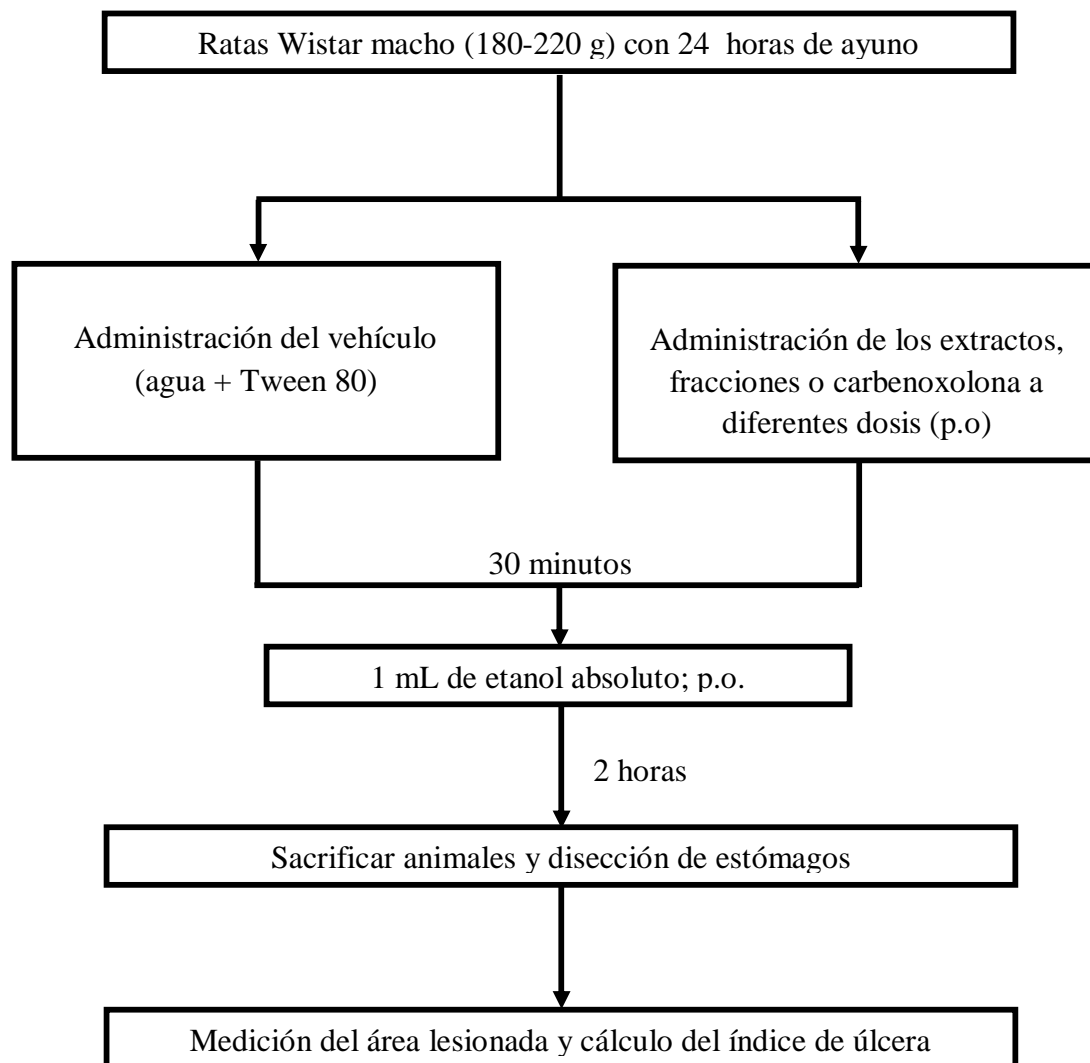


Diagrama 3: Evaluación de la actividad gastroprotectora.

6.7 Evaluación de la participación de óxido nítrico en el efecto gastroprotector de tagitinina C

Para determinar la participación del óxido nítrico endógeno en la gastroprotección producida por tagitinina C se administró L-NAME (70 mg/kg, disuelto en solución salina 0.9%) intraperitonealmente (i.p.) treinta minutos después se administró por vía oral la tagitinina C (30 mg/kg) o la carbenoxolona (100 mg/kg) al grupo correspondiente. Transcurridos treinta minutos se administró etanol absoluto (1 mL/rata, p.o.), y 2 horas después los animales se sacrificaron para determinar el índice de úlcera. Para este experimento se incluyeron dos grupos control. El primero recibió únicamente los vehículos más etanol y al segundo se le administró L-NAME y etanol como se muestra en el diagrama 4 (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2010).

Actividad gastroprotectora de *Tithonia diversifolia* utilizando el modelo de lesiones inducidas por etanol en rata Wistar

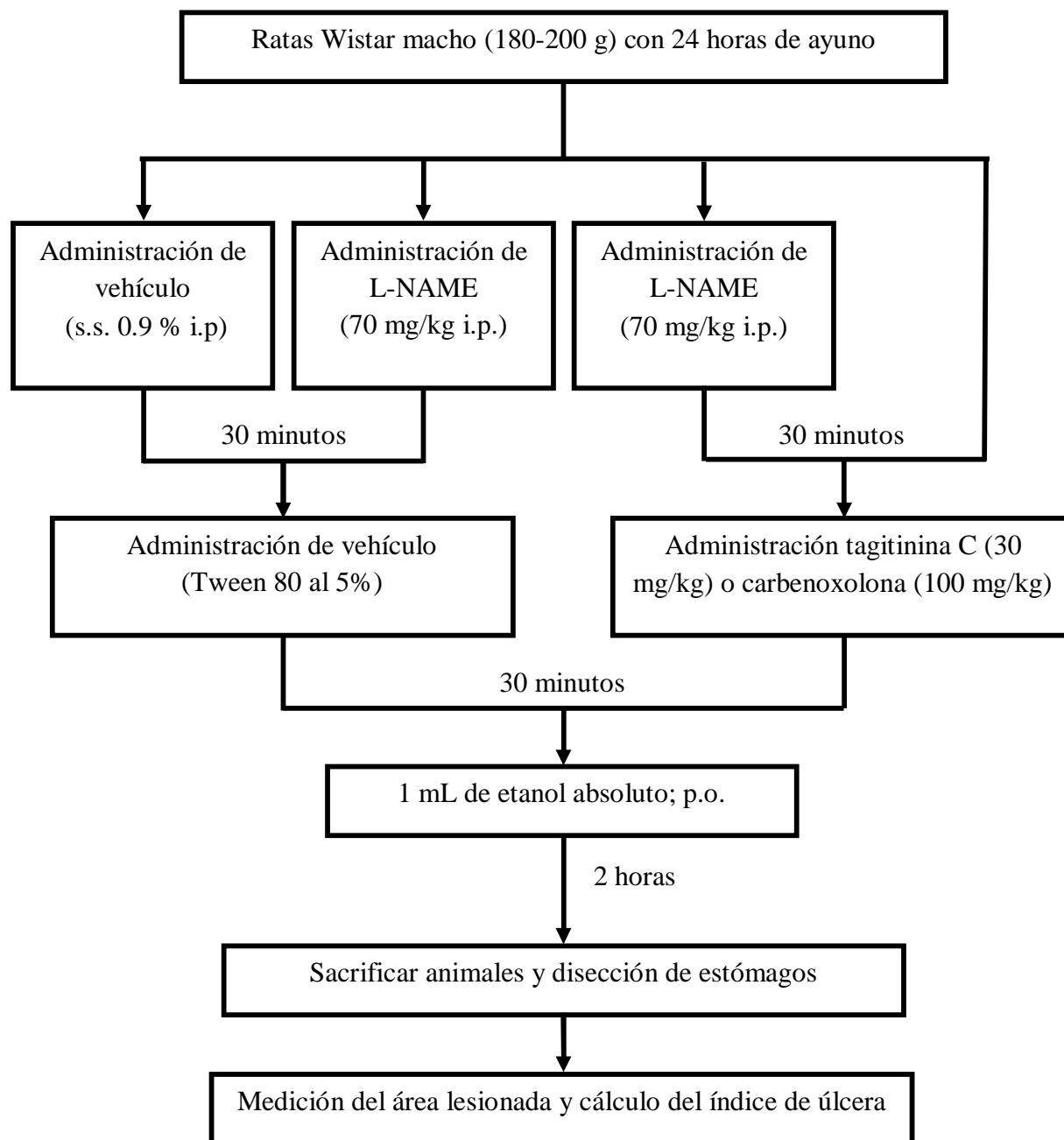


Diagrama 4: Evaluación de la participación del óxido nítrico en el efecto gastroprotector de tagitinin C.

6.8 Evaluación de la participación de las prostaglandinas en el efecto gastroprotector de tagitinina C

Para demostrar la participación de las prostaglandinas endógenas en la gastroprotección producida por tagitinina C, 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 el compuesto a evaluar o la carbenoxolona, al grupo correspondiente, suspendidos en una solución de Tween 80. Treinta minutos después se administró etanol absoluto (1 mL/rata, p.o.), 2 horas después los animales se sacrificaron y se determinó el índice de úlcera. Para este experimento se incluyeron dos grupos control. El primero (control de vehículos) recibió únicamente los vehículos más etanol y al segundo grupo (control de indometacina) se le administró indometacina más etanol como se muestra en el diagrama 5 (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2010).

6.9 Evaluación de la participación de grupos sulfhidrilo en el efecto gastroprotector de tagitinina C

Para determinar la participación de los grupos sulfhidrilos en la gastroprotección producida por tagitinina C se administró NEM (10 mg/kg, disuelto en solución salina 0.9%) intraperitonealmente (i.p.) treinta minutos después se administró por vía oral el compuesto a evaluar o la carbenoxolona al grupo correspondiente, suspendidos en una solución de Tween 80. Treinta minutos después se administró etanol absoluto (1 mL/rata, p.o.), 2 horas después los animales se sacrificaron y se determinó el índice de úlcera. Para este experimento se incluyeron dos grupos control. El primero ingirió únicamente los vehículos más etanol y al segundo grupo se le administró NEM y etanol como se muestra en el diagrama 6 (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2010).

Actividad gastroprotectora de *Tithonia diversifolia* utilizando el modelo de lesiones inducidas por etanol en rata Wistar

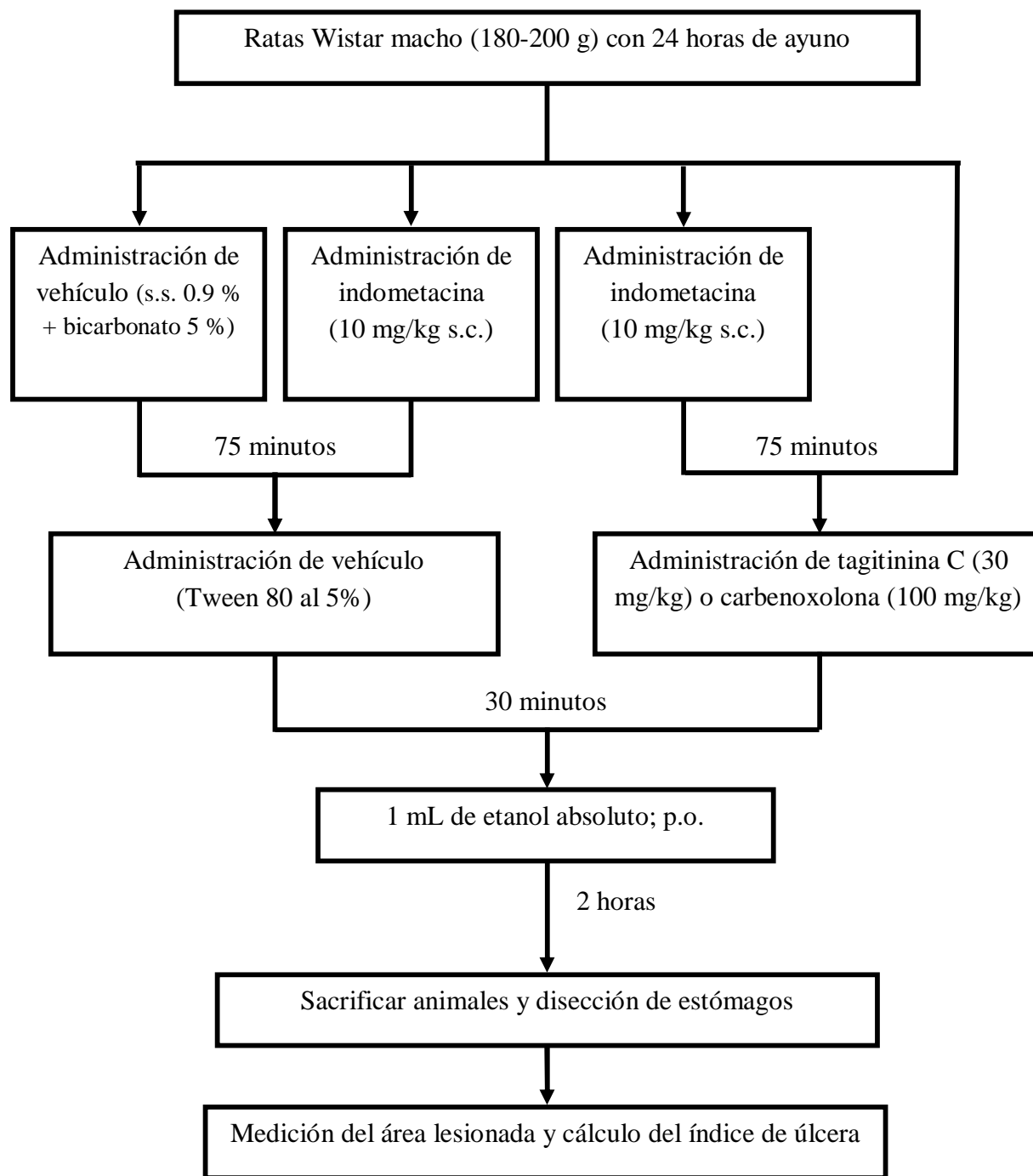


Diagrama 5: Evaluación de la participación de las prostaglandinas en la gastroprotección de tagitinin C.

Actividad gastroprotectora de *Tithonia diversifolia* utilizando el modelo de lesiones inducidas por etanol en rata Wistar

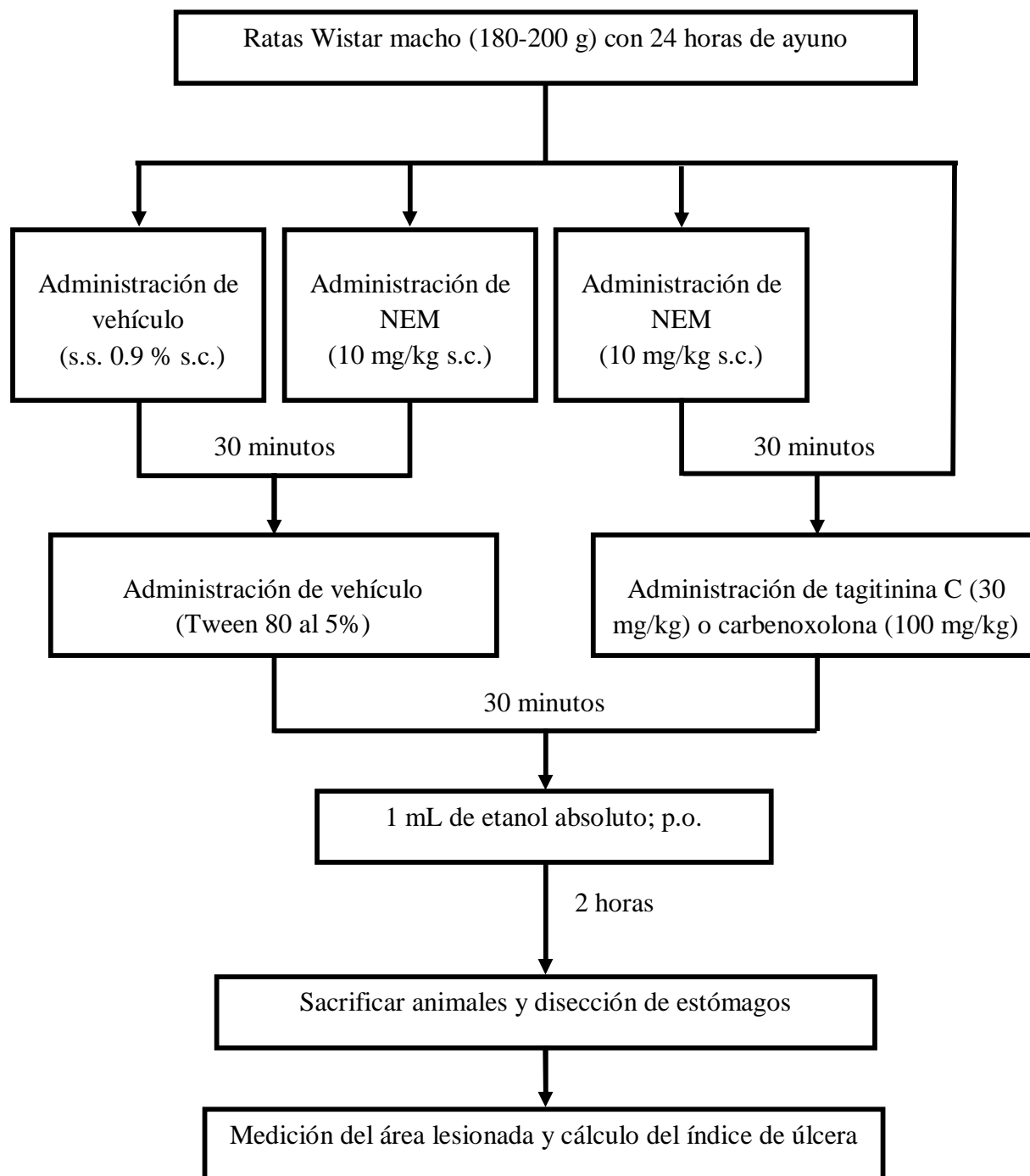


Diagrama 6: Evaluación de la participación de los grupos sulfhidrilos en la gastroprotección de tagitinina C.

5.10 Estadística

Los resultados se presentan como la media \pm E.E.M. (error estándar de la media) 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 (Reyes *et al.*, 2008).

5.11 Procedimientos generales

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C fueron registrados en un espectrofotómetro Bruker AVANCE (F) 300, trabajando a 300 y 75 MHz, respectivamente en solución de CDCl_3

7.2 Datos espectroscópicos

Los espectros de $\text{RMN-}^1\text{H}$ y $\text{RMN-}^{13}\text{C}$, se muestran en el anexo 12.1 y 12.2 respectivamente. Tagitinina C. $\text{RMN-}^1\text{H}$ (CDCl_3): $\delta = 1.05$ (3H, d, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_3\text{-C2}'$), 1.07 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_3\text{-C2}'$), 1.54 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C10}$), 1.95 (3H, s br, $\text{CH}_3\text{-C4}$), 2.02 (1H, dd, $J = 14.1$ y 4.2 Hz, H-9b), 2.42 (1H, dd, $J = 14.1$ y 4.2 Hz, H-9a), 2.42-2.52 (h1, m, H-2'), 2.6 (1H. br, OH), 3.54-3.58 (1H, m, H-7), 5.30-5.38 (1H, m, H-8), 5.41 (1H, b br, $J = 9.0$ Hz, h-69), 5.81 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-13b), 5.87 (1H, d br, $J = 9.0$ Hz, H-5), 6.25 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-2), 6.35 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-13a), 6.94 (1H, d, 17.1 Hz, H-1). $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ (CDCl_3): $\delta = 18.58$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-C2}'$), 18.76 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-C2}'$), 19.63 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-C4}$), 28.95 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-C10}$), 30.01 (C-2'), 47.00 (C-7), 48.36 (C-9), 71.99 (C-10), 73.95 (C-8), 75.97 (C-6), 124.49 (C-13), 129.60 (C-2), 1136.02 (C-11), 137.12 (C-5), 138.89 (C-4), 160.16 (C-1), 169.69 (C-12), 176.21 (C-1'), 196.77 (C-3). Los datos corresponden con los reportados en la literatura (Baruah *et al.*, 1979).

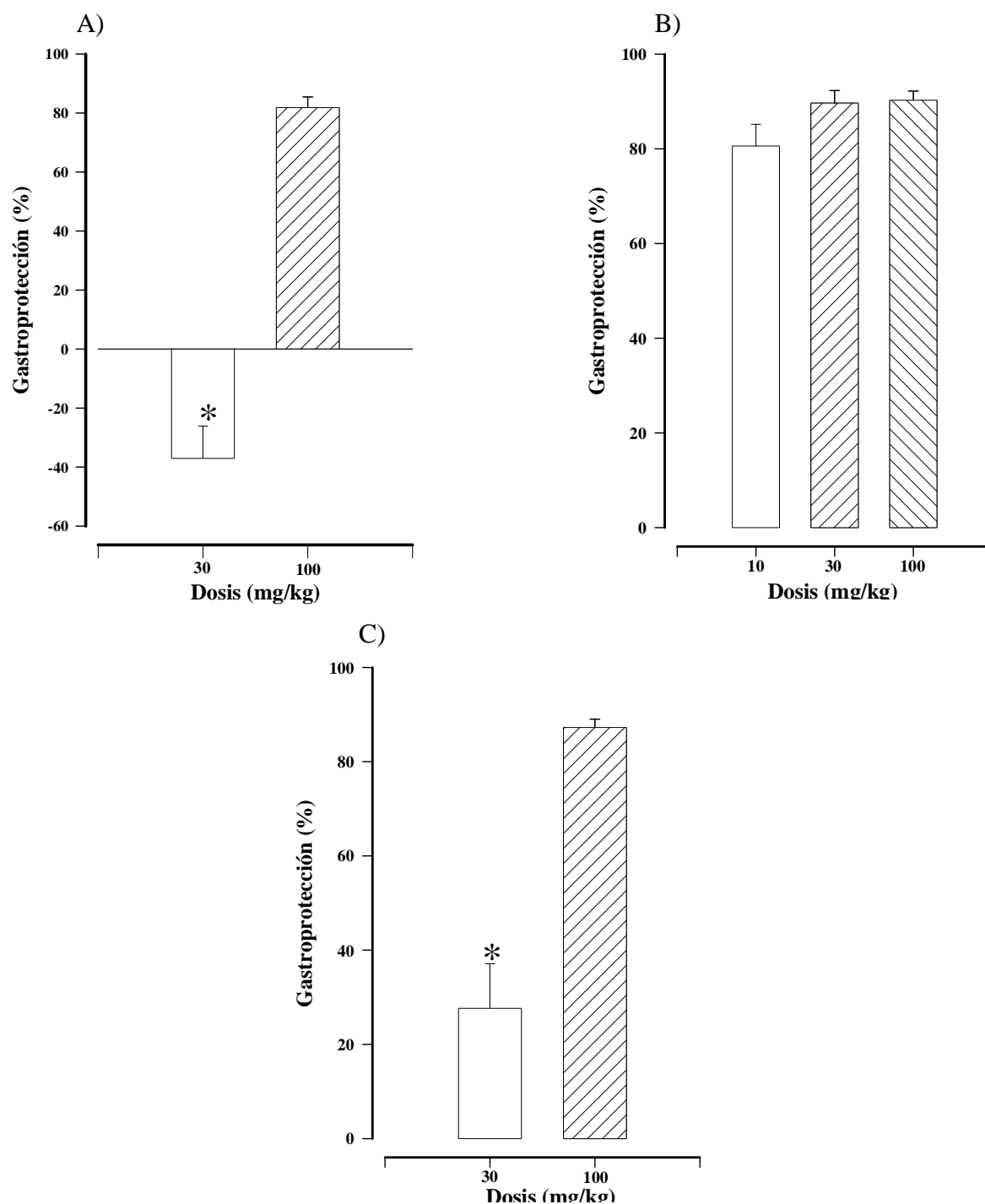
VII RESULTADOS

7.1 Efecto gastroprotector de los extractos de *Tithonia diversifolia*

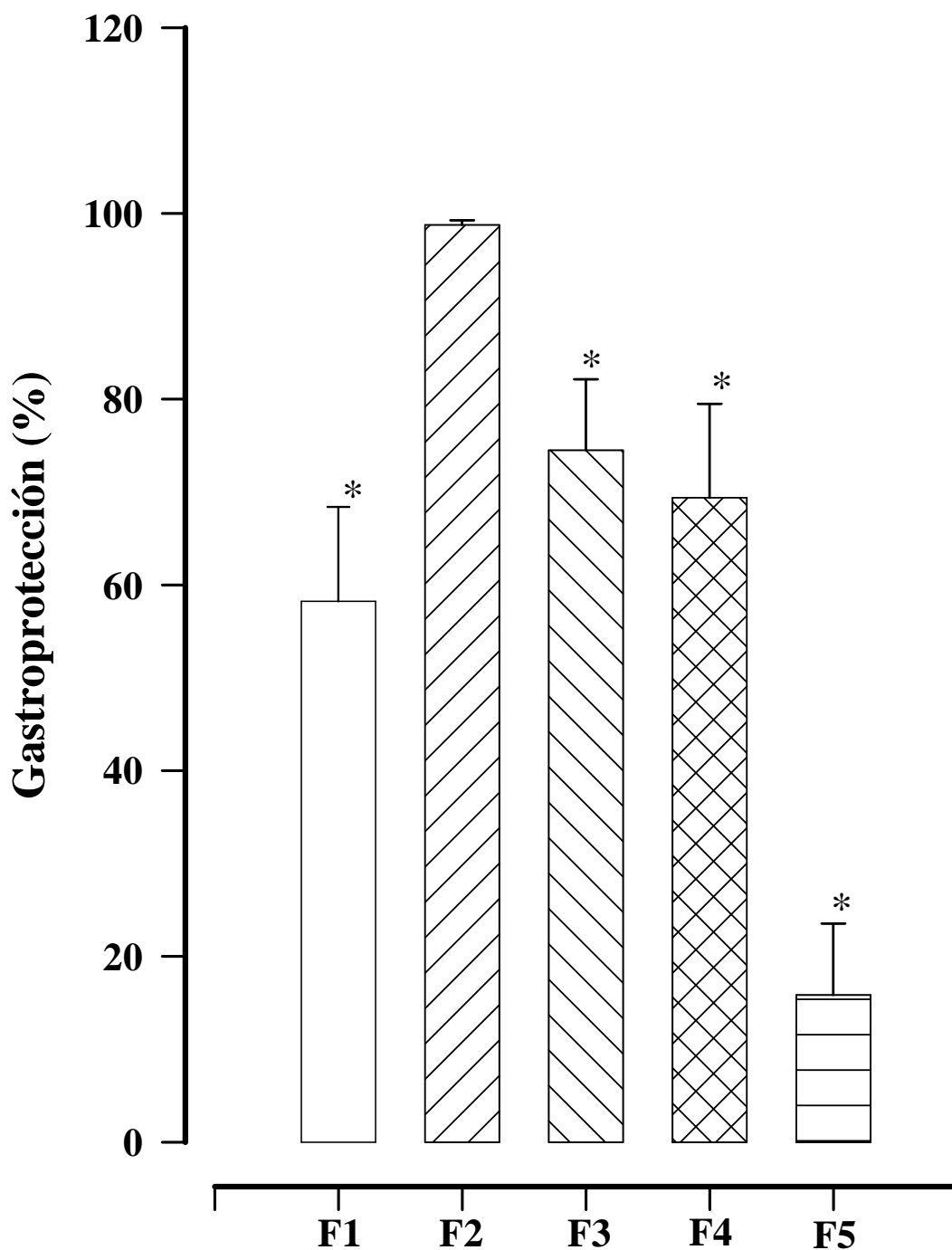
Los extractos de hexano, diclorometano y metanol obtenidos de *T. diversifolia*, presentaron un efecto gastroprotector de $81.84 \pm 3.60\%$, $90.26 \pm 1.94\%$ y $87.27 \pm 1.74\%$ respectivamente, a la dosis de 100 mg/kg (gráfica 1). Los valores de gastroprotección anteriores, no fueron estadísticamente diferentes entre sí, por lo que se procedió a evaluar la dosis de 30 mg/kg para los tres extractos. En dichas evaluaciones los extractos de hexano y de metanol, no mostraron actividad como se puede ver en las gráficas 1a y 1c, con respecto al extracto de diclorometano (gráfica 1b), este presentó una gastroprotección de $89.65 \pm 2.46\%$, por lo que también fue evaluado a la dosis de 10 mg/kg, presentando una gastroprotección de $80.59 \pm 5.53\%$. Los resultados anteriores indicaron que el extracto más activo fue el de diclorometano, y dado que presentó una actividad gastroprotectora similar en las tres dosis evaluadas (gráfica 1b), se sugiere que su efecto no es dependiente de la dosis.

Una vez identificado el extracto de diclorometano como el más activo, 70 g de este, se separaron por cromatografía en columna obteniéndose 5 fracciones, las cuales fueron evaluadas a las dosis de 30 mg/kg, los resultados presentados en la gráfica 2 muestran que la fracción F2 fue la más activa ($98.75 \pm 0.5\%$), seguida de la F3 ($74.49 \pm 7.64\%$). El paso siguiente fue purificar 6.4 g de F2 a través de cromatografía en columna y dicho procedimiento permitió aislar a una lactona sesquiterpénica conocida como tagitinina C, como uno de los principales compuestos activos.

Actividad gastroprotectora de *Tithonia diversifolia* utilizando el modelo de lesiones inducidas por etanol en rata Wistar



Gráfica 1: Efecto gastroprotector a diferentes dosis de (A) extracto hexánico (30-100 mg/kg), (B) extracto de diclorometano (10-100 mg/kg) y (C) extracto metanólico (30-100 mg/kg) en el modelo de lesión gástrica inducida por etanol absoluto en ratas. Cada barra representa el promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ contra dosis de 100 mg/kg.

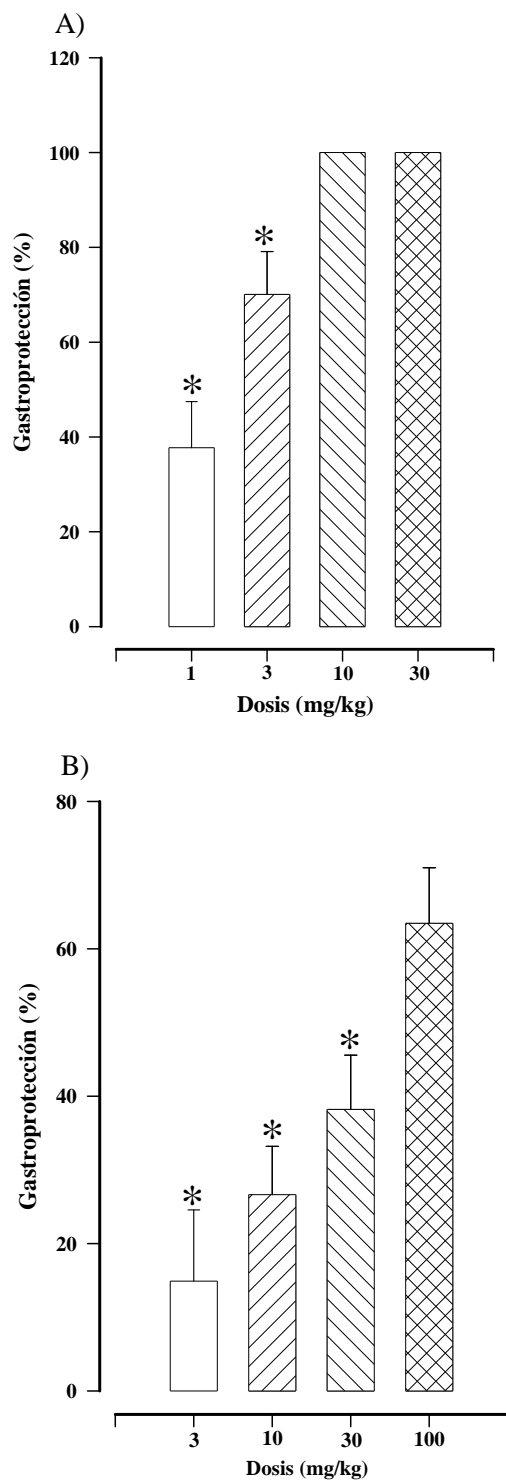


Gráfica 2: Efecto gastroprotector de las fracciones del extracto de diclorometano a una dosis de 30 mg/kg en el modelo de lesión gástrica inducida por etanol absoluto en ratas Wistar. Cada barra representa el promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ contra F2.

7.3 Evaluación de la actividad gastroprotectora de tagitinina C

El máximo efecto de la actividad gastroprotectora de tagitinina C (gráfica 3a), se obtuvo con las dosis de 10 y 30 mg/kg (100%), seguido de las dosis de 3 y 1 mg/kg ($70.08 \pm 9.03\%$ y $37.72 \pm 9.74\%$ respectivamente), estos resultados sugieren que su efecto es dosis dependiente en contraste mostrado por la carbenoxolona, que fue el fármaco de referencia, cuyo máximo efecto gastroprotector se mostro en $66.20 \pm 8.71\%$ a la dosis de 100 mg/kg y su comportamiento fue dosis dependiente (gráfica 3b).

Actividad gastroprotectora de *Tithonia diversifolia* utilizando el modelo de lesiones inducidas por etanol en rata Wistar



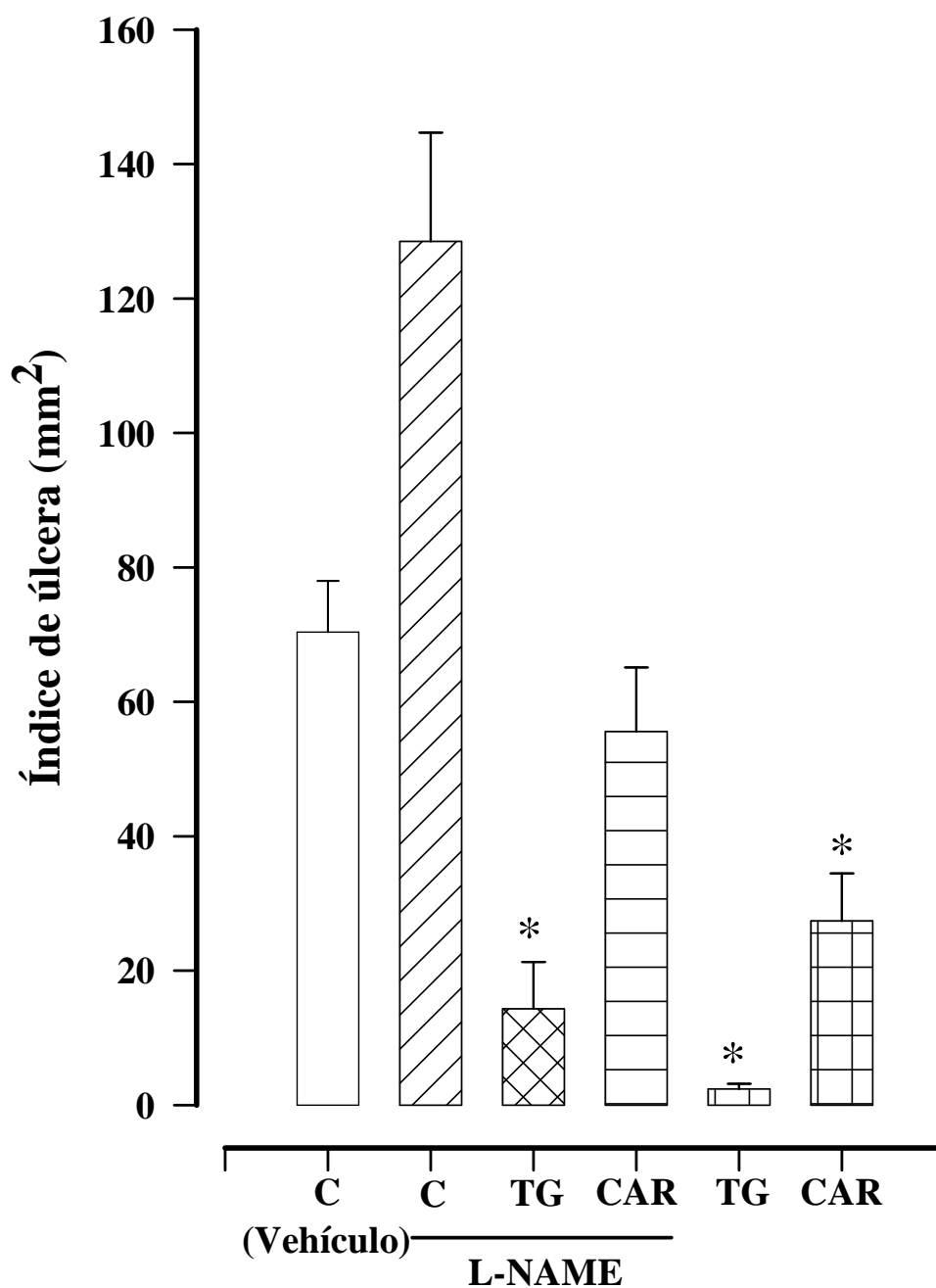
Gráfica 3: Efecto gastroprotector a diferentes dosis de (A) tagitina C (1-30 mg/kg) y (B) carbenoxolona (3-100 mg/kg) en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto en ratas. Cada barra representa el promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ contra dosis máxima.

7.3 Participación del óxido nítrico, las prostaglandinas y los grupos sulfhidrilo en el mecanismo de acción de tagitinina C

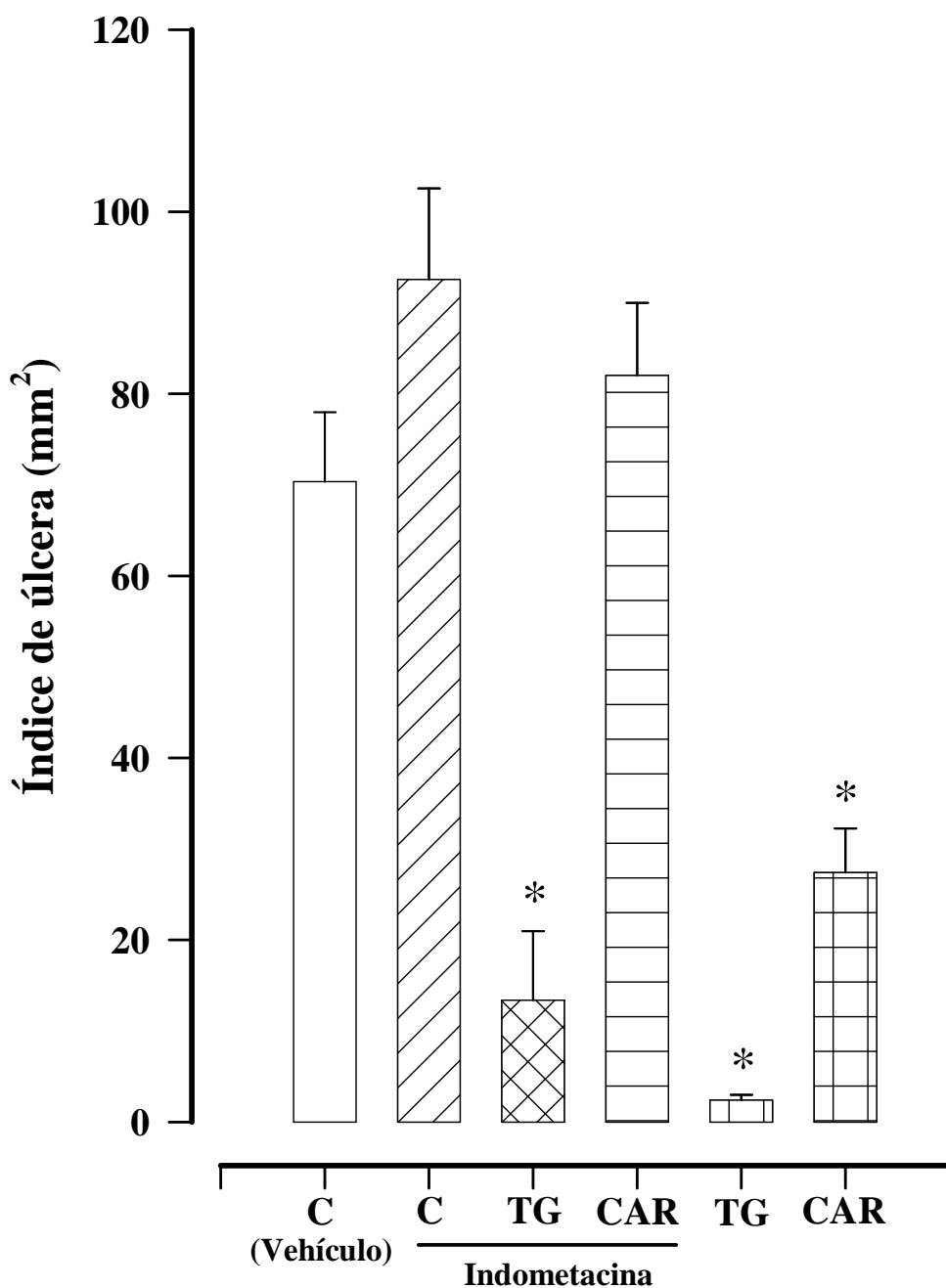
El índice de úlcera en ratas pre-tratadas con 70 mg/kg de L-NAME más tagitinina C (30 mg/kg) fue de $14.31 \pm 6.96 \text{ mm}^2$ (gráfica 4) este valor fue estadísticamente diferente respecto al grupo control ($70.35 \pm 7.61 \text{ mm}^2$), tratado únicamente con solución salina. Estos resultados indican que la administración de L-NAME no modifica el efecto gastroprotector de tagitinina C, por lo que al parecer el óxido nítrico no está implicado en su mecanismo de acción gastroprotector, lo cuál no sucedió con la carbenoxolona, ya que el óxido nítrico si está implicado en su mecanismo de acción (gráfica 4).

En el caso de la determinación de la participación de las prostaglandinas, el pretratamiento con indometacina (10 mg/kg) no inhibió el efecto protector de la tagitinina C, cuyo índice de úlcera fue de $13.37 \pm 7.59 \text{ mm}^2$, el cual fue significativamente diferente al grupo control ($70.35 \pm 7.61 \text{ mm}^2$) tratado únicamente con solución salina, indicando que probablemente las prostaglandinas no están implicadas en el mecanismo de acción de la tagitinina C (gráfica 5). Respecto a la carbenoxolona, las prostaglandinas si participan en su mecanismo de acción ya que la administración previa de indometacina atenuó ($82.00 \pm 7.98 \text{ mm}^2$) su efecto protector (gráfica 5).

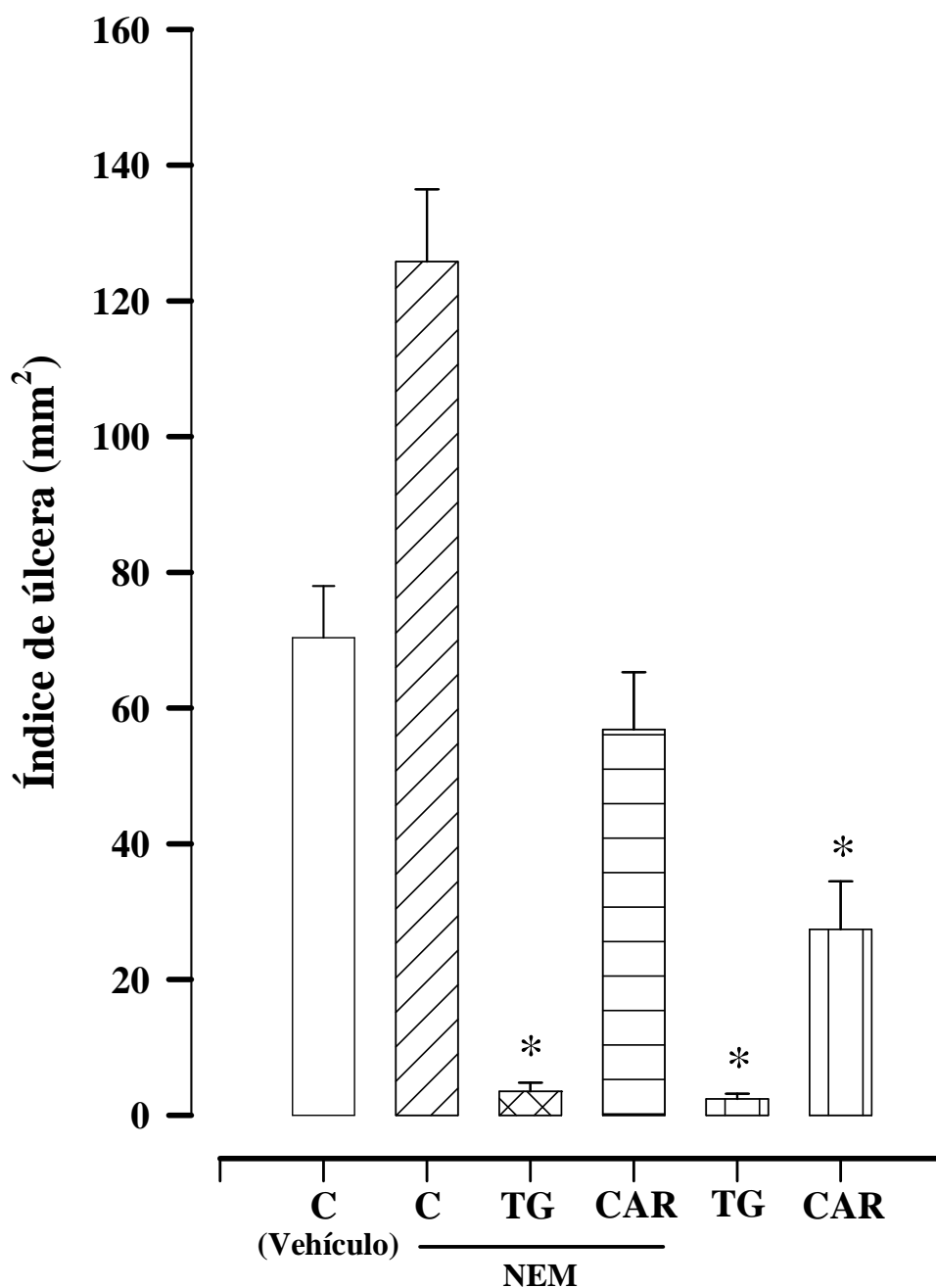
En relación a la participación de los grupos sulfhidrilo, la administración previa de NEM (10 mg/kg) un bloqueador de los grupos sulfhidrilo, no alteró el efecto gastroprotector de tagitinina C debido a que su índice de úlcera ($3.50 \pm 1.29 \text{ mm}^2$), difiere significativamente del grupo control tratado con el vehículo de administración de NEM ($70.35 \pm 7.61 \text{ mm}^2$), por consiguiente estos resultados sugieren que los grupos sulfhidrilos no están involucrados en el efecto gastroprotector de tagitinina C, contrario a la carbenoxolona, donde los grupos sulfhidrilo si están implicados en su mecanismo de acción como se puede observar en la gráfica 6.



Gráfica 4: Efecto de la tagitina C (TG) a 30 mg/kg y carbenoxolona (CAR) a 30 mg/kg sobre lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto en ratas pretratadas con L-NAME (70 mg/kg). Cada barra representa el promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ contra el grupo control de vehículos.



Gráfica 5: Efecto de la tagitinina C (TG) a 30 mg/kg y carbenoxolona (CAR) a 30 mg/kg en lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto en ratas pretratadas con indometacina (10 mg/kg). Cada barra representa el promedio \pm EEM. *P < 0.05 contra el grupo control de vehículos.



Gráfica 6: Efecto de la tagitina C (TG) a 30 mg/kg y carbenoxolona (CAR) a 30 mg/kg en lesiones gástricas inducidas por etanol absoluto en ratas pretratadas con NEM (10 mg/kg). Cada barra representa el promedio \pm EEM. * $P < 0.05$ contra el grupo control de vehículos.

VIII DISCUSION

Tithonia diversifolia es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos como son: dolor estomacal, indigestión (Owoyele *et al.*, 2004), malaria (Elufioye *et al.*, 2009) y úlceras gástricas. Respecto a esta última actividad, se ha demostrado en estudios *in-vitro* que presenta una ligera actividad inhibitoria en contra de *H. pilory* (Castillo-Juárez 2009), el cual esta relacionado con el desarrollo de úlceras gástricas. En relación a lo anterior, los resultados del presente trabajo demuestran que *T. diversifolia* produce una acción gastroprotectora en rata Wistar lo que contribuye a dar un sustento farmacológico a su uso tradicional.

Los extractos de hexano, diclorometano y metanol obtenidos de *T. diversifolia*, presentaron una actividad gastroprotectora similar a la dosis de 100 mg/kg (gráficas 1a, 1b y 1c), sin embargo a la dosis de 30 mg/kg, el extracto hexánico perdió su actividad e incluso mostró un incremento en el área lesionada respecto al control (gráfica 1a), de forma similar que el extracto metanólico, quien también disminuyó su gastroprotección de manera significativa (gráfica 1c). El extracto de diclorometano conservó su efecto tanto a la dosis de 30 como a la de 10 mg/kg (gráfica 1b), mostrándose por lo tanto como el más activo y con efecto no dependiente de la dosis.

Una vez que se identificó al extracto de diclorometano como el más activo, se procedió a realizar un fraccionamiento biodirigido del mismo, el cual permitió aislar a partir de la fracción F2 a la tagitinina C, como uno de los principales compuestos con actividad gastroprotectora; que alcanzó un 37.72, 70.08, 100 y 100% de gastroproteccion con las dosis de 1, 3, 10 y 30 mg/kg, respectivamente (gráfica 3a). La tagitinina C, pertenece a las lactonas sesquiterpénicas, previamente reportadas para el género *Thithonia* (Ziémons *et al.*, 2005) y aunque se ha demostrado su actividad como insecticida y antimalárico (Ziémons *et al.*, 2005), los resultados obtenidos en este estudio demostró por primera vez su actividad gastroprotectora en dosis bajas (gráfica 3a).

8.2 Participación del óxido nítrico, las prostaglandinas y los grupos sulfhidrilo en la actividad gastroprotectora de tagitinina C

Estudios previos han demostrado que el NO está implicado en la modulación de la integridad de la mucosa gástrica por medio de la regulación de ácido, secreción de moco, bicarbonato y flujo sanguíneo (Laine *et al.*, 2008). Con el fin de proporcionar información sobre la participación del óxido nítrico en la gastroprotección de la tagitinina C, se utilizaron ratas tratadas previamente con L-NAME (un inhibidor no selectivo de la sintasa de óxido nítrico). Los resultados del estudio muestran que la actividad de la tagitinina C (14.31 mm²) no fue inhibida por el pretratamiento con L-NAME (gráfica 4), lo que sugiere que el óxido nítrico no está implicado en el mecanismo de acción de la tagitinina C, caso contrario sucedió con la carbenoxolona (fármaco de referencia), donde su actividad gastroprotectora fue inhibida por el pretratamiento con L-NAME (gráfica 4), lo cual es consistente a lo reportado en la literatura (Reyes *et al.*, 2008).

Las prostaglandinas constituyen otro sistema implicado en la regulación de la integridad de la mucosa gástrica, disminuyendo la secreción de ácido, promoviendo la secreción de moco y bicarbonato así como incrementado el flujo sanguíneo (Sekiguchi *et al.*, 2007; Heeba *et al.*, 2009), por lo que en el presente estudio se evaluó su participación en la acción gastroprotectora de la tagitinina C, para esto ratas Wistar fueron pretratadas con indometacina, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, el cual inhibe de manera no selectiva a las ciclooxigenasas, enzimas encargadas de sintetizar las prostaglandinas, lo que reduce la habilidad intrínseca de la mucosa para resistir la inducción de daño (Heeba *et al.*, 2009; Polat *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos sugieren que la actividad de tagitinina C no es atenuada por el pretratamiento con indometacina (gráfica 5), por lo que al parecer las prostaglandinas tampoco están implicadas en el mecanismo de acción de la tagitinina C. mientras tanto para la carbenoxolona, los resultados obtenidos están de acuerdo con lo reportado en la literatura (Takeuchi *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que durante el desarrollo del daño gástrico inducido por el etanol existe una disminución en los grupos sulfhidrilo de la mucosa gástrica. Estos compuestos

neutralizan los radicales libres producidos durante el daño al tejido por agentes nocivos. Además, los grupos sulfhidrilo producen subunidades de moco mediante la formación de puentes de disulfuro y así reducen los radicales libres los cuales son eliminados por el moco, donde se vuelven solubles en agua (Ávila *et al.*, 1996; Maity *et al.*, 1998). Para investigar la implicación de estos grupos en el efecto gastroprotector de la tagitinina C, se administró previamente N-etilmaleimida, un bloqueador de los grupos sulfhidrilo. Los resultados sugieren que los grupos sulfhidrilo no están implicados en el mecanismo de acción de la tagitinina C debido a que el efecto gastroprotector no fue atenuado por el pretratamiento con el bloqueador (gráfica 6). En cambio el efecto gastroprotector de la carbenoxolona si fue inhibido por el NEM, coincidiendo con lo reportado.

IX CONCLUSIONES

Las conclusiones que se desprenden del presente trabajo son:

- *Tithonia diversifolia* presenta actividad gastroprotectora en el modelo de lesiones gástricas inducidas por etanol.
- De esta planta, se aisló a la lactona sesquiterpenica tagitinina C como uno de los principales compuestos responsables de la actividad gastroprotectora.
- El estudio del mecanismo de acción gastroprotector de tagitinina C, sugiere que no están implicadas las prostaglandinas, el óxido nítrico o los grupos sulfhidrilos.
- Del presente trabajo se desprende la publicación de un artículo en la revista *Molecules*. 2010; 16: 665-674, una copia se encuentra en el anexo 12.3.

X. PERSPECTIVAS

- 1.- Evaluar el mecanismo de acción de la tagitinina C utilizando el modelo de ligación del pílono, para determinar su posible actividad antisecretora.
- 2.- Determinar la posible toxicidad de la tagitinina C.
- 3.- Explorar la posible ruta de síntesis orgánica de tagitinina C.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adebayo JO, Balogun EA, Oyeleke SA. Toxicity study of the aqueous extract of *Tithonia diversifolia* leaves using selected biometrical parameters in rats. *Pharmacognosy Research*. 2009; 1(3): 143-147.
2. Alsasua del Valle A. Fármacos antiulcerosos. En: Velasco A, San-Roman L, Serrano J, Martínez-Sierra R, editores. *Farmacología Fundamental*. España. Mc. Graw Hill-interamericana. 2003. 551-560.
3. Alvarado J, Hani A, Rodríguez A, Archiva P, Beltran O. Guías de Práctica Clínica Basadas en la Evidencia, Enfermedad Ácido Péptica, Asociación Colombiana de Facultades de Medicina- ASCOFAME. 2007. 15-66.
4. Ávila JR, de la Lastra CA, Martin MJ, Motilva V, Luque I, Delgado D, esteban J, Herrerias J. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the patogénesis of gastric mucosal injury by piroxicam in rats. *Inflam*. 1996; 45: 83-88.
5. Barbosa P and Ramos C. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq. in rats. *Phytother. Res*. 1992; 6:114-115.
6. Bays D and Finch H. Inhibitors of gastric acid secretion. *Natural Products Reports*. 1990; 7: 409-445.
7. Borrelli F e Izzo A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother. Res*. 2000; 14: 581-591.
8. Bourslon CR. Úlcera Péptica. En: Halabe CJ, Lifshitz GA, López BJ, Ramiro HM, editores. *El Internista Medicina Interna para Internistas*. México. McGraw-Hill Interamericana. 1997. 490-496.
9. Brunton L. 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. USA. McGraw-Hill. 1996. 901-917.

10. Brunton LL, Parker KL. Medicamentos que afectan la función gastrointestinal. En: Goodman & Gilman Manual de Farmacología Terapéutica. México. Mc Graw Hill. 2009. 621-632.
11. Cáceres-Castillo D, Mena-Rejón GJ, Cedillo-Rivera R, Quijano L. 21b-Hydroxy-oleanane-types triterpenes from *Hippocratea excelsa*. Phytochem. 2008; 69(4): 1057-1064.
12. Cammareri M, Consiglio MF, Pecchia P, Corea G, Lanzotti V, Ibeas JI, Tava A, Conicella C. Molecular Characterization of b-amyrin synthase from *Aster sedifolius* L. and triterpenoid saponin analysis. Plant Sci. 2008; 175(3): 255-261.
13. Carretero M. Citoprotección Gástrica. Avances Farmacológicos. Actualidad Científica. OFFARM. 2001. 121-125.
14. Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, Romero I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. J Ethnopharmacol. 2009; 122(2): 402-405.
15. Castillo-Juárez I, Rivero-Cruz F, Celis H, Romero I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. J Ethnopharmacol. 2007; 114(1): 72-77.
16. Chávez-Piña AE, Tapia-Alvarez GR, Navarrete A. Inhibition of endogenous hydrogen sulfide synthesis by PAG protects against ethanol-induced gastric damage in the rats. Eur J Pharmacol. 2010; 630(1-3): 131-136.
17. Céspedes ACLA y Salazar JR. Los Flavonoides en el Instituto de Química una Relación Histórica. En: Romo de Vivar RA, editor. Química de la Flora Mexicana. México. Instituto de Química. 2006. 63- 88.
18. De Vincentis A, Bartosek I, Vargiu G. Alginato in drugs in gastroenterology, ed. By P. C. Braga P, Guslandi M and Tittobello A. Ed. Raven Press, New Cork. 1991. 256-260.

19. Deniz M, Huseyin SH, Tekin S, Yesiller M, Agaoglu B, Cetinel S, Yegen B. Nicotine withdrawal alleviates acetic acid-induced gastric injury in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2009; 27(2): 200-205.
20. Elufioye TO, Alatisie OI, Fakoya FA, Agbedahunsi JM, Houghton PJ. Toxicity studies of *Tithonia diversifolia* A. Gray (Asteraceae) in rats. *J Ethnopharmacol.* 2009; 122(2): 410-415.
21. Falcao HS, Mariath IR, Diniz MFFM, Batista LM, Barbosa-Filho JM. Plants of the American continent with antiulcer activity. *Phytomedicine.* 2008; 15(1-2): 132-146.
22. Ferrer I, Pérez J, Herrerías J. Guía de Seguimiento Farmacoterapéutico Sobre Úlcera Péptica. 2006. 5-56.
23. Flórez J y Espulgues V. Farmacología de la secreción ácida gástrica y de la ulceración mucosa. Flórez, J. Armijo y A. Mediavilla. *Farmacología humana* 3ª ed. Ed. Masson S. A. 1999. 756-784.
24. Fulop K, Zádori Z, Rónai AZ, Gyires K. Characterisation of α_2 -adrenoceptor subtypes involved in gastric emptying, gastric motility and gastric mucosal defence. *Eur J Pharmacol.* 2005; 528(1-3): 150-157
25. Glavin GB, Rockman GE. Acute Ethanol Administration: Effects on Stress-Induced Gastric and Duodenal Ulcer in Rats. *Alcohol.* 1985; 2(5): 651-653.
26. Heeba GH, Hassan MKA, Amin RS. Gastroprotective affect of simvastatin against indometacin-induced gastric ulcer in rats: Role of nitric oxide an prostaglandins. *Eur J Pharmacol.* 2009; 607(1-3): 188-193.
27. Hoogerwef WA and Pasricha PJ. Agents used for control of gastric and treatment of peptic ulcers and gastro esophageal reflux disease. En J.G. Hardman L.L. Limbird y A.G. Gilman, editores. *Goodman and Gilman. Pharmacological Basis herapy.* 10a ed. USA. McGraw-Hill. 2001. 1005-1020.

28. Ineu RP, Pereira ME, Aschner M, Nogueira CW, Zein G, Rocha JBT. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(9): 3023-3029.
29. Ito Y, Shibata K, Hongo A, Kinoshita M. Ecabet sodium, a locally acting antiulcer drug, inhibits urease activity of *Helicobacter pylori*. *Eur J Pharmacol.* 1998; 345(2): 193-198.
30. Ito Y, Okuda S, Ohkawa F, Kato S, Mitsufuji S, Yoshikawa T, Takeuchi K. Dual role of nitric oxide in gastric hypersecretion in the distended stomach: Inhibition of acid secretion and stimulation of pepsinogen secretion. *Life Sciences.* 2008; 83(25-26): 886-892.
31. Jainu M, Shyamala CS. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: possible mechanism for the inhibition of acid formation. *J Ethopharmacol.* 2006; 104(1-2): 156-163.
32. Jayarg AP, Lewin MR, Tovy FI, Kitler ME and Clark CG. The Protective Effect of Meciadanol (O-methyl-3(+)-catechin) on Experimental Ulceration. *Eur J Pharmacol.* 1988; 147(2): 265-271.
33. Jiménez-Estrada M, Saad VI, Sánchez-Contreras Á, Reyes-Chilpa R. Estudio sobre monoterpenos e irinoides. En: Romo de Vivar RA, editor. *Química de la Flora Mexicana*. México. Instituto de Química. 2006. 39-62.
34. Kohagen KR, Kim MS, McDonnell WM, Chey WD, Owyang C, Hasler WL. Nicotine Effects on Prostaglandin-Dependent Gastric Slow Wave Rhythmicity and Antral Motility in Nonsmokers and Smokers. *Gastroenterology.* 1996; 110(1): 3-11.
35. Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. *Gastroenterology.* 2008; 135(1): 41-60.

36. Lanza F. Endoscopic studies of gastric and duodenal injury alter the use of ibuprofen, aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory agents. *Am. J. Med.* 1984; 77: 19-24.
37. Lewis DA, Shaw GP. A natural flavonoid and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. *J Nutr Biochem.* 2001; 12(2): 95-100.
38. Ma L, Chow J and Chow CH. Cigarette smoking delays ulcer healing: role of constitutive nitric oxide synthase in rat stomach. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: G238-G248.
39. Maity S, Rajan J, kumar D. Role of glutation in the antiulcer effect of hot water extract of black tea (*Camellia sinensis*). *Jpn J Pharmacol.* 1998; 78: 285-292.
40. Malfertheiner P, Chan FKL, McColl KEL. Peptic ulcer disease. *Lancet.* 2009; 374(9699): 1449-1461.
41. McCready DR, Wallace JL, Cohen MM. Prostaglandin Biosynthesis by Gastric Mucosa. II Studies in Man. *Clinical Biochemistry.* 1984; 17(3): 183-187.
42. Moraes TM, Kushima H, Moleiro FC, Santos RC, Machado LR, Marques MO, Vilegas W, Hiruma-Lima CA. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chem Biol Interact.* 2009; 180(3): 499-505.
43. Naverrete A, Trejo-Miranda JL, Reyes-Trejo L. Principles of root bark of *Hippocratea exelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79(3): 383-388.
44. Olivera OAG, Soto HM, Martínez VM, Terrasas ST, Solares AF. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipherygium adsringens*, Schiede ex Schlecht). *J Ethnopharmacol.* 1999; 68(1-3): 109-113.

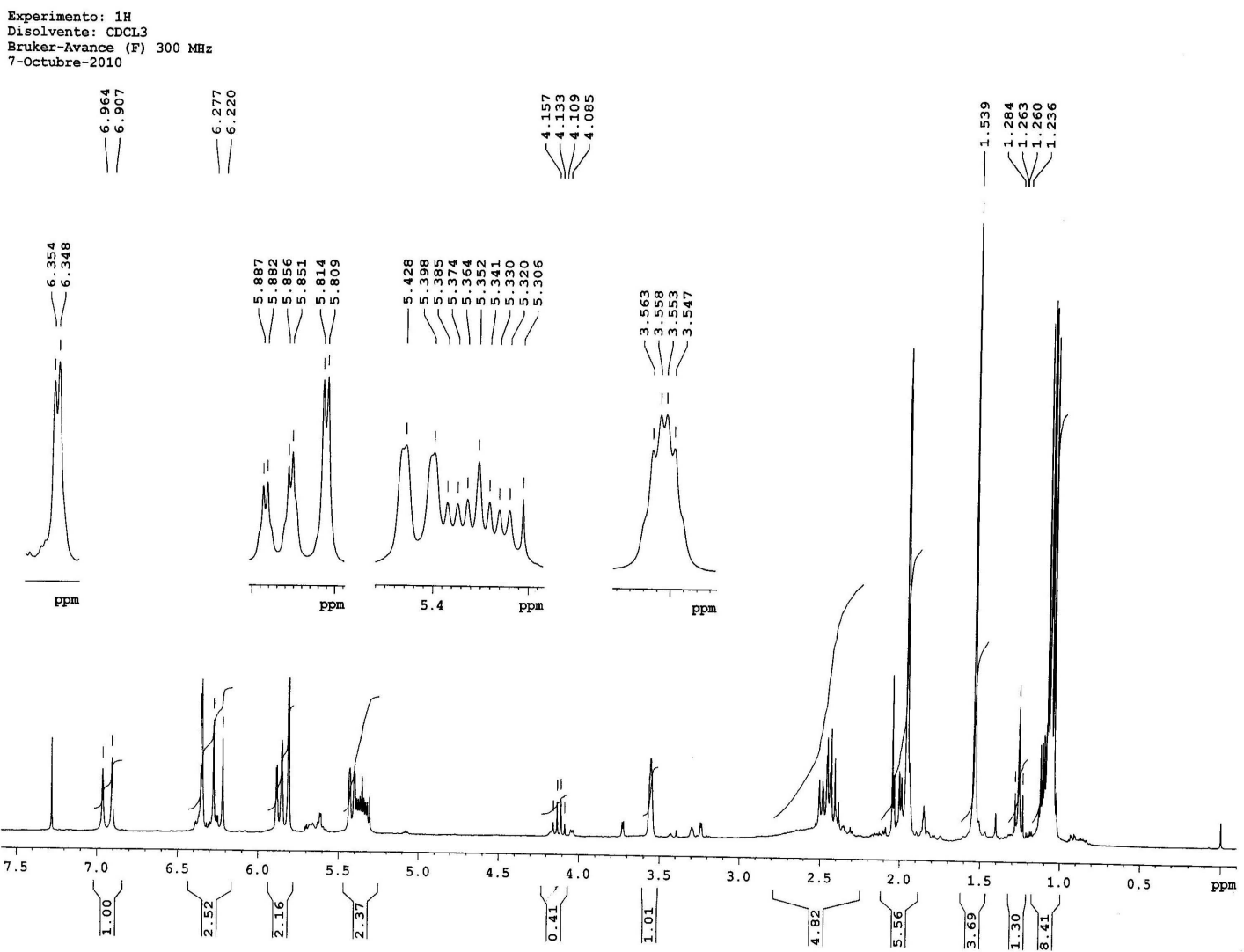
45. Owoyote VB, Wuraola CO, Saladoye AO, Olaleye SB. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extracts. *J Ethnopharmacol.* 2004; 90: 317-321.
46. Pal C, Bindu S, Dey S, Alam A, Goyal M, Iqbal MS, Maity P, Adhikari SS, Bandyopadhyay U. Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010; 49(2): 258-267.
47. Reyes-Trejo B, Sánchez-Mendoza MA, Becerra-García AA, Cedillo-Portugal E, Castillo-Henkel C, Arrieta J. Bioassay-guided isolation of anti-ulcer diterpenoid from *Croton reflexifolius*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *J Pharm Pharmacol.* 2008; 60(7): 931-916.
48. Reymunde A. Úlcera Gastroduodenal: Diagnóstico y tratamiento. En: Abreu GL, director. *Gastroenterología. Endoscopia Diagnóstica y Terapéutica.* España. Medica Panamericana S.A. 2007. 147-149.
49. Rodríguez C. Úlcera Péptica. *Tópicos Selectos en Medicina Interna –Gastroenterología.* 2006; 11. 162-176.
50. Sánchez-Mendoza ME, Reyes-Trejo B, Sánchez-Gómez P, Rodriguez-Silverio J, Castillo-Henkel C, Cervantes-Cuevas H, Arrieta J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer chomene from *Eupatorium ascherbonianum*: role of nitric oxide, prostanglandins and sulfidryls. *Fitoterapia.* 2010; 81(1): 66-71
51. Sekiguchi F, Saito S, Takaoka K, Hayashi H, Nagataki M, Nagasawa K, Nishikawa H, Matsui H, Kawabata A. Mechanism for prostaglandin E2 formation caused by proteinase-activated receptor-1 activation in rat gastric mucosal epithelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73(1): 103-114.

52. Shorrock C, Prescott J, Ress D. The effects of indometacin on gastroduodenal morphology and mucosal pH gradient in the healthy human stomach. *Gastroenterology*. 1990; 99: 334-339.
53. Szabo S, Trier J, Frankel P. Sulfhydryls compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science*. 1981; 214: 2000-2002
54. Takeuchi K, Yagi K, Kato S, Ukama H. Roles of prostaglandin E-Receptor subtypes in gastric and duodenal bicarbonate secretion in rats. *Gastroenterology*. 1997; 113(5): 1553-1559.
55. Takeuchi K, Yagi K, Kitamura M, Kubomi M. Stimulation of Duodenal Bicarbonate Secretion by Carbenoxolone in Rats: A Comparative Study with Prostaglandin E₂. *Gen Pharmac*. 1998; 30(5): 739-744.
56. Tarnawski A. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci*. 2005; 50(1): 24-33.
57. Tsukimi Y and Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biol. Pharm. Bull*. 2001; 24: 1-9.
58. Vasconcelos PCP, Andreo MA, Villegas W, Hiruma-Lima CA, Pellizzon CH. Effect of *Mouriri pusa* tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. *J Ethnopharmacol*. 2010; 131(1): 146-153.
59. Wallace JL. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs. *Trends Pharmacol Sci*. 2007; 28(10): 501-505.
60. Wan y Gottfried. Citoprotective action of carbenoxolone sodium on ethanol-induced gastric lesion in rats and its inhibition by indomethacin. *J Pharm Pharmacol*. 1985; 37: 739-741.

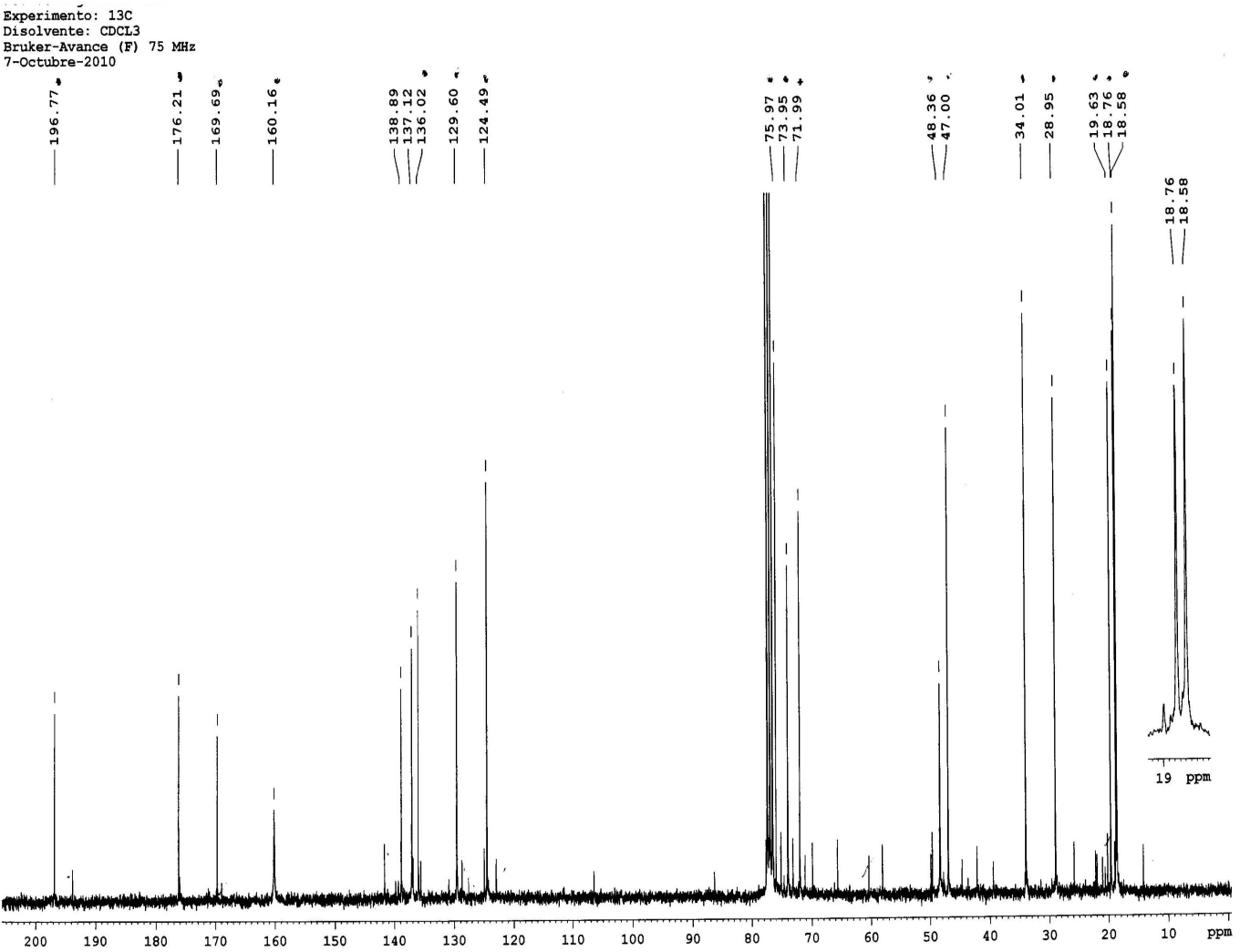
61. Watkinson G, Akbar FA. Misoprostol in peptic ulcer. *Prostaglandins*. 1987; 33(1): 78-92.
62. Wong D, Koo MWL, Shin VY, Liu ESL, Cho C. Pathogenesis of nicotine treatment and its withdrawal on stress-induced gastric ulceration in rats. *Eur J Pharmacol*. 2002; 434(1-2): 81-86.
63. Xue S, Chen S, Wu J and Wang M. Antigastric ulcerative actions emulsive granules of seed oil of *Brucea Javanica*. *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao*. 1996. 13: 13-17.
64. Yamazaki M. *Jpn Kokai TokioJP.5857316*; En Chem Abstr. 1983; 99: 165663.
65. Yonezawa D, Sekiguchi F, Miyamoto M, Taniguchi E, Honjo M, Masuko T, Nishikawa H, Kawabata A. A protective role of hydrogen sulfide against oxidative stress in rat gastric mucosal epithelium. *Toxicology*. 2007; 241(1-2): 11-18.
66. Zhang J, Yan C, Zhan Y, Gao W, Zhai X. Effect of Scopolia drugs on the gastric mucosal lesions in rats. *Yaoxue Xuebao*. 25(2):90-4. Chem Abstr.1990; 112: 140.
67. Ziémons E, Goffin E, Lejeune R, Proenca da Cunha A, Anglenot L, Thunus L. Supercritical carbón dioxide extraction of tagitinin C from *Tithonia diversifolia*. *J Supercrit Fluids*. 2005; 33(1): 53-59.

XII. ANEXOS

12.1 Espectro de RMN-¹H (300 MHz) de tagitina C



12.2 Espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz) de tagitinina C



12.3 El presente trabajo fue publicado en la revista *Molecules*. 2010; 16: 665-674.

ARTÍCULO IMPRESO

Molecules 2011, 16, 665-674; doi:10.3390/molecules16010665

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Bioassay-Guided Isolation of an Anti-Ulcer Compound, Tagitinin C, from *Tithonia diversifolia*: Role of Nitric Oxide, Prostaglandins and Sulfhydryls

María Elena Sánchez-Mendoza¹, Adelfo Reyes-Ramírez², Leticia Cruz Antonio², Luis Martínez Jiménez¹, Juan Rodríguez-Silverio¹ and Jesús Arrieta^{1,*}

¹ Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón, Colonia Santo Tomás, Delegación Miguel Hidalgo 11340, México D. F., Mexico; E-Mails: mesmendoza@hotmail.com (M.E.S.-M.); mtzj_luis@hotmail.es (L.M.J.); jrsilverio61@yahoo.com.mx (J.R.-S.)

² Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Batalla del 5 de Mayo Esquina Fuerte de Loreto, Ejército de Oriente, México D.F., Mexico; E-Mails: adelfo@puma2.zaragoza.unam.mx (A.R.-R.); letycruza@yahoo.com.mx (L.C.A.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jearrval@yahoo.com.mx; Tel.: +55 57 29 63 00 Ext. 62 827; Fax: +55 56 22 53 29.

Received: 16 December 2010; in revised form: 6 January 2011 / Accepted: 13 January 2011 / Published: 17 January 2011

Abstract: *Tithonia diversifolia* is a medicinal plant from the Municipality of Suchiapa, Chiapas, Mexico, that according to local folk medicine is considered useful in the treatment of gastric ulcers. The aim of the present study was to investigate the gastroprotective activity of *T. diversifolia* by using an ethanol-induced gastric ulcer experimental model in male Wistar rats. The results showed that *T. diversifolia* had gastroprotective activity, and that the dichloromethane extract had the highest protective activity (close to 90% when using doses between 10 to 100 mg/kg), and that further the compound tagitinin C isolated from this extract was the main active gastroprotective agent. Rats treated with tagitinin C suspended in Tween 80 at 1, 3, 10 and 30 mg/kg showed 37.7, 70.1, 100, and 100% gastroprotection, respectively. The effect elicited by tagitinin C (30 mg/kg) was not attenuated by pretreatment with either *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (70 mg/kg, i.p.), a nitric oxide (NO) synthase inhibitor, *N*-ethylmaleimide (10 mg/kg, s.c.), a blocker of sulfhydryl groups, or indomethacin (10 mg/kg, s.c.), a blocker of prostaglandin

ARTÍCULO IMPRESO

Molecules 2011, 16

666

synthesis, which suggests that the gastroprotective mechanism of action of this sesquiterpene lactone does not involve NO, sulfhydryl groups or prostaglandins.

Keywords: *Tithonia diversifolia*; Asteraceae; tagitinin C; gastroprotection; medicinal plants

1. Introduction

Peptic ulcers represent one of the most important diseases of the digestive system and a medico-social problem of global economic importance, the latter due to its broad geographical distribution, as well as high incidence, morbidity and drug consumption. It is estimated that at some time in their life nearly 20% of all people may suffer from peptic ulcers, caused by factors such as stress, diet, smoking, alcohol and certain types of drugs [1].

The drugs currently used in the treatment of gastric ulcers are anti-acids, anticholinergics, proton pump inhibitors and H₂-receptor antagonists. However, there are innumerable adverse effects caused by these allopathic medicines [2], indicating the need for more effective and safer antigastric ulcer agents with less side effects. In this context, metabolites derived from plants used in traditional medicine have provided an important basis for the discovery and development of modern therapeutic drugs [3].

Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) is a 2–5 m tall perennial shrub, which is native to Mexico and also grows in other countries of North America, and in parts of Africa and Asia [4]. *T. diversifolia* is administered in several forms: oral decoction of the leaves for treatment of hepatitis, diabetes, malaria, pain, chemoprevention and anti-*Helicobacter pylori* [4–6], external application of dried leaves on wounds and infusion of leaves for the treatment of measles [6]. Previous phytochemical studies of this genus have shown that the major constituents include three subtypes of sesquiterpene lactones (heliangolides, furanoheliangolides and eudesmanolides), flavones, and chromenes, among others [7,8].

Although this plant is commonly used by the people of Suchiapa (Chiapas State, Mexico) to cure gastric ulcers, there is no scientific report either disproving or validating this therapeutic practice. Therefore, we decided to test the gastroprotective activity of *T. diversifolia* and, upon validating such protective action, proceeded to identify the active compound or compounds. A bioassay-guided fractionation was performed and the compounds obtained were tested in the absolute ethanol induced gastric ulcer experimental model in Wistar rats. The role of endogenous NO, sulfhydryl groups and prostaglandins was evaluated in relation to the gastroprotective effect in order to provide information about the mechanism of action of the test compounds. The results were compared with the effect of carbenoxolone.

2. Results and Discussion

2.1. Bioassay-guided fractionation and isolation of tagitinin C

Drug treatment of peptic ulcers has focused on either counteracting aggressive factors or stimulating the mucosal defenses. Although many drugs have been effectively employed in the

ARTÍCULO IMPRESO

Molecules 2011, 16

667

treatment of gastroduodenal ulcers, all of these compounds have shown shortcomings, such adverse effects or high cost [9]. The search for new therapeutic options includes investigation of natural product sources [10]. In this context extracts of hexane, dichloromethane and methanol from the leaves of *Tithonia diversifolia* were evaluated. It was found that the dichloromethane extract was the most active (Table 1). Interestingly, this effect was not dose dependent. This extract presented a maximum gastroprotective effect ($90.3 \pm 1.9\%$) at 100 mg/kg, and similar values were obtained with doses of 10 and 30 mg/kg ($80.6 \pm 5.5\%$ and $89.6 \pm 2.5\%$, respectively).

Table 1. Gastroprotective effect of *Tithonia diversifolia* extracts on ethanol-induced ulceration in rats.

Treatment	Dose (mg/kg)	n	UI (mm ²)	Gastroprotection (%)
Control	---	10	60.9 ± 14.1	---
Hexane extract	30	10	83.5 ± 10.9	-37.1 ± 7.8
	100	10	11.1 ± 3.6*	81.8 ± 5.9
Dichloromethane extract	10	10	11.8 ± 4.6*	80.6 ± 5.5
	30	10	6.3 ± 2.5*	89.6 ± 2.5
	100	10	5.9 ± 1.9*	90.3 ± 1.9
Methanol extract	30	10	44.1 ± 9.5	27.6 ± 9.5
	100	10	7.7 ± 1.7*	87.3 ± 3.2

*p < 0.05 vs. control group; UI = Ulcer index

Thus, 70 g of the dichloromethane extract was subjected to separation over a silica gel column, and F2 was found to be the most active (maximum $98.7 \pm 0.5\%$ gastroprotective effect; see Table 2) among the five fractions obtained. Then 6.4 g of F2 were separated on a silica gel column and a pure compound from the F8' fraction identified as tagitinin C (a sesquiterpene lactone), was obtained (Figure 1). The identity of this compound was confirmed by comparing its spectral data with that of the literature [11], and the gastroprotective activity of *T. diversifolia* was thus attributed to tagitinin C.

Table 2. Gastroprotective effect of the fractions of dichloromethane extract on ethanol-induced ulceration in rats.

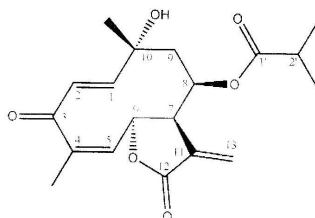
Treatment	Dose (mg/kg)	n	UI (mm ²)	Gastroprotection (%)
Control	---	8	76.6 ± 10.3	---
F1	30	8	32.0 ± 10.2*	58.2 ± 13.3
F2	30	8	0.9 ± 0.5*	98.7 ± 0.5
F3	30	8	19.5 ± 7.6*	74.5 ± 5.7
F4	30	8	23.5 ± 10.1*	69.4 ± 9.2
F5	30	8	64.5 ± 7.7	15.8 ± 7.3

*p < 0.05 vs. control group; UI = Ulcer index

Tagitinin C was previously isolated from *T. diversifolia* [12] and many potential medicinal uses have been reported for this compound including as a cancer chemopreventive [13] and anti-malarial agent [12]. It has been reported that an aqueous extract of *T. diversifolia* obtained of leaves may be toxic when it is administrated consecutively in oral form (100 mg/kg) [6].

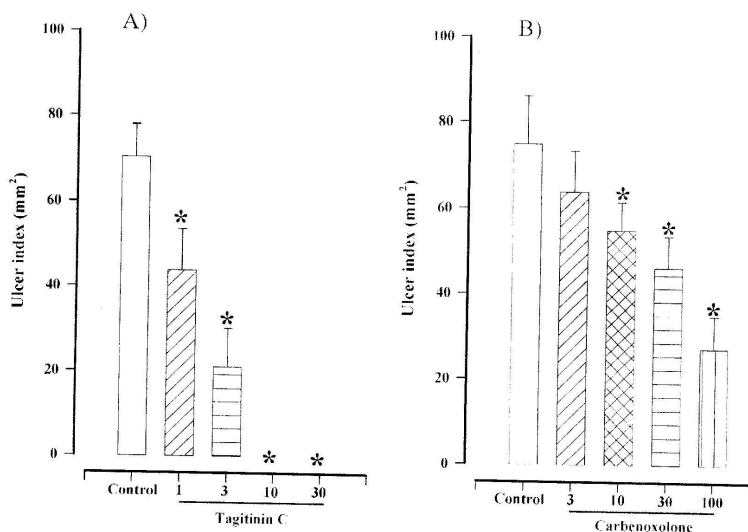
ARTÍCULO IMPRESO

Figure 1. The structure of tagitinin C.



The current study, representing the first report of its gastroprotective activity, found that tagitinin C produced a 100% gastroprotective effect at doses of 10 and 30 mg/kg (Figure 2A), and a maximum gastroprotective effect at the former dose. There are as yet no reports of toxicity for tagitinin C. For comparative reasons the effect of carbenoxolone was also studied, the maximal gastroprotective effect induced by this compound being $63.5 \pm 4.7\%$ at a dose of 100 mg/kg (Figure 2B).

Figure 2. Effect of different doses of (A) tagitinin C (1–30 mg/kg) and (B) carbenoxolone (3–100 mg/kg) on gastric lesions induced in rats by absolute ethanol. Bars represent the mean \pm SEM, n = 10. * p < 0.05 vs. the respective control; Dunn's multiple comparison test after Kruskal-Wallis test.

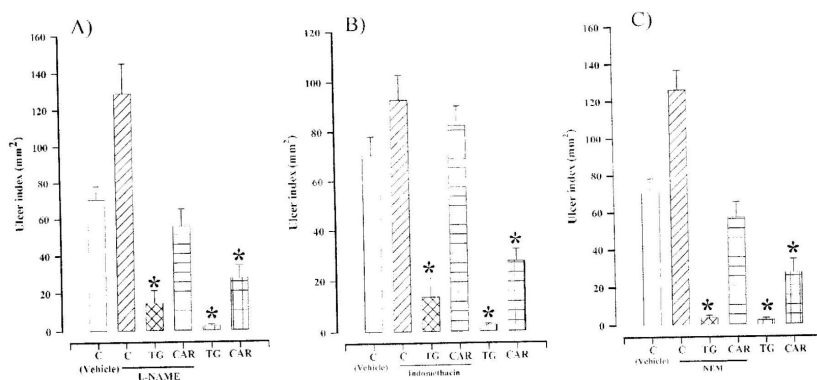


2.2. Effect of L-NAME, indomethacin, and NEM on the gastroprotective effect

It is well known that NO is involved in the modulation of gastric mucosal integrity, and in the regulation of acid and alkaline secretion, mucus secretion and gastric mucosal blood flow [14]. In an attempt to provide information about the mechanism of the gastroprotective action of tagitinin C, the participation of NO was evaluated by pretreatment with L-NAME.

The ulcer index of the group treated with 70 mg/kg of L-NAME plus 30 mg/kg of tagitinin C was $14.3 \pm 6.9 \text{ mm}^2$ (Figure 3A), and this value was significantly different ($p < 0.05$) from the respective control treated with saline solution ($70.3 \pm 7.6 \text{ mm}^2$). The current results show that in the presence of L-NAME the gastroprotective effect of tagitinin C was not inhibited, indicating that NO is not implicated in the action mechanism. Contrarily, NO does play a role in the mechanism of action of carbenoxolone (Figure 3A).

Figure 3. Effect of tagitinin C (TG) and carbenoxolone (CAR) at 30 mg/kg on gastric lesions induced by ethanol in rats pretreated with (A) L-NAME (70 mg/kg), (B) indomethacin (10 mg/kg) or (C) NEM (10 mg/kg). Bars represent the mean \pm SEM. $n = 10$. * $p < 0.05$ vs. the respective control: Dunn's multiple comparison test after Kruskal-Wallis test.



It is also well known that prostaglandins synthesized in large quantities by the gastrointestinal mucosa can prevent experimentally induced ulcers by ulcerogens. Thus, when the ulcer lesions are induced by absolute ethanol, the cytoprotective effect of the anti-ulcer agent can be mediated through endogenous prostaglandins [15].

Pretreatment with indomethacin (10 mg/kg) did not inhibit the gastroprotective action elicited by tagitinin C ($13.4 \pm 7.6 \text{ mm}^2$), indicating that prostaglandins do not participate in the mechanism of action (Figure 3B). This value of gastroprotection was significantly different ($p < 0.05$) than the respective control using the vehicle ($70.3 \pm 7.6 \text{ mm}^2$). Contrarily, the gastroprotective effect of carbenoxolone was attenuated ($82.0 \pm 7.9 \text{ mm}^2$) by pretreatment with indomethacin (Figure 3B), indicating a role played by prostaglandins.

It has been demonstrated that the development of ethanol induced gastric damage is accompanied by a decrease in mucosal sulfhydryl compounds, due to the fact that these compounds are neutralized when they bind to the free radicals produced with tissue injury by noxious agents [16]. Aiming to investigate the possible role of endogenous sulfhydryl compounds involved in the gastroprotective effect promoted by tagitinin C, the animals were pretreated with NEM, a blocker of sulfhydryl compounds. This pretreatment (Figure 3C) did not inhibit the gastroprotective effect of tagitinin C ($3.5 \pm 1.3 \text{ mm}^2$), as this value was significantly different ($p < 0.05$) with respect to the control group treated with the vehicle ($70.3 \pm 7.6 \text{ mm}^2$). Therefore endogenous sulfhydryls are not involved in the

ARTÍCULO IMPRESO

Molecules **2011**, *16*

670

gastroprotective effect. Contrarily, the gastroprotective effect of carbenoxolone was attenuated ($56.9 \pm 8.4 \text{ mm}^2$) by pretreatment with NEM, indicating a role by sulfhydryls.

The fact that a possible role of NO, sulfhydryl compounds, and prostaglandins was discarded in relation to the mechanism of gastroprotective action of tagitinin C, other possible mechanisms of action need to be investigated in future studies. Regarding carbenoxolone, the results of the present study are in agreement with data reported in the literature [17].

3. Experimental

3.1. General procedures

The ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded in a CDCl_3 solution on a Bruker AVANCE (F) 300 spectrometer, working at 300 and 75 MHz, respectively.

3.2. Plant material

The leaves of *Tithonia diversifolia* were collected in the Municipality of Suchiapa, Chiapas, during August of 2009. The plant was identified and registered by Francisco Hernández Najarro from the Flora Department of the Chip Herbarium, which is part of the Botanical Garden of the Secretary of Environmental Protection, Housing and Natural History of the State of Chiapas, Mexico. A specimen of the original collection can be found with the voucher number 42974.

3.3. Extraction and preliminary fraction

The leaves of *Tithonia diversifolia* were dried at room temperature ($22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) in the shade. After grinding 2.7 kg of leaves, compounds were successively extracted by maceration at room temperature ($22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) for 3 days, first with hexane (15 L \times 3), then dichloromethane (15 L \times 3) and finally methanol (15 L \times 3). Evaporation of the solvents in vacuum yielded 80, 100 and 200 g of syrupy residues, respectively. The dichloromethane extract obtained from the leaves of *T. diversifolia* showed the most active gastroprotective effect (Table 1). Thus 70 g of this extract was subjected to percolation over a silica gel column (0.063–0.200 mm, 500 g) by using a step gradient of hexane/EtOAc (9:1, 1.5 L, F1), hexane/EtOAc (7:3, 1.5 L, F2), hexane/EtOAc (1:1, 1.5 L, F3), EtOAc (1.5 L, F4), and MeOH (1.5 L, F5). 29 g of fraction 2 (F2), which was the most active, were chromatographed on a silica gel column (290 g) by using a step gradient of hexane, hexane/EtOAc and EtOAc. From this procedure, fraction 3 (F3') was the most active. Thus 6.4 g of this fraction were chromatographed on a silica gel column (64 g). Elution was performed with hexane and hexane/EtOAc mixtures, obtaining 24 fractions of 40 mL each. The main active gastroprotective agent from fraction 8 (hexane/EtOAc, 9:1) was identified as tagitinin C (500 mg) by comparison of the (^1H and ^{13}C NMR) spectral data with that of the literature [11].

3.4. Phytochemical data

Tagitinin C. ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 1.05$ (3H, d, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_3\text{-C}2'$), 1.07 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_3\text{-C}2'$), 1.54 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C}10$), 1.95 (3H, s br, $\text{CH}_3\text{-C}4$), 2.02 (1H, dd, $J = 14.1$ and 4.2 Hz, H-9b),

ARTÍCULO IMPRESO

Molecules **2011**, *16*

671

2.42 (1H, dd, $J = 14.1$ and 4.2 Hz, H-9a), 2.42–2.52 (1H, m, H-2'), 2.6 (1H, br, OH), 3.54–3.58 (1H, m, H-7), 5.30–5.38 (1H, m, H-8), 5.41 (1H, d br, $J = 9.0$ Hz, H-6), 5.81 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-13b), 5.87 (1H, d br, $J = 9.0$ Hz, H-5), 6.25 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-2), 6.35 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-13a), 6.94 (1H, d, 17.1 Hz, H-1). ^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 18.58$ ($\text{CH}_3\text{-C}2'$), 18.76 ($\text{CH}_3\text{-C}2'$), 19.63 ($\text{CH}_3\text{-C}4$), 28.95 ($\text{CH}_3\text{-C}10$), 30.01 (C-2'), 47.00 (C-7), 48.36 (C-9), 71.99 (C-10), 73.95 (C-8), 75.97 (C-6), 124.49 (C-13), 129.60 (C-2), 136.02 (C-11), 137.12 (C-5), 138.89 (C-4), 160.16 (C-1), 169.69 (C-12), 176.21 (C-1'), 196.77 (C-3). These data match those in the literature [11].

3.5. Animals

All the experiments were performed with male Wistar rats, weighing 180–220 g, obtained from the animal house of the Superior Medicine School (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 8–10 animals per group.

3.6. 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 (IND) were purchased from Sigma Chemical Co. USA.

3.7. Acute gastric ulcer induced by absolute ethanol

A gastric ulcer was induced by administering absolute ethanol orally (1 mL) [17]. The extracts or drugs were administered to different groups 30 min before ethanol administration. Two hours after ethanol administration, the animals were sacrificed in a CO_2 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 (mm^2) 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 = $(\text{UIC-UIT}) \times 100/\text{UIC}$, where UIC is the ulcer index in control and UIT is the test animal index [17].

3.8. 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 dissolved in saline solution) was intraperitoneally injected to 3 experimental groups 30 min before the administration of either the vehicle, tagitinin C (30 mg/kg) or carbenoxolone

ARTÍCULO IMPRESO

Molecules **2011**, *16*

672

(100 mg/kg) by the oral route [18]. Absolute ethanol was given to each rat in these groups 30 min later, and the animals were sacrificed 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.

3.9. 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 group an injection of indomethacin (10 mg/kg dissolved in NaHCO₃ 5 mM) by the same route [18]. After 75 min, the animals in each of these two groups received one of three oral treatments (saline solution, 30 mg/kg tagitinin C or 100 mg/kg carbenoxolone). Absolute ethanol was given to each rat 30 min after tagitinin C or carbenoxolone administration and the rats were sacrificed 2 h later in a CO₂ chamber. The stomachs were subsequently removed to measure the ulcer index, as aforementioned.

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

To investigate the involvement of the endogenous sulphydryls in the protective effects of tagitinin C and carbenoxolone, NEM (10 mg/kg dissolved in saline solution) was subcutaneously injected in 3 groups of animals 30 min before the oral administration of either the vehicle, tagitinin C (30 mg/kg) or carbenoxolone (100 mg/kg) [18]. Absolute ethanol was given to each rat 30 min later and rats were sacrificed 2 h after the administration of ethanol to measure the intensity of the gastric ulcer. Two control groups (NEM-treated and non-NEM-treated) were included in this experiment.

3.11. Statistics

Data are presented as the mean \pm SEM from 8–10 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.

4. Conclusions

The current study demonstrates the effectiveness of *Tithonia diversifolia* in the treatment of gastric ulcer. Tagitinin C was identified as the main active gastroprotective agent in this traditional medicinal plant. The mechanism of the gastroprotective action shown by tagitinin C is not related to endogenous NO, prostaglandins or sulphydryl groups. Further pharmacological investigations are necessary to provide evidence about the gastroprotective mechanism of action of tagitinin C.

Acknowledgements

We are grateful to Manuel de Jesús Gutiérrez Morales for collecting the plant material. We thank Bruce Allan Larsen for reviewing the use of English. This work was supported by grant from the Escuela Superior de Medicina of the Instituto Politécnico Nacional, México (Proyectos: SIP 20100362, SIP 20100361).

ARTÍCULO IMPRESO

Molecules **2011**, *16*

673

References

1. Bucciarelli, A.; Minetti, A.; Milczakowsky, C.; Skliar, M. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). *Pharm. Biol.* **2010**, *48*, 1025-1030.
2. Babu, T.H.; Manjulatha, K.; Kumar, G.S.; Hymavathi, A.; Tiwari, A.K.; Purohit, M.; Rao, J.M.; Babu, K.S. Gastroprotective flavonoid constituents from *Oroxylum indicum* Vent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 117-120.
3. Santin, J.R.; Lemos, M.; Klein, L.C., Jr.; Niero, R.; de Andrade, S.F. Antiulcer effects of *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *130*, 334-339.
4. Kuroda, M.; Yokosuka, A.; Kobayashi, R.; Jitsuno, M.; Kando, H.; Nosaka, K.; Ishii, H.; Yamori, T.; Mimaki, Y. Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 1240-1244.
5. Castillo-Juárez, I.; González, V.; Jaime-Aguilar, H.; Martínez, G.; Linares, E.; Bye, R.; Romero, I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *122*, 402-405.
6. Adebayo, J.O.; Balogun, E.A.; Oyeleke, S.A. Toxicity study of the aqueous extract of *Tithonia diversifolia* leaves using selected biochemical parameters in rats. *Phcog Res.* **2009**, *1*, 143-147.
7. Yemele Bouberte, M.; Krohn, K.; Hussain, H.; Dongo, E.; Schulz, B.; Hu, Q. Tithoniamarin and tithoniamide: a structurally unique isocoumarin dimer and a new ceramide from *Tithonia diversifolia*. *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 842-849.
8. Ambrósio, S.R.; Oki, Y.; Heleno, V.C.; Chaves, J.S.; Nascimento, P.G.; Lichston, J.E.; Constantino, M.G.; Varanda, E.M.; da Costa, F.B. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: Relationships to herbivory and antifeedant activity. *Phytochemistry.* **2008**, *69*, 2052-2060.
9. Toma, W.; Gracioso, J.S.; de Andrade, F.D.; Hiruma-Lima, C.A.; Vilegas, W.; Souza-Brito, A.R. Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the bark wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 1151-1155.
10. Al-Mofleh, I.A.; Alhaider, A.A.; Mossa, J.S.; Al-Sohaibani, M.O.; Al-Yahya, M.A.; Rafatullah, S.; Shaik, S.A. Gastroprotective effect of an aqueous suspension of black cumin *Nigella sativa* on necrotizing agents-induced gastric injury in experimental animals. *Saudi J. Gastroenterol.* **2008**, *14*, 128-134.
11. Baruah, N.C.; Sharma, R.P.; Madhusudanan, K.P.; Thyagarajan, G.; Herz, W.; Murari, R. Sesquiterpene lactones of *Tithonia diversifolia*. Stereochemistry of the tagitinins and related compounds. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1831-1835.
12. Goffin, E.; da Cunha, A.P.; Ziemons, E.; Tits, M.; Angenot, L.; Frederich, M. Quantification of tagitinin C in *Tithonia diversifolia* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* **2003**, *14*, 378-380.
13. Gu, J.Q.; Gills, J.J.; Park, E.J.; Mata-Greenwood, E.; Hawthorne, M.E.; Axelrod, F.; Chavez, P.I.; Fong, H.H.S.; Mehta, R.G.; Pezzuto, J.M.; Kinghorn, A.D. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 532-536.

ARTÍCULO IMPRESO

Molecules **2011**, *16*

674

14. Chandranath, S.I.; Bastaki, S.M.A.; Singh, J. A comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol- and indomethacin- induced gastric lesions in the rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2002**, *29*, 173-180.
15. Yamamoto, K.; Kakegawa, H.; Ueda, H.; Matsumoto, H.; Sudo, T.; Miki, T.; Satoh, T. Gastric cytoprotective anti-ulcerogenic actions of hydroxychalcones in rats. *Planta Med.* **1992**, *58*, 389-393.
16. Maity, S.; Vedasiromoni, J.R.; Ganguly, D.K. Role of glutathione in the antiulcer effect of hot water extract of black tea (*Camellia sinensis*). *Jpn. J. Pharmacol.* **1998**, *78*, 285-292.
17. Sánchez-Mendoza, M.E.; Reyes-Trejo, B.; Sánchez-Gómez, P.; Rodríguez-Silverio, J.; Castillo-Henkel, C.; Cervantes-Cuevas, H.; Arrieta, J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer chromene from *Eupatorium aschenbornianum*: Role of nitric oxide, prostaglandins and sulphydryls. *Fitoterapia* **2010**, *81*, 66-71.
18. Reyes-Trejo, B.; Sánchez-Mendoza, M.E.; Becerra-García, A.A.; Cedillo-Portugal, E.; Castillo-Henkel, C.; Arrieta, J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer diterpenoid from *Croton reflexifolius*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulphydryls. *J. Pharm. Pharmacol.* **2008**, *60*, 931-936.

Sample Availability: Samples of the investigated extracts are available from the authors.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).